

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
MÉDICAS**

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO CORPORAL  
E DE MUTAÇÕES COMUNS NOS GENES *CβS*, *MTHFR* e *F5* EM  
PACIENTES COM HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA**

Soraia Poloni

Dissertação de mestrado

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
MÉDICAS

IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO CORPORAL E  
DE MUTAÇÕES COMUNS NOS GENES *CβS*, *MTHFR* e *F5* EM  
PACIENTES COM HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA

SORAIA POLONI

ORIENTADOR: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2012

# DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

Poloni, Soraia

Identificação de alterações na composição corporal e de mutações comuns nos genes CBS, MTHFR e F5 em pacientes com homocistinúria clássica / Soraia Poloni. -- 2012.

84 f.

Orientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Homocistinúria clássica. 2. composição corporal. 3. CBS. 4. MTHFR. 5. Fator V de Leiden. I. Schwartz, Ida Vanessa Doederlein, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Ida Schwartz, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e dedicação para a realização deste trabalho.

À Professora Sandra Leistner-Segal pela ajuda, ensinamentos e colaboração neste projeto.

Aos colegas e amigos do Laboratório BRAIN e do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Aline Bochernitsan, Andressa Bortoluzzi, Fernanda Bender, Francyne Kubaski, Isabel Cristina Bandeira e Thaís Santa Rita. Sem a ajuda e o apoio de vocês a execução deste projeto não seria possível!

À equipe do Ambulatório de Distúrbios Metabólicos, em especial Carolina Fischinger M. de Souza, Cristina Brinckmann O. Netto, Lília Farret Refosco, Taciane Alegria, Tatiane Alves Vieira e Tatiéle Nalin, pelas contribuições e apoio a este projeto.

À Dra Vânia D'Almeida e à Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela colaboração neste projeto através da realização das dosagens de cisteína.

Ao Dr. Terry G. J. Derks, pela revisão do artigo e sugestões ao trabalho.

Ao Serviço de Genética Médica do HCPA e à UFRGS por viabilizar a realização deste estudo.

Aos pacientes com homocistinúria clássica e seus familiares, pelo interesse e colaboração na participação do estudo.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA – FIPE e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), cujo apoio financeiro viabilizou a realização deste estudo.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo à carreira acadêmica e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos meus queridos amigos, em especial à Vanessa da Silva Alves, pelo apoio, compreensão e companheirismo.

À Deus, por permitir que tudo isso acontecesse.

**MUITO OBRIGADA!**

## **EPÍGRAFE**

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

(Fernando Pessoa)

## LISTA DE ABREVIATURAS

HC: homocistinúria clássica

EIM: erros inatos do metabolismo

C $\beta$ S: cistationina  $\beta$ -sintase

MTHFR: 5,10-Metileno tetraidrofolato redutase

AdoMet: *S*-adenosilmetionina

AdoHcy: *S*-adenosilhomocisteína

MAT: ATP-L-metionina *S*-adenosiltransferase

MS: metionina sintase

5-metilTHF: 5-metil tetraidrofolato

THF: tetraidrofolato

BHMT: betaína: homocisteína metiltransferase

PLP: piridoxal 5'-fosfato

CGL: cistationina gama-liase

SNP: Single Nucleotide Polymorphisms

TVP: trombose venosa profunda

BIA: bioimpedância elétrica

DXA: dual X-ray absorptiometry

DCB: dobra cutânea bicipital

DCT: dobra cutânea tricipital

DCSE: dobra cutânea subescapular

DCSI: dobra cutânea suprailíaca

TVP: trombose venosa profunda

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Prevalências dos genótipos do polimorfismo c.677C>T do gene *MTHFR* em pacientes com homocistinúria por deficiência de C $\beta$ S.....**28**

**Tabela 2.** Equações para estimativa da densidade corporal (kg/m<sup>2</sup>) para ambos os sexos.....**31**



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rotas do metabolismo da homocisteína.....	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b> Estrutura terciária da C $\beta$ S.....	<b>11</b>
<b>Figura 3.</b> Organização do gene da C $\beta$ S humana.....	<b>23</b>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
3.1	HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA.....	6
3.1.1	Definição.....	6
3.1.2	Epidemiologia.....	6
3.1.3	Metabolismo da homocisteína.....	7
3.1.4	Estrutura, função e regulação da CβS.....	9
3.1.5	Diagnóstico.....	11
3.1.6	Manifestações clínicas.....	13
3.1.7	Fisiopatologia.....	15
3.1.8	Tratamento.....	18
3.1.9	Aspectos genéticos.....	22
3.1.10	Estado nutricional e composição corporal.....	29
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
4.1	PRIMÁRIOS.....	33
4.2	SECUNDÁRIOS.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34
<b>5.</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>65</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO II.....</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE I.....</b>	<b>72</b>
	<b>APÊNDICE II.....</b>	<b>73</b>

## 1. RESUMO

**Introdução:** A homocistinúria clássica é um erro inato do metabolismo causado pela atividade deficiente da cistationina  $\beta$ -sintase (C $\beta$ S). É caracterizada pela elevação sérica de homocisteína e metionina e redução dos níveis de cisteína. As manifestações clínicas clássicas envolvem os sistemas ocular, vascular, nervoso central e ósseo. Entretanto, observações recentes sugerem que alterações na composição corporal, especialmente a redução de tecido adiposo, também pode ser uma manifestação frequente e clinicamente relevante nesta doença. Além disso, a gravidade do fenótipo clínico parece ser influenciada por outros genes além do C $\beta$ S. O objetivo deste estudo foi investigar alterações na composição corporal e detectar mutações comuns nos genes C $\beta$ S, MTHFR e F5 em pacientes com homocistinúria clássica; relacionando dados clínicos, bioquímicos e genéticos. **Métodos:** Realizada avaliação da composição corporal em 8 pacientes através de duas técnicas: antropometria (aferição das dobras cutâneas tricipital, bicipital, subescapular e suprailíaca) e bioimpedância elétrica (BIA). A partir dos resultados obtidos, calculou-se o percentual de gordura pelas fórmulas de Siri (antropometria) e Kushner (BIA). O índice de massa corporal (IMC) também foi calculado. Os níveis de metionina, homocisteína e cisteína foram mensurados por HPLC. A avaliação genotípica foi realizada em 11 pacientes através de PCR-RFLP. Pesquisadas as mutações p.I278T, p.T191M, p.G307S e c.844ins68 no gene C $\beta$ S; c.677TC>T e c.1298A>C no gene MTHFR; e p.R506Q no gene F5 (Fator V de Leiden). **Resultados:** Cinco pacientes apresentaram baixo percentual de gordura por pelo menos um dos métodos; o restante apresentou percentual médio. De acordo com o IMC, apenas dois pacientes foram classificados em baixo peso. O percentual de gordura total não se relacionou com os achados bioquímicos ou ósseos, mas medida isolada da dobra cutânea tricipital correlacionou-se positivamente com os níveis de cisteína ( $p=0,03$ ). Além disso, os níveis de homocisteína e metionina correlacionaram-se negativamente com o IMC, enquanto que a cisteína teve associação positiva ( $p<0,05$ ). Houve tendência do escore T de fêmur associar-se negativamente com homocisteína e positivamente com cisteína ( $p=0,09$ ). Entre as mutações do gene C $\beta$ S, a p.I278T foi a única encontrada ( $n= 3/9$  famílias); entretanto, em 2/3 famílias estava em cis com a c.844ins68. Assim, em apenas um caso tinha caráter patogênico. Não foi possível estabelecer associação entre mutações em MTHFR e F5 e a gravidade do fenótipo. **Conclusões:** Os resultados sugerem que deficiência de C $\beta$ S gera alterações significativas na composição corporal – observou-se redução do percentual de gordura independentemente do IMC. Este pode ser um mecanismo patogênico importante envolvido na etiologia da

osteoporose na homocistinúria clássica, mas estudos adicionais são necessários para demonstrar esta relação. Os achados sugerem que as mutações patogênicas no gene *CBS* sejam raras ou privadas nesta amostra, e não corroboram a ação dos genes *MTHFR* e *F5* como modificadores da doença.

**Palavras chave:** Homocistinúria clássica. Cistationina  $\beta$ -sintase. Composição corporal. *MTHFR*. Fator V de Leiden.

## ABSTRACT

**Introduction:** Classical homocystinuria is an inborn error of metabolism caused by the deficient activity of cystathionine  $\beta$ -synthase ( $C\beta S$ ). It is characterized by plasma increase in homocysteine and methionine and a decrease in cysteine levels. Its classical clinical manifestations involve the following systems: ocular, vascular, central nervous, and skeletal. However, recent observations have suggested that changes in the body composition, especially a reduction of the adipose tissue, may also be a frequent manifestation of the disease and clinically relevant to it. Moreover, the severity of its clinical phenotype may be influenced by other genes besides  $C\beta S$ . The objective of the present study was to investigate alterations in the body composition and to detect common mutations in  $C\beta S$ ,  $MTHFR$  and  $F5$  genes in patients with classical homocystinuria and to correlate them to the clinical, biochemical, and genetic data. **Methods:** Body composition was assessed in 8 patients using the techniques of anthropometry (measurement of the following skinfolds: tricipital, bicipital, subscapular, and suprailiac) and electrical bioimpedance (BIA). Based on the results obtained, the percentage of body fat was calculated using the formulas of Siri (anthropometry) and Kushner (BIA). The body mass index (BMI) was also calculated. The levels of methionine, homocysteine, and cysteine were measured by HPLC. The genotypic evaluation was done in 11 patients by PCR-RFLP. The following mutations were investigated: p.I278T, p.T191M, p.G307S, and c.844ins68 in the  $C\beta S$  gene; c.677TC>T and c.1298A>C in the  $MTHFR$  gene; and p.R506Q in the  $F5$  gene (Factor V Leiden). **Results:** Five patients presented low percentage of body fat by at least one of the methods; the other patients presented a medium percentage. According to the BMI, only 2 patients were classified as being underweight. The percentage of total body fat was not related to either bone or biochemical findings, but the isolate measurement of the tricipital skinfold was positively correlated to the levels of cysteine ( $p=0.03$ ). Also, the levels of homocysteine and methionine were negatively correlated to the BMI, while cysteine had a positive association ( $p<0.05$ ). The T score of the femur tended to associate negatively with homocysteine and positively with cysteine ( $p=0.09$ ). The genetic evaluation revealed only one pathogenic mutation in  $C\beta S$  (p.I278T). An association between mutations in  $MTHFR$  and  $F5$  and phenotype severity could not be established. **Conclusions:** The present results suggest that the deficiency of  $C\beta S$  causes significant alterations in the body composition; a reduction of the percentage of body fat was observed independently from the BMI. This may be an important pathogenic mechanism involved in the etiology of osteoporosis in classical homocystinuria. The present findings suggest that in this sample the

pathogenic mutations in the *CBS* gene are rare or private and do not corroborate with the action of the *MTHFR* and *F5* genes as disease modifiers. Further studies are needed.

**Key words:** Classical homocystinuria. Cystathionine  $\beta$ -synthase. Body composition. MTHFR. Factor V Leiden.

## 2. INTRODUÇÃO

A homocistinúria clássica (HC; OMIM +236200) é uma doença genética rara herdada de maneira autossômica recessiva. A HC pertence ao grupo de doenças genéticas denominadas erros inatos do metabolismo (EIM), e que são causadas por alterações na estrutura e/ou função de moléculas protéicas, geralmente enzimas (SAÍNZ et al., 2002). Bioquimicamente, a HC caracteriza-se pelo aumento sérico de homocisteína, metionina, S-adenosil homocisteína e redução da concentração sérica de cistationina e cisteína (WILCKEN, 2006).

A HC foi descrita pela primeira vez na Irlanda, em 1962, por Nina Carson e Desmond Neill. Enquanto realizavam testes de urina a fim de detectar distúrbios metabólicos em indivíduos com retardo mental, eles verificaram que duas irmãs excretavam grande quantidade de homocistina na urina. Além do retardo mental, as irmãs apresentavam alterações clínicas como luxação de cristalino, deformidades esqueléticas e alterações na pele e cabelos. Os pesquisadores denominaram este novo distúrbio metabólico de homocistinúria (CARSON e NEILL, 1962). Dois anos depois, descobriu-se que a doença era causada por um defeito na enzima cistationina  $\beta$ -sintase (C $\beta$ S; EC 4.2.1.22), responsável pela degradação da homocisteína (MUDD et al., 1964).

Pouco tempo após a descoberta da doença e do defeito enzimático, surgiram as primeiras descrições de tratamento com restrição dietética de metionina, aminoácido precursor da homocisteína; e suplementação de piridoxina, cofator da C $\beta$ S (BARBER e SPAETH, 1967; PERRY et al., 1968).

Anos mais tarde, uma grande compilação de dados de vários centros no mundo permitiu elucidar melhor a história natural da doença. Este trabalho, que incluiu dados de mais de 600 pacientes com HC, descreveu também as diferenças clínicas entre os pacientes que respondiam à terapia com piridoxina e os não-responsivos. Além disso, demonstrou o efeito positivo do tratamento - especialmente no período neonatal - na incidência de complicações (MUDD et al., 1985).

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA**

##### **3.1.1 Definição**

O termo homocistinúria clássica refere-se exclusivamente à atividade deficiente da enzima C $\beta$ S. A HC pertence à subcategoria de EIM denominada distúrbios do metabolismo dos aminoácidos sulfurados, que inclui os distúrbios de transsulfuração e de remetilação da homocisteína (WILCKEN, 2006; MUDD et al., 2001).

A eliminação excessiva de homocistina na urina (ou homocistinúria) pode ser causada por outros distúrbios genéticos ou não-genéticos (como a deficiência dietética grave de vitamina B12). Entre os defeitos genéticos, incluem-se a deficiência de 5,10-metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR; EC 1.7.99.5) e os distúrbios do metabolismo da cobalamina. Defeitos nestas rotas, envolvidas na remetilação da homocisteína a metionina, causam aumento dos níveis séricos de homocisteína. Entretanto, estas doenças apresentam concentração sérica normal ou reduzida de metionina, ao contrário do que é observado na HC (PICKER e LEVY, 2011).

##### **3.1.2 Epidemiologia**

Acredita-se que a prevalência de HC seja amplamente subestimada. Com base em estudos de triagem neonatal, estima-se uma incidência mundial de aproximadamente 1:344000 recém nascidos, com grande variação entre populações (SKOVBY et al., 2010; MUDD et al., 2001). Quando avaliada por programas de triagem neonatal baseados na quantificação de metionina, a incidência da HC costuma ser menor do que a prevalência observada na mesma população. Estima-se um percentual de 20 a 50% de falsos negativos por este método de triagem. Métodos mais recentes de triagem neonatal, como a determinação de homocisteína ou da genotipagem de mutações têm encontrado incidências de HC tão altas



quanto 1:6400 na Noruega e 1:1800 no Catar (REFSUM et al., 2004; GAN-SCHREIER et al., 2010).

Entre as populações com maior prevalência da doença, estão a Irlanda (incidência de 1:65.000 recém-nascidos vivos), a Alemanha (prevalência 1:17800), e a Noruega e o Catar, descritos acima. (NAUGHTEN et al., 1998, LINNEBANK et al., 2001, PICKER e LEVY, 2011). Não há dados sobre incidência ou prevalência da HC no Brasil.

### 3.1.3 Metabolismo da homocisteína

A homocisteína é um aminoácido sulfurado formado através do catabolismo da metionina, e é um substrato chave em três reações essenciais: a reciclagem do folato intracelular; o catabolismo da colina e da betaína; e a transsulfuração, rota responsável pela formação de cistationina, cisteína e glutatoina, entre outros metabólitos (FINKELSTEIN, 1998). O metabolismo da homocisteína é sumarizado na figura 1.

A desmetilação de metionina ocorre via dois compostos intermediários, a *S*-adenosilmetionina (AdoMet) e a *S*-adenosilhomocisteína (AdoHcy). A transformação da metionina em AdoMet ocorre via MAT (metionina adenosiltransferase; EC 2.5.1.6), uma enzima codificada por dois genes que apresentam padrões de expressão tecido-específicos. Enquanto que a MAT II está presente em quase todos os tecidos e possui uma baixa  $K_m$  pela metionina, as isoformas I e III são expressas apenas no fígado adulto e possuem um alto  $K_m$  pela metionina. Assim, o fígado torna-se o único tecido capaz de aumentar a síntese de produto em resposta ao excesso de metionina. A AdoMet formada participa como doador de metil em mais de 100 diferentes reações celulares, incluindo a metilação de DNA, RNA, proteínas e lipídeos (CASTRO et al., 2006; BLOM e SMULDERS, 2011).

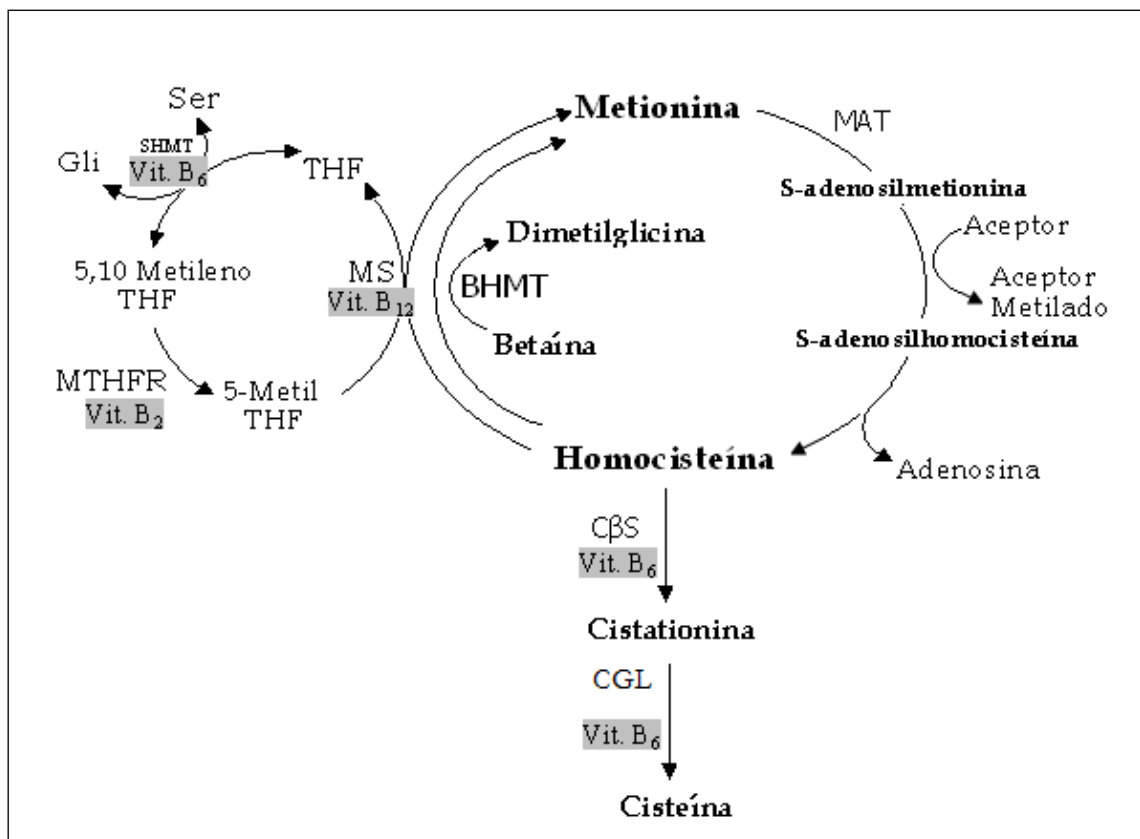
Com a doação de um grupo metil, a AdoMet é transformada em AdoHcy, que posteriormente é convertida em homocisteína e adenosina pela adenosilhomocisteinase (EC 3.3.1.1). Após formada, a homocisteína pode seguir duas rotas principais: a transsulfuração, onde é degradada; ou a remetilação, onde é reconvertida a metionina.

A homocisteína pode ser remetilada à metionina por duas rotas alternativas. A primeira é catalizada pela metionina sintase (MS; EC 2.1.1.13), uma enzima dependente de vitamina B<sub>12</sub> e folato. Esta reação ocorre em todas as células, com exceção dos eritrócitos. Neste ponto, o metabolismo da homocisteína e do folato conectam-se diretamente. A MS

adquire papel essencial por ser a única enzima capaz de converter o 5-metil tetrahydrofolato (5-metilTHF) em tetrahydrofolato (THF), necessário para diversas reações celulares (CASTRO et al., 2006; FINKELSTEIN, 1998).

A betaína: homocisteína metiltransferase (BHMT; EC 2.1.1.5) também pode catalisar a remetilação da homocisteína usando betaína, formada pelo catabolismo da colina, como doador do grupo metil. Esta reação, essencial para o catabolismo oxidativo da colina, ocorre principalmente nos tecidos hepático e renal (BLOM e SMULDERS, 2011; FOWLER, 1997).

A rota de transsulfuração degrada irreversivelmente a homocisteína a cisteína. Esta reação é catalisada por duas enzimas dependentes de piridoxal 5'-fosfato (PLP), forma ativa da vitamina B<sub>6</sub>- a CβS e a cistationina gama-liase (CGL; EC 4.4.1.1) Na primeira etapa, a CβS catalisa a condensação de homocisteína e serina, formando cistationina. Em seguida, a cistationina é hidrolisada em cisteína e α-cetobutirato pela CGL. O catabolismo posterior da cisteína é essencial para a conversão do enxofre em seus produtos finais normais (como o sulfato e a taurina) para então ser excretado na urina (STIPANUK e UEKI, 2011).



**Figura 1 - Rotas do metabolismo da Homocisteína.**

MAT: metionina adenosiltransferase; AdoMet: S-adenosilmetionina; AdoHcy: S-adenosilhomocisteína; THF: tetrahydrofolato; Ser: serina; Gli: glicina; MTHFR: 5,10 metileno tetrahydrofolato redutase; SHMT: serina hidroximetiltransferase (EC 2.1.2.1); MS: metionina sintase; BHMT: betaína:homocisteína metiltransferase; CβS: cistationina β-sintase. CGL: cistationina gama-liase.

O controle do metabolismo da homocisteína é complexo e opera em diversos níveis. As concentrações enzimáticas são influenciadas por diversos fatores, como a ingestão protéica e de metionina, níveis hormonais, deficiências nutricionais, idade e mudanças em longo prazo nos níveis de substrato (FINKELSTEIN, 1998).

A AdoMet possui um papel central na regulação do metabolismo da homocisteína. Quando os níveis de metionina aumentam, a concentração de AdoMet aumenta e favorece a reação pela rota de transsulfuração, ativando a enzima CβS e inibindo a MTHFR. Se os níveis de metionina estão baixos, como no jejum, os níveis reduzidos de AdoMet não vão ativar a CβS ou inibir a MTHFR, resultando na remetilação da homocisteína a metionina. (PICO e BERMÚDEZ, 2006; BLOM e SMULDERS, 2011; FOWLER, 1997).

### **3.1.4 Estrutura, função e regulação da CβS**

A CβS pertence a um grupo de enzimas denominadas piridoxal-fosfato-dependentes. O produto translacional primário da CβS humana é um polipeptídeo de peso molecular de 63 kDa, que posteriormente forma tetrâmeros. Cada subunidade com 551 aminoácidos se liga a duas moléculas: a homocisteína e a serina, para formar a <sub>L</sub>-cistationina.

A regulação da atividade da enzima ocorre primariamente através da ligação de três componentes: o piridoxal fosfato, a AdoMet e o grupamento heme (BANERJEE E ZOU, 2005). A estrutura terciária da CβS é apresentada na Figura 2.

Em humanos, a CβS contém uma região N-terminal de ~70 aminoácidos que liga ao grupamento heme. Esta ligação é essencial para a ativação completa da CβS. Estudo de Kery et al, (1994) demonstrou que o heme só pode ser incorporado à CβS no momento do enovelamento da enzima, e que apenas a fração da enzima contendo o heme pode ligar-se ao PLP. Estes dados indicam um papel do grupamento heme no enovelamento correto da enzima e na formação de um domínio estrutural para o PLP. Sob a dissociação completa do grupamento heme, a enzima retém aproximadamente 20% de sua atividade original (MILES e KRAUS, 2004; MEIER et al., 2001).

O sítio ativo representa a porção conservada da proteína, e é composto pelos resíduos de aminoácido 40 a 413. Isoladamente, este sítio forma dímeros de 45 kDa, que são cerca de duas vezes mais ativos do que a forma tetramérica (KRAUS, 2011). O cofator PLP localiza-se

em uma fenda entre os domínios N- e C-terminal, e o sítio ativo fica acessível apenas por um estreito canal (MEIER et al. 2001).

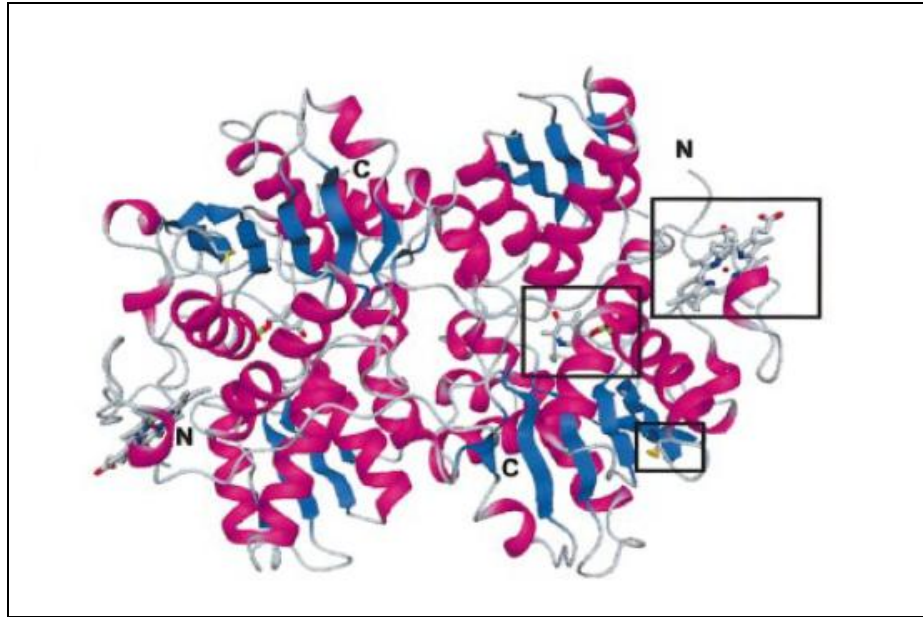
O domínio regulatório C-terminal contém ~140 resíduos de aminoácido e inclui o chamado “domínio C $\beta$ S”. Trata-se de uma porção conservada da proteína, composta por ~60 aminoácidos. Em diversas proteínas, o domínio C $\beta$ S liga-se à derivados de adenosina, podendo exercer a função de “sensor de energia”. Dois domínios C $\beta$ S parecem existir na C $\beta$ S humana, abrangendo os resíduos 421-470 e 486-543 (BANERJEE e ZOU, 2005).

O domínio C-terminal exerce um efeito autoinibitório no sítio ativo da enzima. Esta inibição é reduzida pela ligação da AdoMet, o ativador alostérico da C $\beta$ S. Esta ligação aumenta a atividade da enzima em aproximadamente três vezes (KLUIJTMANS et al., 1996; MILES e KRAUS, 2004).

Estudos sugerem ainda que uma via de sinalização oxidativa possa levar à clivagem da C $\beta$ S e, conseqüentemente, à sua ativação e aumento da concentração de glutathione. Esta hipótese é suportada pelo fato da C $\beta$ S humana possuir dois sítios ativos redox: o heme e o motivo oxidoreductase CXXC. *In vitro*, a atividade da C $\beta$ S pode ser modulada por mudanças no potencial redox do ambiente. Esta ativação poderia aumentar a conversão de metionina a cisteína, aminoácido limitante na síntese de glutathione. Isto geraria uma resposta autocorretiva, onde o aumento de glutathione atenuaria o insulto oxidativo (BANERJEE e ZOU, 2005; MEIER et al., 2001).

Cinco isoformas da C $\beta$ S humana já foram descritas, diferindo entre si apenas pelo terminal 5'. A C $\beta$ S2 parece ser a forma predominante, sendo os tecidos com maior concentração de C $\beta$ S mRNA o hepático e o pancreático (BAO et al., 1998).

Enquanto que uma grande parte das mutações descritas no gene da C $\beta$ S reduz sua atividade por uma desestabilização na estrutura da proteína, outras afetam a ligação de seus reguladores. A p.D444N, por exemplo, prejudica a ligação da AdoMet, e causa homocistinúria na forma homozigótica (MILES e KRAUS, 2004; KLUIJTMANS et al., 1996).



**Figura 2. Estrutura terciária da C $\beta$ S.** As  $\beta$ -sheets centrais são coloridas em azul e as  $\alpha$ -hélices em torno são coloridas de magenta. As representações marcadas por uma caixa preta são os sítios ativo PLP, heme e oxidorreductase (MEIER et al., 2001).

### 3.1.5 Diagnóstico

A presença de um ou mais sinais clínicos típicos da doença pode levantar a suspeita de HC. Os achados oftalmológicos são frequentemente a primeira manifestação clínica, contribuindo para a suspeita de HC na maioria dos casos. O retardo mental e o fenótipo marfanóide também têm grande participação na investigação de HC (MUDD et al., 1985; MUDD et al., 2001). Embora algumas manifestações clínicas sejam bastante sugestivas da doença, o diagnóstico definitivo de HC deve ser confirmado por outros métodos.

Existem diversos testes bioquímicos disponíveis para o diagnóstico da HC, com diferentes graus de especificidade e sensibilidade. Um dos achados mais característicos da HC é a eliminação excessiva de homocistina na urina. O teste do cianeto-nitroprussiato é um método sensível para demonstrar o aumento na eliminação de compostos sulfurados na urina, mas não é específico para HC, sendo utilizado como teste de triagem (PICO e BERMÚDEZ, 2006).

A determinação dos níveis plasmáticos de homocisteína e metionina é essencial para a investigação de casos suspeitos de HC. Além da elevação de homocisteína e metionina,

observa-se também e níveis reduzidos de cisteína e cistationina no plasma (YAP, 2005; FOWLER e JAKOBS, 1998). A hipermetioninemia é um achado importante, já que outros defeitos no metabolismo da homocisteína apresentam concentrações normais ou baixas de metionina (PICKER e LEVY, 2011).

Indivíduos com formas mais leves de HC podem apresentar uma resposta importante a baixas doses de piridoxina, como 2mg/dia. O uso de suplementos vitamínicos com piridoxina pode normalizar os testes bioquímicos de HC, levando a um diagnóstico falso-negativo. Assim, indivíduos com manifestações clínicas sugestivas de HC com testes de investigação normais devem sempre ser questionados sobre o consumo dietético habitual, em especial o uso de suplementos vitamínicos (MUDD et al., 2001)

A avaliação da atividade enzimática é o padrão-ouro para confirmação do diagnóstico de HC. Ela pode ser feita através da medida da atividade da C $\beta$ S em cultura de fibroblastos, biópsias hepáticas ou linfócitos estimulados por fitohemaglutinina (YAP, 2005). A atividade enzimática em indivíduos com HC varia de 0 a 1.8 U/mg proteína, enquanto em controles fica na faixa de 3.7-60 U/mg proteína. Embora geralmente seja maior em pacientes responsivos à piridoxina, a atividade enzimática não distingue confiavelmente respondedores de não-respondedores (PICKER e LEVY, 2011).

O diagnóstico por análise de DNA é especialmente útil para detecção de heterozigotos em famílias com mutações conhecidas no gene *C $\beta$ S*, uma vez que os testes bioquímicos podem ser normais nesta população. Visto que mais de 160 mutações já foram descritas no gene *C $\beta$ S*, sendo grande parte delas privada, o uso rotineiro do diagnóstico genético torna-se limitado (PICKER e LEVY, 2011; FOWLER e JAKOBS, 1998). O diagnóstico pré-natal também é possível através da extração de cultura de células do fluido amniótico e detecção da atividade enzimática (PICO e BERMÚDEZ, 2006).

O diagnóstico neonatal pode ser realizado através da determinação de metionina em papel filtro. Em países com maior prevalência de HC, este teste é realizado em programas de triagem neonatal. Após a implementação destes programas, observou-se que um grande percentual falsos-negativos (até 50%) era obtido por este método, sendo perdidos, em sua maioria, os casos de HC responsivos à piridoxina (NAUGHTEN et al., 1998; REFSUM et al., 2004; SOKOLOVÁ et al., 2001). Isto sugeriu que apenas as formas mais graves da doença cursavam com hipermetioninemia importante nos primeiros dias de vida. Além disso, por a metionina não ser o metabólito envolvido diretamente na deficiência de C $\beta$ S, sua taxa de elevação poderia ser mais lenta. Na Inglaterra, a redução pela metade do ponto de corte da

metionina (de 2 para 1mg/dL) aumentou em 1,8 vezes a taxa de detecção de HC (PETERSCHMITT et al., 1999).

Mais recentemente, novos métodos de triagem neonatal para HC, como a determinação de homocisteína total por HPLC e a busca por mutações comuns, têm apresentado melhor sensibilidade para a detecção de HC (ACCINNI et al., 2003; GAN-SCHREIER et al., 2010; REFSUM et al., 2004). O diagnóstico no período neonatal permite que o tratamento seja iniciado precocemente, prevenindo o surgimento das complicações. No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal não abrange o diagnóstico de HC.

Após a confirmação do diagnóstico de HC, é importante a determinação da responsividade à piridoxina. Diversos protocolos para testar a responsividade têm sido propostos. Em geral, sugere-se teste com piridoxina oral de 100-500mg/dia (para bebês, no máximo 300mg/dia), sendo considerados responsivos os pacientes que atingirem os níveis alvo de homocisteína (WALTER et al., 1998; MUDD et al., 2001; PICKER e LEVY, 2011).

### **3.1.6 Manifestações clínicas**

A HC é uma doença multissistêmica, de início lento e caráter progressivo. Os sinais clínicos da doença envolvem principalmente quatro sistemas: ocular, vascular, nervoso central e ósseo (MUDD et al., 1985). Abaixo são descritas as principais anormalidades presentes em cada um destes sistemas.

#### **3.1.6.1 Sistema Ocular**

A luxação de cristalino (*ectopia lentis*) é provavelmente o achado mais consistente da HC, apresentando-se nos estágios iniciais da vida e presente na grande maioria dos pacientes não-tratados. No levantamento realizado por Mudd e colaboradores (1985), esta característica clínica contribuiu para a investigação de HC em 85% dos casos.

A iridodonesis, movimento anormal da íris semelhante a um tremor, é um sinal freqüente do deslocamento das lentes. O deslocamento é bilateral e geralmente na direção inferior. Em pacientes não tratados, após os dois anos de idade taxas crescentes de luxação de

crystalino começaram a ser detectadas, mas com diferente progressão entre pacientes responsivos e não-responsivos à piridoxina. Entre os primeiros, 50% apresentavam luxação aos 10 anos, enquanto que entre os não-responsivos 50% apresentavam luxação aos 6 anos. A presença de miopia é freqüente e pode preceder luxação de cristalino. Também podem ocorrer glaucoma, desprendimento e degeneração da retina, catarata e atrofia do nervo óptico (MUDD et al., 1985; PICO e BERMUDEZ, 2006; BURKE et al., 1989; MUDD et al., 2001).

#### 3.1.6.2 Sistema Vascular

A doença vascular é freqüente e a principal causa de morbimortalidade, sendo o tromboembolismo a principal complicação (WILCKEN e WILCKEN, 1997). Oclusões vasculares podem ocorrer em qualquer veia e em qualquer idade. Quando não tratados, as chances de um paciente com HC sofrer algum evento tromboembólico aos 16 anos é de 25%, enquanto aos 29 anos aumenta para 50% (MUDD et al., 1985). Situações específicas como gravidez, pós-parto ou pós-operatórios aumentam este risco (MUDD et al., 2001).

Embora isoladamente esta manifestação clínica contribua para a investigação de HC em apenas 1% dos pacientes, a apresentação isolada da doença vascular pode ser mais freqüente do que o imaginado. Estudos têm demonstrado que grande parte dos homozigotos para a freqüente mutação p.I278T são clinicamente normais durante a infância e a adolescência, podendo apresentar como única manifestação da HC eventos tromboembólicos a partir da terceira década de vida (SKOVBY et al., 2010; MAGNER et al., 2011).

A associação com outros genótipos associados a alto risco cardiovascular, como mutações no Fator V (Fator V de Leiden) e na MTHFR também parece aumentar o risco de trombose em pacientes com HC (MANDEL et al., 1996; ANDRIA et al., 2006).

#### 3.1.6.3 Sistema Nervoso Central

A anormalidade do sistema nervoso central mais freqüente é o retardo mental, geralmente presente como atraso de desenvolvimento nos primeiros anos de vida. Há uma grande variabilidade nos escores de QI (de 10 a 138 pontos), e, em geral, os pacientes responsivos à piridoxina têm maiores escores de QI. Os acidentes vasculares cerebrais recidivos também influenciam o quadro clínico, podendo gerar sinais focais.



Convulsões ocorrem em aproximadamente 20% dos pacientes, e sinais extrapiramidais como distonia podem estar presentes. Distúrbios psiquiátricos também são comuns, e incluem distúrbios de personalidade, ansiedade, depressão, comportamento obsessivo-compulsivo e episódios psicóticos (PICO e BERMÚDEZ, 2006; MUDD et al., 2001; PICKER e LEVY, 2011).

#### 3.1.6.4 Sistema Ósseo

A principal complicação óssea é a osteoporose, mais comumente localizada na coluna vertebral e nos ossos longos. Pelo menos 50% dos pacientes não-tratados desenvolvem osteoporose até o fim da segunda década de vida (MUDD et al., 1985).

Outras manifestações ósseas incluem: escoliose, dolicoxenomia, alta estatura, aracnodactilia, *genu valgum*, *pectus excavatum* ou *carinatum*, etc. Um dos achados ósseos mais frequentes é o alargamento das metáfises e epífises dos ossos longos, facilmente detectado nos joelhos (BRENTON, 1977; PICO e BERMÚDEZ, 2006). Com exceção da osteoporose, estas manifestações ósseas e a luxação de cristalino também são observadas na síndrome de Marfan, doença genética do tecido conjuntivo. Por isso, é dito que pacientes com HC possuem um “fenótipo marfanóide”.

#### 3.1.6.5 Outros Sistemas

Manifestações dermatológicas como a hipopigmentação de pele e cabelos, *malar flush* e livedo reticularis também podem ocorrer na HC (PICKER e LEVY, 2011; REISH et al., 1995). Embora menos frequentes, complicações gastrointestinais como pancreatite aguda e diarreia crônica também já foram descritas (MAKINS et al., 2000; ILAN et al., 1993).

### 3.1.7 Fisiopatologia

O conhecimento acerca da fisiopatologia da deficiência de CβS ainda é escasso; nenhum mecanismo isolado explica as manifestações clínicas e a variabilidade fenotípica observada na HC. A elevação da homocisteína parece ser responsável pelas principais manifestações da doença, visto que já foi comprovado seu efeito tóxico sobre todos os tecidos afetados na HC.

Diversos mecanismos pelo qual a homocisteína predispõe ao dano vascular já foram descritos. Altos níveis de homocisteína podem causar dano devido a sua toxicidade sobre o endotélio dos vasos, através da produção de alterações nos fatores de coagulação, aumento da adesão plaquetária e da proliferação de células do músculo liso (STEHOUWER e JAKOBS, 1998; MUDD et al., 2001, YAP, 2003).

Evidências sugerem que homocisteína-tiolactona, um metabólito da homocisteína, possa contribuir para vários efeitos deletérios que levam à aterosclerose. A homocisteína-tiolactona medeia a incorporação de homocisteína a diversas proteínas, incluindo o fibrinogênio, a albumina, hemoglobina, HDL, LDL, transferrina e a  $\alpha$ -1-antitripsina. A incorporação de homocisteína pode resultar na formação de agregados protéicos, como já descrito na molécula de LDL, o que induz a apoptose de células endoteliais. Além disso, pode gerar novos auto-antígenos, desencadeando uma resposta auto-imune que contribui para o dano vascular (MUDD, 2011).

Sob certas condições, a oxidação da homocisteína pode gerar espécies reativas de oxigênio. A maioria das moléculas que contém grupos tióis pode se auto-oxidar na presença de metais catalíticos de transição e moléculas de oxigênio, levando à formação de espécies reativas de oxigênio. Por possuir um grupamento tiol, a homocisteína pode sofrer processo similar e gerar espécies reativas como o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido ou o radical hidroxil. Em situações normais, apenas 1 a 2% da homocisteína está na forma tiol, enquanto na homocistinúria este percentual pode chegar de 10 a 25% (MUDD et al., 2000). A formação destas espécies pode levar à lipoperoxidação, a qual inicia uma resposta inflamatória e está envolvida no processo de lesão aterosclerótica (MUDD et al., 2001).

Estudo de Davì et al. (2001) encontrou aumento na lipoperoxidação em um grupo de pacientes com HC, o que foi associado com a ativação persistente de plaquetas. Em outro trabalho, aumento na lipoperoxidação e redução da capacidade antioxidante foram encontrados em pacientes com HC (VANZIN et al., 2011). Entretanto, em outro estudo semelhante, pacientes com HC não apresentaram aumento da oxidação de lipoproteínas no plasma (CÓRDOBA-PORRAS et al., 1996).

Alterações na molécula de fibrilina e nas moléculas de colágeno parecem estar envolvidas na fisiopatologia das complicações ósseas. Modelos animais de hiperhomocisteinemia demonstraram maior crescimento radial e longitudinal dos ossos, com ossificação mais avançada das epífises, demonstrando efeito direto da homocisteína no tecido ósseo (MASSÉ et al., 2003).

A homocisteína parece interferir no entrecruzamento da molécula de colágeno, impedindo a síntese de ligações mais complexas na maturação do colágeno. Aumento da solubilidade do colágeno da pele, sugerindo entrecruzamento prejudicado, já foi descrita em pacientes com HC (MUDD et al., 2001).

A fibrilina, molécula deficiente na síndrome de Marfan, pertence a uma família de proteínas de matriz extracelular e é essencial para a formação das fibras elásticas no tecido conjuntivo. A incorporação de homocisteína na molécula de fibrilina reduz significativamente sua propriedade de auto-interação *in vitro*, podendo interferir na síntese das microfibrilas. A deficiência de cisteína também parece ter papel importante na disfunção da fibrilina, já que esta é uma molécula rica em resíduos de cisteína (~14%) que formam ligações dissulfeto. Grande parte das mutações responsáveis pela síndrome de Marfan gera ou abole cisteína destes domínios, levando à formação de resíduos de cisteína não pareados (HUBMACHER et al., 2010).

Assim como nas manifestações ósseas, alterações na fibrilina parecem ser responsáveis também pelas complicações oculares. A ruptura ou anormalidade na estrutura da fibrilina pode explicar a degeneração das fibras zonulares observadas em pacientes com HC. Estas zônulas são estruturas que sustentam as lentes suspensas do corpo ciliar, e são formadas exclusivamente por microfibrilas elásticas, sendo a fibrilina-1 o principal componente destas microfibrilas. Tanto a deficiência de cisteína quanto a incorporação de homocisteína à fibrilina poderia prejudicar a formação das microfibrilas (KRUMDIECK e PRINCE, 2000; MUDD et al., 2001).

Postula-se que o dano ao sistema nervoso central possa ser causado por defeitos de mielinização, hipometilação de proteínas de mielina e neurotransmissores e também pelo déficit de cistationina. Experimentos *in vitro* demonstraram que a homocisteína e a metionina ativam a acetilcolinesterase, enzima participante da hidrólise da acetilcolina. As convulsões observadas na HC poderiam ser resultado da ação desta enzima, que quando superativada pode gerar hiperexcitabilidade no sistema nervoso central (SCHULPIS et al., 2006). Além disso, a homocisteína e a metionina parecem comprometer diretamente o metabolismo energético cerebral, reduzindo a atividade do ciclo de Krebs e aumentando a glicólise anaeróbica (STRECK et al., 2003).

A elevação da homocisteína prejudica também a atividade da tirosinase, principal enzima da rota de síntese da melanina. A redução da atividade desta enzima é responsável

pela hipopigmentação observada em pacientes com HC, e o tratamento com redução dos níveis de homocisteína reverte este efeito (REISH et al., 1995).

A hipometilação de DNA também foi investigada como mecanismo fisiopatológico na HC. A hiperhomocisteinemia causa elevação da AdoHcy, que inibe as reações de metilação catalisadas pela AdoMet. Estudos animais demonstram que a deficiência de C $\beta$ S é associada com alterações na metilação, mas estudo em pacientes com HC tratados não foi encontrado prejuízo na metilação (HEIL et al., 2007).

### 3.1.8 Tratamento

O principal objetivo do tratamento da HC é a redução nos níveis de homocisteína. Para isto, três estratégias podem ser utilizadas: a estimulação da atividade residual da C $\beta$ S, a redução da sobrecarga de metionina e o aumento da remetilação de homocisteína a metionina. Além da redução de homocisteína, o tratamento deve corrigir a deficiência de cisteína quando presente e garantir o crescimento e desenvolvimento adequados.

Não está bem estabelecido qual o nível ótimo de homocisteína capaz de prevenir o surgimento ou avanço das complicações. Estudos observacionais sugerem que níveis de homocistina <11 $\mu$ mol/L ou níveis de homocisteína total <20 $\mu$ mol/L em pacientes responsivos à piridoxina e <60 $\mu$ mol/L em não responsivos são associados a melhores desfechos (WILCKEN, 2006; YAP et al., 2001; ACOSTA e YANNICELLI, 2001). As principais estratégias de tratamento são descritas a seguir.

#### 3.1.8.1 Piridoxina

A enzima C $\beta$ S utiliza como cofator o piridoxal fosfato, forma ativa da vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina). A piridoxina atua aumentando a atividade residual da enzima, o que ocasiona redução da concentração de homocisteína e metionina e aumento de cisteína (MUDD et al., 1970). A dose utilizada é variável; em geral admite-se que doses de 200mg/dia ou menos estão associadas a uma melhor resposta bioquímica, mas até 1000mg/dia podem ser utilizados em adultos (PICKER e LEVY, 2011). Embora efeitos adversos sejam raros, doses >400mg/dia podem ocasionar neuropatia periférica (WILCKEN, 2006).

Devido à grande diversidade de mutações no gene *CβS*, a resposta à suplementação é variável: aproximadamente 50% dos pacientes com HC apresentam algum nível de responsividade à vitamina B<sub>6</sub> (MUDD et al., 2001). Em geral, pacientes não-responsivos desenvolvem a forma mais grave da doença, apresentando complicações mais precocemente e maior mortalidade. (MUDD et al., 1985). Antes de iniciar o tratamento, é recomendado realizar um teste de desafio de piridoxina para determinação da responsividade.

Ainda que a piridoxina possa reduzir substancialmente os níveis de homocisteína, muitos pacientes necessitarão da adição de outras estratégias para atingir o alvo terapêutico.

### 3.1.8.2 Folato

Recomenda-se que o ácido fólico seja adicionado ao tratamento porque a resposta à B<sub>6</sub> é influenciada pela depleção de folato, que pode ocorrer pela própria administração da piridoxina (PICO e BERMÚDEZ, 2006). Além disso, acredita-se que os requerimentos de folato sejam maiores nos pacientes com deficiência de CβS devido a um aumento do fluxo pela rota de remetilação. Assim, uma dose de 5 mg/dia de ácido fólico deve ser adicionada ao tratamento (WALTER et al., 1998).

### 3.1.8.3 Restrição Dietética de Metionina

Pouco tempo após as primeiras descrições da doença, relatos de melhora do controle metabólico e prevenção de complicações relacionadas à HC através da restrição dietética de metionina surgiram (KOMROWER et al., 1966).

A restrição dietética de metionina é feita através da limitação do aporte de proteínas naturais. Para atingir as necessidades protéicas diárias utiliza-se um suplemento de aminoácidos (também chamado fórmula metabólica) isento de metionina e suplementado com cisteína, vitaminas, minerais e elementos-traço. Além disso, um aporte energético adequado é fundamental para evitar o catabolismo protéico e promover um crescimento e desenvolvimento adequados (FRANGIPANI et al., 2006; PONS et al., 2004).

A quantidade de metionina prescrita na dieta dependerá da tolerância de cada paciente e também deve ser individualizada por faixa etária e sexo, podendo variar de 4-30mg/kg/dia. O monitoramento da dieta deve ser cuidadoso, pois a deficiência de metionina pode causar alterações no *pool* plasmático de diversos aminoácidos (redução de metionina, aumento de

fenilalanina, prolina, serina, treonina e tirosina), além de redução da concentração plasmática de colesterol e desnutrição (ACOSTA e YANNICELLI, 2001).

A prescrição de proteína também merece atenção especial. Recomenda-se que a ingestão protéica seja maior do que as recomendações para a população saudável, uma vez que a fonte protéica desta dieta possui diferentes padrões de absorção e utilização. Além da proteína natural da dieta caracterizar-se por um baixo valor biológico, por ser primariamente de origem vegetal; o suplemento de aminoácidos apresenta absorção e catabolismo rápidos, diminuindo seu aproveitamento (FRANGIPANI et al., 2006; ACOSTA e YANNICELLI, 2001).

A má adesão à dieta é comum, principalmente em pacientes com diagnóstico tardio, uma vez que exige uma mudança drástica nos hábitos alimentares. Além disso, devido à baixa palatabilidade, a ingestão insuficiente do suplemento de aminoácidos também é freqüente. Nesta situação, os níveis de homocisteína podem elevar-se rapidamente e o crescimento pode ficar prejudicado pela ingestão protéica inadequada (WALTER et al., 1998). Embora o uso de fórmula metabólica seja indicado a pacientes não-responsivos, uma restrição protéica moderada é recomendada para todos os pacientes (WILCKEN, 2006).

#### 3.1.8.4 Betaína

A betaína atua como um doador de grupos metil induzindo a remetilação de homocisteína a metionina através da enzima BHMT. A ingestão de 6-9g de betaína ao dia pode reduzir em mais de 70% os níveis de homocisteína, e é acompanhada por um aumento importante da concentração de metionina. Seu uso em longo prazo foi associado à grande redução do risco vascular, mas parece ter pouco ou nenhum benefício nas manifestações ósseas.

Em geral, seu uso é considerado seguro, mas alguns casos de edema cerebral durante a terapia com betaína já foram descritos. Nestes casos, os pacientes apresentaram níveis muito elevados de metionina. Assim, recomenda-se que quando as concentrações plasmáticas de metionina estiverem acima de 1000 $\mu$ mol/L, o uso de betaína seja suspenso imediatamente. Além disso, a inalação acidental da vitamina em pó pode causar sérios problemas pulmonares (WALTER et al., 1998; LAWSON-YUEN e LEVY, 2006; WILCKEN, 2006).

### 3.1.8.5 Outras opções terapêuticas

Para a prevenção de complicações vasculares, o uso de agentes antitrombóticos (como o ácido acetil-salicílico) pode ser benéfico. Também foi demonstrado que a suplementação de vitamina C atenua a disfunção endotelial, podendo reduzir o risco, em longo prazo, de complicações aterotrombóticas (ANDRIA et al., 2006).

Uma nova alternativa terapêutica em desenvolvimento é o uso de chaperonas, moléculas de pequeno peso molecular que protegem proteínas de várias condições desnaturantes. Uma vez que o enovelamento anormal da C $\beta$ S é um importante mecanismo patogênico na HC (KOZICH et al., 2010), o uso de chaperonas é capaz de aumentar significativamente a atividade enzimática. Estudos *in vitro* têm mostrado resultados promissores (MAJTAN et al., 2010; KOPECKÁ et al., 2011).

Os benefícios do tratamento, associado ou não a um bom controle metabólico, estão bem descritos na literatura. Se uma boa adesão terapêutica e bom controle metabólico são mantidos ao longo da vida, o tratamento no período neonatal é capaz de prevenir todas as complicações da HC (YAP e NAUGHTEN, 1998; MUDD et al., 1985; RUSHE et al., 2001).

Em pacientes com diagnóstico tardio, a terapia em longo prazo é efetiva na redução do risco vascular, mesmo que o controle bioquímico seja imperfeito (WILCKEN e WILCKEN, 1997; YAP, 2003). Em um grande estudo observacional multicêntrico, Yap e colaboradores (2001) demonstraram uma grande redução no risco vascular em pacientes tratados, embora os níveis de homocisteína tenham se mantido moderadamente elevados. Em pacientes não responsivos, os níveis foram 3-5 vezes maiores do que o observado na população em geral. Com base nestes dados, os autores sugerem que as modalidades terapêuticas utilizadas exerçam outros efeitos protetores nos vasos que não relacionados somente à redução da homocisteína. No que diz respeito às outras manifestações clínicas, há poucas descrições sobre o efeito do tratamento, embora benefício tenha sido descrito em alguns trabalhos (MUDD et al., 1985; YAP e NAUGHTEN, 1998).

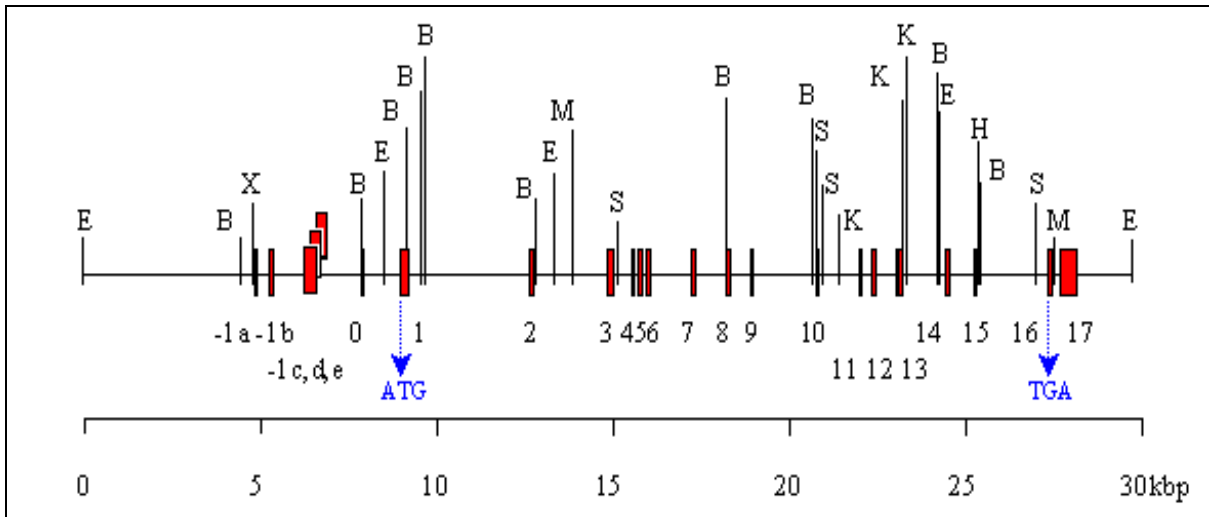
### 3.1.9 Aspectos genéticos

O gene que codifica a enzima C $\beta$ S humana localiza-se no braço longo do cromossomo 21 (21q22.3). A sequência completa do gene foi descrita em 1998 por Kraus e colaboradores. Um total de 28.046 nucleotídeos compõe o gene, e um adicional de 5kpb forma a sequência flanqueadora. Os éxons que compõem a região codificante possuem entre 42-209pb, e o tamanho dos íntrons do gene varia de 95 a 3367pb. Ao todo, o gene é composto por 23 éxons, sendo a região codificadora composta pelos éxons 1-16. Esta região codifica uma polipeptídeo de 551 aminoácidos (KRAUS et al., 1998). A organização completa do gene da C $\beta$ S humana é demonstrada na Figura 3.

A região 5'-UTR do mRNA da C $\beta$ S humana é formada por um de cinco éxons alternativos, denominados -1a a -1e; mais o éxon 0, invariavelmente presente. A região 3'-UTR é composta por parte do éxon 16 e pelo éxon 17. O éxon 15 codifica 14 aminoácidos e sofre *splicing* alternativo, sendo incorporado em poucas moléculas humanas maduras de mRNA. Em estudos de expressão, demonstrou-se que a presença ou ausência do éxon 15 não altera a atividade catalítica da C $\beta$ S. Além disso, sua presença não foi detectada em nenhum tecido humano avaliado até hoje, sendo sua significância biológica desconhecida (KRAUS et al., 1998, KRAUS, 2011).

Existem pelo menos dois promotores utilizados alternativamente no gene *C $\beta$ S* humana. Eles estão localizados acima dos éxons -1a e -1b, são ricos em CG (~80%), e contém diversos sítios de ligação para a Sp1, Ap1, Ap2 e c-myb, mas ausência do clássico TATA *box* (KRAUS, 2011).





**Figura 3. Organização do gene da C $\beta$ S humana.** Todos os éxons, incluindo os éxons utilizados alternativamente (-1a, b, c, d, e, e 15) são representados por caixas vermelhas. O início e o fim da região codificadora são indicados pelos códon ATG e TGA. (KRAUS, 2011).

### 3.1.9.1 Mutações no gene *C $\beta$ S*

Até o momento, 164 mutações em 925 alelos no gene *C $\beta$ S* já foram descritas (KRAUS et al., 2011). Em relação ao tipo, a grande maioria são mutações *missense* (n=790, 85,4%), seguido por deleções (n=77, 8,3%), mutações sem sentido (n=30, 3,2%), mutação em sítio de *splicing* (n=12, 1,3%), e outros tipos (n=6, 0,6%).

Mutações no gene *C $\beta$ S* podem alterar a estabilidade ou atividade da enzima ou do mRNA, a ligação do piridoxal fosfato ou do grupamento heme, ou prejudicar a regulação alostérica (MILES E KRAUS, 2004). Em especial, o enovelamento anormal da proteína (*misfolding*) parece ser um mecanismo patogênico importante; é descrito um decréscimo de mais de 50% na formação de tetrâmeros na presença de diversas mutações. Estas proteínas mutantes são propensas a formar agregados de alto peso molecular e corpos de inclusão. Mutações no interior da enzima parecem exercer efeitos mais deletérios no enovelamento da enzima do que aquelas acessíveis ao solvente (KOZICH et al., 2010).

Embora grande parte das mutações seja de origem privada, três delas correspondem a quase metade dos alelos descritos, e são descritas em detalhes abaixo.

***p.I278T (c.833T>C)***

Localizada no éxon 8, foi detectada em 153 alelos (~ 16,5%) (KRAUS, 2011). Trata-se de uma mutação *missense*, onde a substituição de uma timina por uma citosina na posição 833 gera a troca de uma isoleucina por treonina a nível protéico. É pan-étnica, presente na maioria das populações europeias (SHIH et al., 1995; SEBASTIO et al., 1995; SPERANDEO et al., 1995; JANOSIK et al., 2001; KOZICH e KRAUS, 1992; KRAUS, 2011). Na Holanda, é responsável por metade dos alelos mutados (KLUIJTMANS et al., 1999). Também já foi descrita na Austrália, Argentina, Estados Unidos e Israel (KRUGER et al., 2003; COZAR et al., 2011; TSAI et al., 1996a; GAT-YABLONSKY et al., 2000). Em pacientes brasileiros, foi detectada em 6/28 alelos. Considerando-se apenas pacientes não-relacionados, isto equivale a um frequência de 13,64% (PORTO et al., 2005).

A mutação localiza-se no núcleo ativo da enzima, e não está exposta ao solvente. A C $\beta$ S mutante retém aproximadamente 2% da atividade da enzima selvagem. Estudos *in vitro* demonstraram que a enzima mutante não é ativada pela AdoMet na mesma extensão que o alelo selvagem (KOZICH et al., 2010). A substituição da hidrofóbica isoleucina por um aminoácido mais hidrofílico, a treonina, poderia alterar a conformação da C $\beta$ S ou a interação das subunidades, resultando em uma enzima instável (SHIH et al., 1995). Avaliando a conservação evolutiva da sequência da C $\beta$ S, observa-se que este resíduo de isoleucina é altamente conservado entre as espécies (KRAUS, 1994).

Usualmente está associada com responsividade à piridoxina, tanto em homozigotos como em heterozigotos compostos, e confere fenótipos mais atenuados (MUDD et al., 2001).

***p.T191M (c.572C>T)***

Detectada em 149 alelos (~ 16,1%) (KRAUS, 2011). Localizada no éxon 5, é uma mutação *missense*, onde a troca de uma citosina por timina na posição 572 resulta na substituição do aminoácido treonina por metionina. Esta mutação é detectada principalmente em países da península ibérica (Portugal e Espanha) e América do Sul (Venezuela, Colômbia, Argentina e Brasil). As maiores frequências foram encontradas na Colômbia (75% dos alelos mutados) e Espanha (52% dos alelos mutados) (BERMUDEZ et al., 2006; URREIZTI et al.,

2003; URREIZTI et al., 2006; DE LUCCA e CASIQUE, 2004; COZAR et al., 2011). No Brasil, foi detectada 3/28 alelos (13,64%) (PORTO et al., 2005).

Também localizada no núcleo ativo da enzima, esta mutação está exposta ao solvente e retém cerca de 1% da atividade normal da C $\beta$ S. *In vitro*, a enzima mutante parece ser inibida tanto pela AdoHcy quanto pela AdoMet (KOZICH et al., 2010).

Uma grande variabilidade fenotípica tem sido descrita, manifestações leves a graves podem ser encontradas. As principais características comuns associadas à homozigose para a mutação são a baixa prevalência de complicações vasculares e a não responsividade à piridoxina (URREIZTI et al., 2006).

#### ***p.G307S (c.919G>A)***

Localizada no éxon 8, já foi detectada em 88 alelos (~ 9,5%) (KRAUS, 2011). A troca de uma guanina por uma adenina na posição 919 resulta na substituição de uma glicina por uma serina. É frequentemente encontrada em grupos de origem céltica, sendo responsável por 71% dos alelos mutados em pacientes irlandeses (GALLAGHER et al., 1995; GALLAGHER et al., 1998). Já foi descrita em diversas populações européias e norte-americanas, mas em nenhum país latino-americano, incluindo o Brasil (KOZICH et al., 1997; KRUGER et al., 2003; DE FRANCHIS et al., 1999; KIM et al., 1997; HU et al., 1993; TSAI et al., 1996; GAUSTADNES et al., 2002; PORTO et al., 2005; KRAUS, 2011).

A mutação retém uma atividade residual da enzima de ~1%, e também parece acarretar prejuízo na ativação pela AdoMet. Localiza-se no sítio ativo da enzima, e não está exposta ao solvente (KOZICH et al., 2010). Sabe-se que este resíduo de glicina mutado também é altamente conservado entre as espécies (KRAUS, 1994).

Geralmente está associada a fenótipos moderados e graves e não confere responsividade à piridoxina (MUDD et al., 2001).

### 3.1.9.2 Polimorfismos no gene *CβS*

São conhecidos 14 polimorfismos no gene *CβS*, sendo a maioria deles SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Um dos mais comuns é o c.844ins68; uma inserção de 68pb localizada entre o íntron 7 e o éxon 8 (53pb na região 3' do íntron 7 e 15pb na região 5' do éxon 8), que parece criar um sítio alternativo de *splicing*. Em todos os alelos descritos esta variante foi encontrada associada à mutação c.833T>C (p.I278T) em *cis*. Nesta associação, o *splicing* alternativo não apenas a remove a sequência intrônica da inserção como também a mutação c.833T>C. O resultado final é a geração de mRNA e enzima com atividade normal.

Foi proposto que a inserção possa resultar de um *crossing-over* desigual entre o alelo selvagem e o portador da mutação patogênica. No entanto, um estudo baseado em haplótipos concluiu que os cromossomos que carregam a variante c.[833T>C; 844ins68] parecem ser a fonte da mutação patogênica c.[833T>C;-]. Os mecanismos propostos para esta transformação foram: recombinação meiótica, formação de *loop* com posterior excisão ou conversão gênica (VYLETAL et al., 2007)

Alguns autores postularam que a presença deste polimorfismo aumenta a atividade da *CβS*, enquanto que outros trabalhos sugerem que RNA mutado seja instável e degradado no núcleo (SPERANDEO et al., 1996; CHASSÉ e BAROUKI, 2009; KLUIJTMANS et al., 1997; TSAI et al., 1996).

O papel desta variante como fator de risco isolado para doença vascular já foi estudado, com resultados controversos. No estudo brasileiro de Bonini-Domingos et al. (2005), a frequência do polimorfismo foi maior nos pacientes com trombose venosa profunda. Já em estudo semelhante de Kluijtmans et al. (1997), esta associação não foi encontrada.

Em crianças brasileiras saudáveis, a prevalência deste polimorfismo em heterozigose foi de 19,5% (ALÉSSIO et al., 2008). Em pacientes brasileiros com HC, o polimorfismo c.844ins68 foi detectado em 1/28 alelos avaliados (3,5%) (PORTO et al., 2005).

### 3.1.9.3 Polimorfismos no gene *MTHFR*

O gene *MTHFR* está localizado no braço longo do cromossomo 1, e codifica a 5-metilenotetrahidrofolato redutase, enzima essencial para o metabolismo do folato e da homocisteína. Diversos polimorfismos associados à hiperhomocisteinemia já foram descritos, sendo os mais prevalentes o c.677C>T e o c.1298A>C.

O polimorfismo mais estudado é o SNP c.677C>T, que torna a enzima termolábil. A troca de nucleotídeo resulta, a nível protéico, na substituição de uma alanina por valina, o que leva à redução de até 30% da atividade enzimática em heterozigotos (CT) e 60% em homozigotos (TT). Em indivíduos normais, esta redução na atividade enzimática é acompanhada por hiperhomocisteinemia leve a moderada, que pode ser revertida por um maior aporte de ácido fólico (MIYAKE, 2010). No Brasil, estudo de Arruda et al. (1998) encontrou alta prevalência de homozigose para este polimorfismo entre descendentes de caucasianos (10%) e baixa entre afro-descendentes (1,45%) e indígenas (1,2%). Em outro estudo com crianças brasileiras, a taxa de homozigose foi de 10% e a de heterozigose de aproximadamente 40% (ALÉSSIO et al., 2008). No mundo, a prevalência do genótipo TT varia de 2-40% (WILCKEN et al., 2003).

A presença deste polimorfismo aumenta o risco de desenvolvimento de acidente vascular cerebral em adultos jovens e de doença arterial coronariana (KLERK et al., 2002; XIN et al., 2009). Também têm sido associado a defeitos congênitos, diversos tipos de câncer e doenças psiquiátricas (BANDEIRA, 2011; WILCKEN et al., 2003).

O segundo polimorfismo (c.1298A>C) resulta na substituição de um glutamato por alanina, e parece afetar as propriedades regulatórias da enzima. A prevalência de homozigose para esta variante varia de 5-10%. Homozigotos apresentam redução de aproximadamente 40% da atividade enzimática, mas esta redução é insuficiente para alterar os níveis de homocisteína; e a presença da variante parece ter pouca relação com os níveis de ácido fólico. Apesar disto, é associada com doença arterial coronariana precoce, independentemente dos níveis de homocisteína (SZCZEKLIK et al., 2001; WEISBERG et al., 2001; PEREZ et al., 2003).

A presença de ambos os polimorfismos (c.677C>T e c.1298A>C) em heterozigose acentua a redução da atividade enzimática (50-60% dos controles) e resulta em maiores níveis

de homocisteína quando comparado à presença de apenas um polimorfismo (WEISBERG et al., 2001).

Poucos estudos avaliaram a prevalência destes polimorfismos em pacientes com HC. A presença da variante c.677C>T foi descrita em seis trabalhos, e os resultados são sumarizados na Tabela 1. Foi encontrada ampla diferença da frequência dos genótipos entre os países. O polimorfismo c.1298A>C foi avaliado apenas por Porto et al. (2005), em pacientes brasileiros. Neste estudo, 4/14 pacientes eram heterozigotos AC (28,6%) e apenas um homozigoto TT (7%). O impacto da associação destes polimorfismos com as mutações patogênicas na CβS sobre os níveis de homocisteína ainda não é conhecido.

**Tabela 1.** Prevalências dos genótipos do polimorfismo c.677C>T do gene *MTHFR* em pacientes com homocistinúria por deficiência de CβS.

<i>Referência</i>	<i>País de origem dos pacientes</i>	<i>MTHFR c.677C&gt;T; %(n)</i>		
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
Gaustadnes et al., 2002	Austrália	33,3(12)	58,3(21)	8,3(3)
Cozar et al., 2011	Espanha, Portugal e Argentina	16,6(4)	58,3(14)	20,8(5)
De Lucca e Casique, 2004	Venezuela	57,1(4)	42,9(3)	0
Gat-Yablonski et al., 2000	Israel	62,5(5)	12,5(1)	25(2)
Urreizti et al., 2003	Espanha e Portugal	35,3(6)	35,3(6)	29,4(5)
Porto et al., 2005	Brasil	50(7)	21,4(3)	28,6(4)

#### 3.1.9.4 Mutação p.R506Q no gene *F5*

O gene *F5* é responsável pela codificação do Fator V, importante cofator para ativação da trombina. Uma substituição de G por A no nucleotídeo 1691 resulta na troca de uma arginina por uma glutamina (p.R506Q) e é denominada de mutação de Leiden. Esta mutação é o mais importante fator de risco genético para trombose venosa, e têm por consequência baixa resposta anticoagulante à proteína C ativada. A presença do Fator V de Leiden aumenta o risco de eventos tromboembólicos de 3-8 vezes em heterozigotos e de 9-80 vezes em homozigotos. Trombose venosa profunda (TVP) é a forma mais frequente de

tromboembolismo, sendo os membros inferiores o sítio mais comum (KUJOVICH, 2010; GODOY, 2005).

Na população em geral, a frequência de heterozigose varia de 3-8%, enquanto que a homozigose é de aproximadamente 1:5000 (KUJOVICH, 2010) Em pacientes com HC, estudos indicam que o risco de eventos tromboembólicos é ainda maior nos portadores da mutação de Leiden, embora a coexistência destas situações não seja determinante para a ocorrência de um evento vascular (MANDEL et al., 1996; KLUIJTMANS et al., 1998).

### **3.1.10 Estado nutricional e composição corporal**

Alterações das proporções corporais são comuns em pacientes com HC, e constituem o chamado “fenótipo marfanóide”. As principais alterações descritas são alta estatura e dolicostenomelia; biótipo magro também é descrito em alguns estudos. Até o momento, acredita-se que estas alterações sejam consequência principalmente das anomalias ósseas, como o alargamento das metáfises e epífises dos ossos longos (BRENTON, 1977).

A presença de alta estatura é frequente. Em estudo realizado por Brenton et al. (1972), cerca de 60% dos pacientes apresentavam percentil superior a 80 para estatura, e apenas 4/22 estavam abaixo do percentil 50. Há evidências de que a homocisteína ou seus derivados, como o ácido homocistéico, são capazes de promover a aceleração do crescimento. Topaloglu et al. (2001) demonstraram que existe associação direta entre níveis plasmáticos de homocisteína e escores de velocidade de crescimento e estatura entre pacientes com HC. Neste estudo, pacientes com controle metabólico ótimo tiveram taxas de velocidade de crescimento significativamente menores do que aqueles com controle metabólico inadequado.

Recentemente, estudos vêm demonstrando que o metabolismo alterado da homocisteína pode gerar também alterações na composição corporal. Elshorbagy et al. (2008) estudaram a associação entre os níveis plasmáticos de cisteína e o percentual de gordura corporal em uma população de mais de 5000 indivíduos saudáveis de meia idade e idosos. Os autores encontraram uma forte associação linear positiva entre os níveis de cisteína e a quantidade de gordura corporal ( $p < 0,001$ ), independente da dieta, exercício ou níveis de lipídeos plasmáticos. Em pacientes com HC, este efeito seria ainda maior, já que a deficiência

de CβS pode provocar redução significativa na concentração plasmática de cisteína (LEE e BRIDDON, 2007).

Apesar de largamente descrito, o “biótipo magro” nunca foi adequadamente estudado na HC. A única descrição relativa à composição corporal foi feita por Gibson et al. em 1964. Neste estudo, os autores descrevem achados de necropsia de um paciente com HC, relatando pouca quantidade de gordura subcutânea, especialmente nos membros inferiores.

Em estudo inédito, Gupta e Kruger (2011) demonstraram que ratos com deficiência de CβS apresentam cerca de 50% de redução de massa adiposa quando comparados a animais controles. Este decréscimo foi associado com redução significativa da expressão da proteína hepática *Scd-1*, uma enzima lipogênica chave para a síntese de ácidos graxos monoinsaturados.

Se efeito semelhante ocorrer em humanos com HC, é possível que esta redução extrema no teor de gordura corporal tenha implicações clínicas, já que este tecido exerce diversas funções metabólicas e estruturais essenciais. Entre estas funções, cabe destacar a estreita relação entre massa adiposa e massa óssea (KERSHAW e FLIER, 2004; REID, 2008).

A avaliação da composição corporal pode ser realizada por diferentes métodos, sendo que a maioria deles utiliza o modelo clássico de dois compartimentos, dividindo o peso corporal em massa gorda e massa livre de gordura. Os métodos de avaliação podem ser divididos em quatro categorias:

- 1) Antropometria: compreende medidas de peso, altura e dobras cutâneas;
- 2) Análise do conteúdo de água corporal: pode ser realizada pelo método bioimpedância elétrica (BIA) ou através de isótopos radioativos de água (deutério).
- 3) Métodos de imagem: tomografia computadorizada, ressonância magnética ou absorciometria de feixe duplo (DXA – *dual X-ray absorptiometry*).
- 4) Medidas de volume corporal: pesagem hidrostática e a pletismografia

O alto custo, baixa disponibilidade e necessidade de treinamento do operador limita o uso das duas últimas categorias para avaliação da composição corporal. A avaliação antropométrica e o exame de BIA são técnicas seguras, de baixo custo, além de reproduzíveis e acuradas, desde que realizadas por profissionais devidamente treinados (ELLIS, 2001).



### 3.1.10.1 Antropometria

A antropometria é um método rápido, não invasivo, de baixo custo e fácil aquisição para avaliação dos segmentos corporais. As dobras cutâneas são as medidas antropométricas de escolha para estimar a composição corporal de indivíduos e populações. A medida de uma dobra cutânea reflete a espessura da pele e do tecido adiposo subcutâneo em locais específicos do corpo. O pressuposto desta técnica é de que o tecido adiposo subcutâneo pode estimar a gordura total por ser uma fração constante do conteúdo adiposo corporal. A utilização de procedimentos padronizados e a aferição por profissionais treinados garantem a acurácia e confiabilidade das medidas (FONTANIVE et al., 2007; PIETROBELLI e TATÓ, 2005).

Através da aferição de quatro dobras cutâneas – bicipital (DCB), tricipital (DCT), subescapular (DCSE), suprailíaca (DCSI) – pode ser feito o cálculo da densidade corporal, a partir da fórmula de Durnin & Womersley (tabela 2).

**Tabela 2.** Equações para estimativa da densidade corporal ( $\text{kg/m}^3$ ) para ambos os sexos (FONTANIVE et al., 2007)

Homens		Mulheres	
Idade (anos)	Densidade	Idade (anos)	Densidade
17-19	$D= 1,1620-0,063 \times \log(x_1)$	16-19	$D= 1,1549-0,0678 \times \log(x_1)$
20-29	$D= 1,1631-0,0632 \times \log(x_1)$	20-29	$D= 1,1599-0,0717 \times \log(x_1)$
30-39	$D=1,1422-0,0544 \times \log(x_1)$	30-39	$D= 1,1423-0,0632 \times \log(x_1)$
40-49	$D= 1,1620-0,070 \times \log(x_1)$	40-49	$D= 1,1333-0,0612 \times \log(x_1)$

$x_1$ = somatório das quatro dobras

A partir da densidade encontrada na fórmula acima, o percentual de gordura corporal total pode ser calculado pela fórmula de Siri:

$$\% \text{ gordura corporal} = \frac{4,95}{\text{densidade}} - 4,50 \times 100$$

### 3.1.10.2 Bioimpedância elétrica (BIA)

Consiste em um método rápido e não invasivo de avaliação da composição corporal. O método baseia-se no conceito de que tecidos ricos em água e eletrólitos são mais resistentes à passagem da corrente elétrica do que o tecido adiposo. Nessa técnica, a impedância é medida através de um sinal elétrico de baixa intensidade que passa através do corpo. As estimativas são obtidas a partir de equações que determinam o teor de água total do organismo e, a partir desta, o teor de massa magra e o teor de gordura. No método tetrapolar, são utilizados quatro eletrodos colocados na mão e punho direitos e tornozelo e pé direitos. O aparelho é então conectado a dois pares de eletrodos, que conduzem uma corrente de baixa voltagem pelo corpo, sendo medidas a resistência e reactância elétrica. Através dos valores obtidos combinados com dados de peso, altura e sexo são feitos os cálculos de compartimentos corporais (PIETROBELLI e TATÓ, 2005; DUARTE e CASTELLANI, 2002).

Existem diversas equações disponíveis para a estimativa da composição corporal através da BIA. Algumas, no entanto, são validadas apenas para populações específicas (faixa etária, sexo, etnia), não sendo reproduzíveis em outros cenários. Recomenda-se utilizar equações desenvolvidas em comparação com métodos validados e com um erro de predição <3,0kg em homens e <2,3kg em mulheres (KYLE et al., 2004).

Alguns fatores podem diminuir a acurácia do exame, sendo que a principal fonte de erro está relacionada a fatores que alteram o estado de hidratação do indivíduo, como alimentação, bebidas, exercícios físicos e uso de alguns medicamentos. Para melhorar a precisão dos resultados, alguns cuidados devem ser tomados antes da realização do exame, como não ingerir bebida alcoólica, garantir ingestão de água suficiente para hidratação, não fazer exercícios extenuantes nem ingerir diuréticos ou laxantes (FONTANIVE et al., 2007; VITOLO, 2008).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 PRIMÁRIOS

1. Caracterizar a composição corporal de pacientes com homocistinúria clássica por meio de antropometria e de bioimpedência elétrica.
2. Avaliar a frequência de mutações comuns nos genes *CBS*, *MTHFR* e *F5* em pacientes brasileiros com homocistinúria clássica.

### 4.2 SECUNDÁRIOS

1. Relacionar os achados genéticos com dados clínicos - responsividade à piridoxina, história de evento tromboembólico - e bioquímicos: níveis séricos de cisteína, metionina e homocisteína.
2. Avaliar a relação entre o percentual de gordura corporal e o índice de massa corporal com os níveis séricos de cisteína, metionina e homocisteína.
3. Relacionar os níveis de cisteína, homocisteína e metionina e o percentual de gordura com os escores T de fêmur e coluna mensurados por densitometria óssea.
4. Determinar a concordância entre dois métodos utilizados para avaliação da composição corporal (antropometria e bioimpedência elétrica).

## REFERÊNCIAS

- ACCINNI, R.; CAMPOLO, J.; PAROLINI, M. et al. Newborn screening of homocystinuria: quantitative analysis of total homocyst(e)ine on dried blood spot by liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 219–226, 2003.
- ACOSTA, P.B.; YANNICELLI, S. The Ross Metabolic Formula System, Nutrition Support Protocols. 4rd edn. Ross Laboratories Library of Congress, Columbus Ohio, p. 159-188, 2001.
- ALÉSSIO, C.M.A.; SIQUEIRA, J.H.; BYDLOWSKI, S.P.; HOEHR, N.H.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Polymorphisms in the CBS Gene and Homocysteine, Folate and Vitamin B12 Levels: Association With Polymorphisms in the MTHFR and MTRR Genes in Brazilian Children. **American Journal of Medical Genetics**, v. 146, p.2598–2602; 2008.
- ANDRIA, G., FOWLER, B., SEBASTIO, G. Disorders of Sulfur Amino Acid Metabolism. In: FERNANDES, **Inborn Metabolic Diseases**. Diagnoses and Treatment. Springer: Germany, 4ª edição, 2006.
- ARRUDA, V.R.; SIQUEIRA, L.H.; GONÇALVES, M.S. et al. Prevalence of the Mutation C677→ T in the Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene Among Distinct Ethnic Groups in Brazil. **American Journal of Medical Genetics**, v. 78, p. 332-335, 1998.
- BANDEIRA, I.C. Prevalência do polimorfismo R72P do gene TP53 e C677T/A1298C do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em mulheres judias Ashkenazi de Porto Alegre. Dissertação de Mestrado – Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, 2011.
- BANERJEE, R.; ZOU, C. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-β-Synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, p. 144-156, 2005.
- BAO, L.; VLCEK, C.; PACES, V. KRAUS, J. Identification and Tissue Distribution of Human Cystathionine β-Synthase mRNA Isoforms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 350, n. 1, p. 95-103, 1998.
- BARBER, G.W.; SPAETH, G.L. Pyridoxine therapy in homocystinuria. **Lancet**, v. 289, n. 7485, p. 337, 1967.
- BERMÚDEZ, M.; FRANK, N.; BERNAL, J.; URREIZTI, R.; BRICEÑO, I.; MERINERO, B. et al. High Prevalence of CBS p.T191M Mutation in Homocystinuric Patients from Colombia. **Human Mutation** Mutation in Brief , n. 887, 2006.

BLOM, H.J.; SMULDERS, Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 75-81, 2011.

BONINI-DOMINGOS, C.R.; ZAMARO, P.J.A.; MENDIBURU, C.F. et al. Frequência da mutação 844ins68 do gene da cistationina  $\beta$ -sintetase em pacientes com trombose venosa profunda. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.27, n.1, p12-15, 2005.

BRENTON, D.P., DOW, C.J.; JAMES, J.I.; HAY, R.L.; WYNNE-DAVIES R. HOMOCYSTINURIA AND MARFAN'S SYNDROME – A Comparison. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 54, n. 2, p. 277-298, 1972.

BRENTON, D.P. Skeletal abnormalities in homocystinuria. **Postgraduate Medical Journal**, v. 53, p. 488-494, 1977.

BURKE, J.P.; O'KEEFE, M.; BOWELL, R.; NAUGHTEN, E.R. Ocular complications in homocystinuria--early and late treated. **British Journal of Ophthalmology**, v.73, n. 6, p.427-31, 1989.

CARSON, N.A J., NEILL, D.W. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. **Archives of Disease in Childhood**, v. 37, n. 195, p. 505-513, 1962.

CASTRO, R. et al. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: An overview. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 29, p. 3-20, 2006.

CHASSÉ, J.; BAROUKI, R. Characterisation of a human liver cystathionine beta synthase mRNA sequence corresponding to the c.[833T>C;844\_845ins68] mutation in CBS gene. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 332, p. 183–187, 2009.

CÓRDOBA-PORRAS, A; SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; GONZÁLEZ-SASTRE, F.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J.; BLANCO-VACA, F. Susceptibility of plasma low- and high-density lipoproteins to oxidation in patients with severe hyperhomocysteinemia. **Journal of Molecular Medicine**, v. 74, p. 771-776, 1996.

COZAR, M.; URREIZTI, R.; VILARINHO, L. et al. Identification And Functional Analyses of CBS Alleles In Spanish And Argentinian Homocystinuric Patients. **Human Mutation**, v. 32, n. 7, p. 835-42, 2011.

DAVI, G. DI MINNO, G.; COPPOLA, A. et al. Oxidative stress and platelet activation in homozygous homocystinuria. **Circulation**, v. 104, n. 10, p. 1124-1128, 2001.

DE FRANCHIS, R.; KRAUS, E.; KOZICH, V.; SEBASTIO, G.; KRAUS, J.P. Four novel mutations in the cystathionine beta-synthase gene: effect of a second linked mutation on the severity of the homocystinuric phenotype. **Human Mutation**, v. 13, p. 453-457, 1999.

DE LUCCA, M.; CASIQUE L. Characterization of cystathionine b-synthase gene mutations in homocystinuric Venezuelan patients: identification of one novel mutation in exon 6. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 81, p. 209–215, 2004.

DUARTE, A.C., CASTELLANI, F.R. Medidas Antropométricas. In: **Semiologia nutricional**. Rio de Janeiro: Axcel Books, 2002.

ELLIS, K.J. Selected Body Composition Methods Can Be Used in Field Studies. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1589-1595, 2001.

ELSHORBAGY, A.K. NURK, E.; GJESDAL, C.G. et al. Homocysteine, cysteine, and body composition in the Hordaland Homocysteine Study: does cysteine link amino acid and lipid metabolism? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 738-746, 2008.

FRANGIPANI, B.J.; BRUM, J.M.; SILVA, L.C.S.; RAND, M.H.; KYOSEN, S.O.; VOOS, S.M. Homocistinúria. In: MARTINS, A.M.; FRANGIPANI, B.J.; MICHELETTI, C.; OLIVEIRA, R.B. Protocolo Brasileiro de Dietas – Erros Inatos do Metabolismo. São Paulo: Segmento Farma, 2006.

FINKELSTEIN, J. D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **European Journal of Pediatrics**, v. 157, supl. 2, p. 40-44, 1998.

FONTANIVE, R.; PAULA, T.P.; PERES, W.A.F. Avaliação da Composição Corporal de Adultos. In: DUARTE, A.C.G. **Avaliação Nutricional - Aspectos clínicos e laboratoriais**, 1ª ed., São Paulo:Atheneu, 2007.

FOWLER, B. Disorders of homocysteine metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 20, p. 270-285, 1997.

FOWLER, B.; JAKOBS, C. Post- and prenatal diagnostic methods for the homocystinurias. **European Journal of Pediatrics**, v. 157, supl. 2, p.88–93, 1998.

GALLAGHER, P. M.; WARD, P.; TAN, S. e tal. High frequency (71%) of cystathionine b-synthase mutation G307S in Irish homocystinuria patients. **Human Mutation**, v. 6, p.177–180, 1995

GALLAGHER, P.M.; NAUGHTEN, E.; HANSON, N.Q. et al. Characterization of Mutations in the Cystathionine b-Synthase Gene in Irish Patients with Homocystinuria. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 65, p. 298–302, 1998.

GAN-SCHREIER, H.; KEBBEWAR, M.; FANG-HOFFMANN, J.; WILRICH, J.; ABDOH, G.; BEN-OMRAN, T. et al. Newborn population screening for classic homocystinuria by determination of total homocysteine from Guthrie cards. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 3, p. 427-432, 2010.

GAT-YABLONSKI, G.; MANDEL, H.; FOWLER, B.; TALEB, O.; SELA, B. Homocystinuria in the Arab Population of Israel: Identification of Two Novel Mutations Using DGGE Analysis. **Human Mutation**, Mutation in Brief #368, p. 1-5, 2000.

GAUSTADNES, M.; WILCKEN, B.; OLIVERIUSOVA, J. et al. The Molecular Basis of Cystathionine  $\beta$ -Synthase Deficiency in Australian Patients: Genotype–Phenotype Correlations and Response to Treatment. **Human Mutation**, v.20, p.117-126, 2002.

GIBSON, J.B., CARSON, N.A.J., NEILL, D.W. Pathological findings in homocystinuria. **Journal of Clinical Pathology**, v. 17, p. 427-437, 1964.

GODOY, J.M.P. Fator V de Leiden. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.27, p. 79-82, 2005.

GUPTA, S.; KRUGER, W.D. Cystathione Beta-Synthase Deficiency Causes Fat Loss in Mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2011.

HEIL, S.G.; RIKSEN, N.P.; BOERS, G.H.; SMULDERS, Y.; BLOM, H.J. DNA methylation status is not impaired in treated cystathionine beta-synthase (CBS) deficient patients. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 91, n. 1, p. 55-60, 2007.

HU, F.L.; GU, Z.; KOZICH, V.; KRAUS, J.P.; RAMESH, V.; SHIH, V.E. Molecular basis of cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency in pyridoxine responsive and nonresponsive homocistinúria. **Human Molecular Genetics**, v. 2, n. 11, p. 1857-1860, 1993.

HUBMACHER, D.; CIRULIS, J.T.; MIAO, M.; KEELEY, F.W.; REINHARDT, D.P. Functional Consequences of Homocysteinylation of the Elastic Fiber Proteins Fibrillin-1 and Tropoelastin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 2, p. 1188–1198, 2010.

ILAN, Y., EID, A.; RIVKIND, A.I.; WEISS, D.; DUBIN, Z.; YATZIV, S. Gastrointestinal involvement in homocystinuria. **Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 60-62, 1993.

JANOSIK, M.; OLIVERIUSOVA, J.; JANOSIKOVA, B.; SOKOLOVA, J.; KRAUS, E.; KRAUS, J.P. KOZICH, V. Impaired Heme Binding and Aggregation of Mutant Cystathionine  $\beta$ -Synthase Subunits in Homocystinuria. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 1506–1513, 2001.

KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548 –2556, 2004.

KERY, V.; BUKOVSKA, G.; KRAUS, J. P. Transsulfuration Depends on Heme in Addition to Pyridoxal 5'-Phosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25283-25288, 1994.

KIM, C.E.; GALLAGHER, P.M.; GUTTORMSEN et al. Functional modeling of vitamin responsiveness in yeast: a common pyridoxine-responsive cystathionine b-synthase mutation in homocistinúria. **Human Molecular Genetics**, v.. 6, n. 13, p. 2213–2221, 1997.

KLERK, M.; VERHOEF, P.; CLARKE, R. et al. *MTHFR* 677C>T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease A Meta-analysis. **JAMA**, v.288, n. 16, p. 2023-2030, 2002.

KLUIJTMANS, L.A.J.; BOERS, G. H. J.; KRAUS J. P. et al. The Molecular Basis of Cystathionine  $\beta$  -Synthase Deficiency in Dutch Patients with Homocystinuria: Effect of

C $\beta$ S Genotype on Biochemical and Clinical Phenotype and on Response to Treatment. **The American Society of Human Genetics**, v. 65, p. 59–67, 1999.

KLUIJTMANS, L.A.J.; BOERS, G.H.J.; STEVENS, E.M.B. et al. Defective Cystathionine  $\beta$ -Synthase Regulation by S-Adenosylmethionine in a Partially Pyridoxine Responsive Homocystinuria Patient. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 2, p. 285-289, 1996.

KLUIJTMANS, L.A.; BOERS, G.H.; TRIJBELS, F.J.; VAN LITH-ZANDERS, H.M.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BLOM, H.J. A Common 844INS68 Insertion Variant in the Cystathionine  $\beta$ -Synthase Gene. **Biochemical and Molecular Medicine**, v.62, p. 23–25, 1997.

KLUIJTMANS, L.A.J.; BOERS, G.H.J.; VERBRUGGEN, B.; TRIJBELS, F.J.M.; NOVÁKOVÁ, I.R.O.; BLO, H.J. Homozygous Cystathionine b-Synthase Deficiency, Combined With Factor V Leiden or Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase in the Risk of Venous Thrombosis. **Blood**, v. 91, p. 2015-2018, 1998.

KOMROWER, G.M. Dietary treatment of homocystinuria. **American Journal of Disease in Childhood**, v. 113, n. 1, p. 98-100, 1967.

KOPECKÁ, J.; KRIJT, J.; RAKOVÁ, K.; KOŽICH, V. Restoring assembly and activity of cystathionine  $\beta$ -synthase mutants by ligands and chemical chaperones. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 39–48, 2011.

KOZICH, V.; JANOSÍK, M.; SOKOLOVÁ, J.; OLIVERIUSOVÁ, J.; ORENDÁC, M.; KRAUS, J.P.; ELLEDER, D. Analysis of CBS alleles in Czech and Slovak patients with homocystinuria: Report on three novel mutations E176K, W409X and 1223+37 del99. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 20, p.363-366, 1997.

KOZICH, V.; KRAUS, J.P. Screening for mutations by expressing patient cDNA segments in *E. coli*: homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. **Human Mutation**, v.1, n. 2, p. 113–123, 1992.

KOZICH, V.; SOKOLOVA, J.; KLATOVSKA, V.; KRIJT, J.; JANOS, M.; JELINEK, K.; KRAUS, J.P. Cystathionine b-Synthase Mutations: Effect of Mutation Topology on Folding and Activity. **Human Mutation**, v. 31, p.809–819, 2010.

KRAUS, J.P. Molecular basis of Phenotype Expression in Homocystinuria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 17, p. 383-390, 1994.

KRAUS, J.P. **CBS Mutation Database**. Disponível em: <http://cbs.lf1.cuni.cz/statistics.php>. Acesso em 27 set 2011.

KRAUS, J.P.; OLIVERIUSOVA J.; SOKOLOVA J. et al. The Human Cystathionine  $\beta$ -Synthase (C $\beta$ S) Gene: Complete Sequence, Alternative Splicing, and Polymorphisms. **Genomics**, v. 52, p. 312–324, 1998.



KRUGER, W.D.; WANG, L.; JHEE, K.H.; SINGH, R.H.; ELSAS, L.J. Cystathionine *b*-Synthase Deficiency in Georgia (USA): Correlation of Clinical and Biochemical Phenotype With Genotype. **Human Mutation**, v. 22, p.434-441, 2003.

KRUMDIECK, C.L.; CHARLES, W.P. Mechanisms of Homocysteine Toxicity on Connective Tissues: Implications for the Morbidity of Aging. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 365S–368S, 2000.

KUJOVICH, J.L. Factor V Leiden Thrombophilia. **GeneReviews** [Internet]. Seattle (WA), 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21116184>. Acesso em 15 dez 2011.

KYLE, U.G.; BOSAEUS, I.; DE LORENZO, A.D. et al. Bioelectrical impedance analysis – part I: review of principles and methods. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 1226-1243, 2004.

LAWSON-YUEN, A.; LEVY, H.L. The use of betaine in the treatment of elevated homocysteine. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.88, n. 3, p. 201-207, 2006.

LEE, P.J., BRIDDON, A. A rationale for cystine supplementation in severe homocystinuria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, p. 35-38, 2007.

LINNEBANK, M.; HOMBERGER, A.; JUNKER, R.; NOWAK-GOETTL, U.; HARMS, E.; KOCH, H.G. High prevalence of the I278T mutation of the human cystathionine beta-synthase detected by a novel screening application. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 85, p. 986-988, 2001.

NAUGHTEN, E.R.; YAP, S.; MAYNE, P.D. Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. **European Journal of Pediatrics**, v. 157, Supl. 2, p. 84-87, 1998.

MAGNER, M.; KRUPKOVÁ, L.; HONZIK, T. et al. Vascular presentation of cystathionine beta-synthase deficiency in adulthood. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 33-37, 2011.

MAKINS, R.J.; GERTNER, D.J.; LEE, P.J. Acute pancreatitis in homocystinúria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 23, p.190-191, 2000.

MAJTAN, T.; LIU, L.; CARPENTER, J.F.; KRAUS, J.P. Rescue of cystathionine beta-synthase (CBS) mutants with chemical chaperones: purification and characterization of eight CBS mutant enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 21, p.15866-73, 2010.

MANDEL, H.; BRENNER, B.; BERANT, M. et al. Coexistence of hereditary homocystinúria and factor V Leiden – effect on thrombosis. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 12, p. 763-768, 1996.

MASSÉ, P.G.; BOSKEY, A.L.; ZIV, I. et al. Chemical and biomechanical characterization of hyperhomocysteinemic bone disease in an animal model. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.4, n.2, p. 1-10, 2003.

MEIER, M.; JANOSIK, M.; KERY, V. et al. Structure of human cystathionine  $\beta$ -synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. **European Molecular Biology Organization**, v. 20, n. 15, p. 3910-3916, 2001.

MILES, E.W.; KRAUS, J.P. Cystathionine  $\beta$ -Synthase: Structure, Function, Regulation, and Location of Homocystinuria causing Mutations. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 29871-29874, 2004.

MIYAKI, K. Genetic Polymorphisms in Homocysteine Metabolism and Response to Folate Intake: A Comprehensive Strategy to Elucidate Useful Genetic Information. **Journal of Epidemiology**, v.20, n.4, p. 266-270, 2010.

MUDD S.H. Hypermethioninemias of Genetic and Non-Genetic Origin: A Review. **American Journal of Medical Genetics**, v. 157, p. 3-32, 2011.

MUDD, S.H.; EDWARDS, W.A.; LOEB, P.M.; BROWN, M.S.; LASTER, L. Homocystinuria due to Cystathionine Synthase Deficiency: the Effect of Pyridoxine. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 49, p. 1762-1773, 1970.

MUDD, S.H.; FINKELSTEIN, J.D.; IRREVERRE, F.; LASTER, L. HOMOCYSTINURIA: AN ENZYMATIC DEFECT. **Science**. V. 27, n. 143, p. 1443-5, 1964.

MUDD S.H. et al. The Natural History of Homocystinuria Due to Cystathionine B-Synthase Deficiency. **American Journal of Human Genetics**, v. 37, p. 1-31, 1985.

MUDD S.H. et al. Homocysteine and Its Disulfide Derivatives : A Suggested Consensus Terminology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, p. 1704 - 1706, 2000.

MUDD S.H., LEVY H.L., KRAUS J.P. Disorders of transulfuration. In: SCRIVER C.R. et al. (eds) **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8 ed., New York: McGraw Hill, 2001.

NAUGHTEN, E.R.; YAP S., MAYNE P.D. Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. **European Journal of Pediatrics**, v. 157, n. 14, p. 84-87, 1998.

PEREZ, A.B.; D'ALMEIDA, V; VERGANI, N.; DE OLIVEIRA, A.C.; DE LIMA, F.T.; BRUNONI, D. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR): Incidence of Mutations C677T and A1298C in Brazilian Population and its Correlation With Plasma Homocysteine Levels in Spina Bifida. **American Journal of Medical Genetics**, v. 119, p. 20-25, 2003.

PERRY, T.L.; HANSEN, S.; LOVE, D.L; CRAWFORD, L.E.; TISCHLER, B. Treatment of homocystinuria with a low-methionine diet, supplemental cystine, and a methyl donor. **Lancet**, v. 292, n. 7566, p. 474-478, 1968.

PETERSCHMITT, M. J.; SIMMONS, J.R.; LEVY, H.L. Reduction of False Negative Results in Screening of Newborns for Homocystinuria. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n.21, p. 1572-1576, 1999.

PICKER, J.D.; LEVY, H.L. Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: PAGON, R.A.; BIRD, T.D.; DOLAN, C.R., et al., editors.

**GeneReviews** [Internet]. Seattle (WA), 2011. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1524/>. Acesso em 08 ago 2011.

PICO, M.L.C., BERMUDEZ, J.M.F. Homocistinuria y alteraciones del metabolismo de folatos y vitamina B<sub>12</sub>. In: SANJURJO, P.; BALDELLON, A. **Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias**, 2º ed., Madrid: Majadahonda, 2006.

PONS, M.R., VISUS, F.S., SERRA, J.D. **Tratamiento Nutricional de los Errores Innatos del Metabolismo**. Madrid: Majadahonda, 2004.

PORTO, M.P.; GALDIERI, L.C.; PEREIRA, V.G. et al. Molecular analysis of homocystinuria in Brazilian patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 362, p. 71-78, 2005.

PIETROBELLI, A; TATÒ, L. Body composition measurements: From the past to the future. **Acta Paediatrica Suppl**, v. 94, n. 448, p. 8-13, 2005.

REID, I.R. Relationships between fat and bone. **Osteoporosis International**, v. 19, p.595-606, 2008.

REISCH, O.; TOWNSEND, D.; BERRY, S.A. et al. Tyrosinase Inhibition Due to Interaction of Homocyst(e)ine with Copper: The Mechanism for Reversible Hypopigmentation in Homocystinuria Due to Cystathionine p-Synthase Deficiency. **American Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 127-132, 1995.

REFSUM, H.; FREDRIKSEN, A.; MEYER, K.; UELAND, P.M.; KASE, B.F. Birth prevalence of homocystinuria. **The Journal of Pediatrics**, v. 144, p. 830-832, 2004.

SAÍNZ C. M. et al. Errores innatos del metabolismo: Enfermedades lisosomales. **Revista Cubana de Pediatría**, v. 74, n. 1, p. 68-76, 2002.

SCHULPIS, K.H.; KALIMERIS, K.; BAKOGIANNIS, C; TSAKIRIS, T.; TSAKIRIS, S. The Effect of In Vitro Homocystinuria on the Suckling Rat Hippocampal Acetylcholinesterase. **Metabolic Brain Disease**, v. 21, p. 21-28, 2006.

SEBASTIO, G; SPERANDEO, M.P.; PANICO, M. et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. **American Journal of Human Genetics**, v. 56, n. 6, p. 1324-33, 1995.

SHIH, V.E.; FRINGER, M.; MANDELL, R. et al. A Missense Mutation (1278T) in the Cystathionine  $\beta$ -Synthase Gene Prevalent in Pyridoxine-Responsive Homocystinuria and Associated with Mild Clinical Phenotype. **American Journal of Human Genetics**, v. 57, p.34-39, 1995.

SKOVBY, F.; GAUSTADNES, M.; MUDD, S.H. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 99, n. 1, p. 1-3, 2010.

SOKOLOVÁ, J.; JANOŠÍKOVÁ, B.; TERWILLIGER, J.D. et al. Cystathionine Beta-Synthase Deficiency in Central Europe: Discrepancy Between Biochemical and Molecular Genetic Screening for Homocystinuric Alleles. **Human Mutation: Mutation in Brief**, n. 466, p. 1-7, 2001.

SPERANDEO, M.P.; PANICO, M; PEPE, A. et al. Molecular analysis of patients affected by homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency: report of a new mutation in exon 8 and a deletion in intron 11. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 18, p. 211-214, 1995.

SPERANDEO, M.P.; DE FRANCHIS, R.; ANDRIA, G.; SEBASTIO, G. A 68-bp insertion found in a homocystinuric patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine beta-synthase mRNA. **American Journal of Human Genetics**, v. 59, n. 6, p. 1391-3, 1996.

STEHOUWER, C.D.A.; JAKOBS, C. Abnormalities of vascular function in hyperhomocysteinaemia: relationship to atherothrombotic disease. **Eur J Pediatr**, v. 157, Suppl 2, p. 107-111, 1998.

STIPANUK, M.H.; UEKI, I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p. 17-32, 2011.

STRECK, E.L.; DELWING, D.; TAGLIARI, B. et al. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. **Neurochemistry International**, v. 43, p. 597-602, 2003.

SZCZEKLIK, A.; SANAK, M.; JANKOWSKI, M. et al. Mutation A1298C of Methylene tetrahydrofolate Reductase: Risk for Early Coronary Disease Not Associated With Hyperhomocysteinemia. **American Journal of Medical Genetics**, v. 101, p. 36-39, 2001.

TOPALOGLU, A.K., SANSARICQ, C., SNYDERMAN, S. Influence of Metabolic Control on Growth in Homocystinuria due to Cystathionine  $\beta$ -Synthase Deficiency. **Pediatric Research**, v. 49, n. 6, p. 796 - 798, 2001.

TSAI, M.Y.; BIGNELL, M.; SCHWICHTENBERG, K.; HANSON, N.Q. High Prevalence of a Mutation in the Cystathionine  $\beta$ -Synthase Gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 59, p.1262-1267, 1996.

TSAI, M.Y.; HANSON, N.Q.; BIGNELL, M.K.; SCHWICHTENBERG, K.A. Simultaneous Detection and Screening of T<sub>833</sub>C and G<sub>919</sub>A Mutations of the Cystathionine  $\beta$ -Synthase Gene by Single-Strand Conformational Polymorphism. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 473-477, 1996.

URREIZTI, R.; BALCELLS, S.; RODÉS, M. et al. Spectrum of C $\beta$ S Mutations in 16 Homocystinuric Patients from the Iberian Peninsula: High Prevalence of T191M and Absence of I278T or G307S. **Human Mutation Mutation in Brief**, n.624, 2003.

URREIZTI R.; ASTEGGIANO C.; BERMUDEZ M. et al. The p.T191M mutation of the CBS gene is highly prevalent among homocystinuric patients from Spain, Portugal and South America. **Journal of Human Genetics**, v. 51, p. 305–313, 2006.

VANZIN, C.S; BIANCINI, G.B.; SITTA, A. et al. Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: A possible role for homocysteine. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 104, p. 112–117, 2011.

VYLETAL, P.; SOKOVOLÁ, J.; COOPER, D.N. et al. Diversity of Cystathionine b-Synthase Haplotypes Bearing the Most Common Homocystinuria Mutation c.833T4C: A Possible Role for Gene Conversion. **Human Mutation**, v. 28, n. 3, p. 255-264, 2007.

VITOLO, M.R. **Nutrição: da gestação ao envelhecimento**. Rio de Janeiro: Rubio, 2008.

WALTER, J.H. et al. Strategies for the treatment of cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency: the experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. **European Journal of Pediatrics**, v. 157, p. 71 - 76, 1998.

WEISBERG, I.S.; JACQUES, P.F.; SELHUB, et al. The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. **Atherosclerosis**, v. 156, p.409-415, 2001.

WILCKEN, B. Disorders of Sulfur Amino Acids. In: BLAU, N. et al. **Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases**. Hardcover: Springer, 2006.

WILCKEN, B.; BAMFORTH, F.; LI, Z. et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR):findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. **Journal of Medical Genetics**, v.40, p.619–625, 2003.

WILCKEN, D.E.L., WILCKEN, B. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effect of treatment. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.20, p. 295-300, 1997.

XIN, X.; SONG, Y.; M. A. et al. Gene polymorphisms and risk of adult early-onset ischemic stroke: A meta-analysis. **Thrombosis Research**, v. 124, p. 619-624, 2009.

YAP, S.; NAUGHTEN, E. Homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 21, n. 7, p. 738-747, 1998.

YAP, S.; RUSHE, H.; HOWARD, P.M.; NAUGHTEN, E.R. The intellectual abilities of early-treated individuals with pyridoxine-nonresponsive homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 24, p. 437-447, 2001a.

YAP, S.; BOERS, G.H.; WILCKEN, B. et al. Vascular Outcome in Patients With Homocystinuria due to Cystathionine  $\beta$ -Synthase Deficiency Treated Chronically: A

Multicenter Observational Study. **Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 2080-2085, 2011b.

YAP, S. Classical Homocystinuria: Vascular risk and its prevention. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 26, p. 259-265, 2003.

YAP, S. Homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. **Orphanet encyclopedia**, 2005. Disponível em: [www.orpha.net/data/patho/GB/uk-CbS.pdf](http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-CbS.pdf). Acesso em 20 ago. 2011.

## 5. ARTIGO

Artigo será submetido ao periódico “*Journal of Inherited Metabolic Disease*”

### **Classical homocystinuria: screening of common mutations and assessment of the effect of homocysteine, cysteine, and methionine in body composition and bone mineral density**

Soraia Poloni<sup>1,2</sup>, Sandra Leistner-Segal<sup>1,2,3</sup>, Isabel Cristina Bandeira<sup>1,2</sup>, Carolina Fischinger Moura de Souza<sup>3</sup>, Maria Betânia Pereira Toralles<sup>4</sup>, Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>1,2,3,5</sup>

- (1) Post Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
- (2) BRAIN Laboratory (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
- (3) Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
- (4) Universidade Federal da Bahia, Brazil
- (5) Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

**Corresponding Author:** Ida Vanessa D. Schwartz, MD, PhD, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55-51-33598011, Fax: +55-51-33598010, e-mail: ischwartz@hcpa.ufrgs.br

## ABSTRACT

The objective of this study was to investigate changes in body composition and their correlation with clinical and biochemical findings in patients with classical homocystinuria. Also, a screening of common mutations in *CβS*, *MTHFR*, and *F5* genes was conducted. **Methods:** The genotypic assessment was done in 11 patients and included the research of pathogenic mutations p.I278T, p.T191M, and p.G307S, as well as of polymorphism c.844ins68 in *CβS* gene; c.677C>T and c.1298A>C in *MTHFR* gene; and p.R506Q in *F5* gene, all by PCR-RFLP. The clinical history and the result of bone densitometry were obtained by the review of clinical records. The assessment of body composition was done in 8/11 patients by means of anthropometry and electrical bioimpedance; plasma levels of methionine, homocysteine, and cysteine were determined at the same visit by HPLC. **Results:** Five patients showed low body fat percentage by at least one of the methods. The body mass index was significantly correlated with the levels of homocysteine ( $r = -0.946$ ), methionine ( $r = -0.788$ ) and cysteine ( $r = 0.915$ ). No significant correlation was found between those variables and the densitometry T-scores. Among the pathogenic mutations of *CβS* gene, p.1278T was the only one found ( $n = 3/9$  families); however, in 2/3 families, it was in cis with c.844ins68. It was not possible to establish an association between mutations in *MTHFR* and *F5* and the occurrence of thromboembolic events. **Conclusions:** *CβS* deficiency has a significant impact on body composition, and the decrease in body fat percentage may be an important pathogenic mechanism in classical homocystinuria. Our findings suggest that the profile of mutations in *CβS* gene found in Brazilian patients with classical homocystinuria is different from that of other populations and do not corroborate the role of *MTHFR* and *F5* genes as disease modifiers.

**Synopsis:** This study showed for the first time that the deficient activity of *CβS* has a significant impact on human body composition. The following were seen herein: low body fat percentage, and an association between levels of cysteine, homocysteine, and methionine and body mass. The mutational profile of Brazilian patients with classical homocystinuria seems to be different from that of other populations, and no strong influence was found in *MTHFR* and *F5* genes on phenotype severity.



## INTRODUCTION

Classical homocystinuria (OMIM 236200) is an inborn error of metabolism of recessive autosomal inheritance caused by the deficient activity of cystathionine  $\beta$ -synthase (C $\beta$ S; EC 4.2.1.22). This enzyme is responsible for the degradation of homocysteine, and its deficiency results in an increase in plasma levels of homocysteine and methionine and the decrease in cysteine levels. Its worldwide prevalence is estimated at 1:344,000 individuals (Mudd et al. 2001).

From a clinical standpoint, the classical signs of the disease include the following systems: ocular (*ectopia lentis*, myopia), vascular (thromboembolism), central nervous (mental retardation, psychiatric disorders), and skeletal (osteoporosis). The so-called “marfanoid phenotype”, i.e., tall height, dolichostenomelia and a lean biotype, is also common (Mudd et al. 1985, Brenton et al. 1972). Treatment includes the supplementation of pyridoxine (C $\beta$ S co-factor) and folic acid and, in some cases, betaine and a methionine-restricted diet (Wilcken, 2006).

Besides its classic manifestations, recent findings indicate that the altered metabolism of homocysteine could influence body composition. In healthy individuals there is a strong positive and independent correlation between the levels of cysteine and body fat (Elshorbagy et al. 2008). In an animal model of homocystinuria, a marked decrease in the content of adipose tissue was described as being associated to low levels of cysteine (Gupta and Kruger 2011); however, these changes have not yet been studied in patients. Given that the amount of body fat is closely related to bone mineral density, these changes could have important clinical implications in classical homocystinuria (Reid 2008).

Over different 160 pathogenic mutations have been described for C $\beta$ S gene (<http://cbs.lf1.cuni.cz/index.php>). Although several of these mutations are private, 3 mutations correspond to nearly half of the mutated alleles: p.I278T (c.833T>C), p.T191M (c.572C>T), and p.G307S (c.919G>A). The first mutation presents a pan-ethnic distribution, while the second mutation is more common in Latin American countries, and the third mutation is more common in Celtic countries. The common polymorphism c.844ins68 in C $\beta$ S gene is always segregated in *cis* with mutation p.I278T, integrating the so-called “double mutation allele”; in this case, p.I278T acquires a non-pathogenic character (Shih et al. 1995; Cozar et al. 2011; Urreizti et al. 2006; Gallagher et al. 1995, Chassé and Barouki 2009). Two polymorphisms in MTHFR gene, which codifies methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.7.99.5), c.677C>T and C.1298A>C, are frequent and result in hyperhomocysteinemia and in increased

cardiovascular risk in the general population (Miyaki 2010; Weisberg et al. 2001; Klerk et al. 2002; Xin et al. 2009). In *F5* gene, mutation p.R506Q (c.1691G>A), called Leiden mutation, is considered a thrombophilic factor. In studies that included, respectively, 6 and 24 patients with classical homocystinuria, Mandel et al. (1996) and Kluijtmans et al. (1998) found an association between the occurrence of thromboembolic events and the presence of Leiden mutation or of mutations in *MTHFR*.

The objective of the present study was to evaluate the body composition of patients with classical homocystinuria, identifying changes in body fat percentage and correlating findings with the levels of cysteine, homocysteine, methionine and bone densitometry T-scores. Moreover, a screening of common mutations in *CβS*, *MTHFR* and *F5* genes was conducted.

## METHODS

The present study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, and the procedures were conducted after the application of the Informed Consent Term to patients or their caretakers.

### **Patients**

Eleven Brazilian patients with classical homocystinuria from 9 unrelated families were included in the study (Table 1). Seven families (n= 9 patients) were from the state of Rio Grande do Sul (Center 1); the other patients were from the northeast region of Brazil (Center 2).

The levels of homocysteine and methionine (cysteine was unavailable) at diagnosis, of the past 5 years, and the last result of bone densitometry (T-score of the lumbar spine and femur), as well as data on the clinical history, were obtained by means of medical records review. Because patient 9 had a recent diagnosis, the 3-year results of homocysteine and methionine were obtained. All patients had their diagnosis of classical homocystinuria based on the coexistence of hypermethioninemia and/or hyperhomocysteinemia and a positive cyanide-nitroprusside test, besides a clinical picture compatible with classical homocystinuria. Only one patient had a homocysteine result at diagnosis.

### **Assessment of Body Composition**

The body composition was assessed in 8/9 patients from Center 1 (one patient did not agree to perform this procedure) in a single appointment by means of anthropometry and

electrical bioimpedance (BIA). Anthropometry was done measuring the following skinfolds: tricipital (TSF), bicipital (BSF), subscapular (SSSF), and suprailiac (SISF). In all patients, measurements were taken by the same person. Body density was calculated based on the measures of the folds, and later body fat percentage was calculated using the Siri formula (Fontanive et al. 2007). Also, the Z-score of 2 isolated folds (TSF and SSSF) was calculated to evaluate the relation between the amount of body fat of specific points (torso and limbs) and the levels of cysteine, homocysteine, and methionine and T-scores (Frisancho 1990). Weight and height were verified for the calculation of the Body Mass Index (BMI). The analysis by BIA was done using the tetrapolar method and following all recommendations given by ESPEN (Kyle et al. 2004b). From the results obtained, body fat percentage was calculated using the Kushner formula (Kushner and Schoeller 1986) and was then classified as: low/not recommended, intermediate, high and obesity (Heyward and Wagner, 2004).

### **Genetic Assessment**

Mutation analysis was performed applying the RFLP method (Restriction Fragment Length Polymorphism). Genomic DNA was extracted following the precipitation method with salts described by Miller et al. (1988).

**Identification of mutations p.I278T, p.T191M, and p.G307S and of polymorphism c.844ins68 in *CβS* gene:** For the assessment of polymorphism c.844ins68 and mutations p.I278T and p.G307S, the amplification of exon 8 was performed by PCR using the primers described by Sperandeo et al. (1995). For the assessment of polymorphism c.844ins68, the product of PCR was submitted to agarose gel electrophoresis for the differentiation of amplified fragments of wild type alleles (175 pb) and with the insertion (243 pb). For the detection of mutations p.I278T and p.G307S, the product of PCR was submitted to digestion with enzymes *BsrSI* and *AluI*, respectively. The presence in cis of mutations p.I278T and c.844ins68 was identified by means of enzymatic digestion of the 243pb fragment. Mutation p.T191M was identified by means of the amplification of exon 5 using primers described by Urreizti et al. (2006), followed by digestion by enzyme *Hsp92II*. Discordant results regarding mutation p.I278T and polymorphism c.844ins68 found in family 1 (Table 1) were confirmed by PCR of 2 samples collected in different moments and by sequencing of exon 8, the latter in patients 1b, 1c, and their mother.

**Identification of polymorphisms c.1298A>C and c.677C>T in *MTHFR* gene:** For the detection of polymorphism c.1298A>C, the codifying sequence was amplified using the primers described by Van der Put et al. (1998), and after that digestion by enzyme *MboII* was

performed. For polymorphism c.677C>T, primers described by Frosst et al. (1995) were used, and the product was submitted to digestion by enzyme *Hinf*I.

**Identification of mutation p.R506Q in *F5* gene (Factor V Leiden):** the codifying sequence was amplified by means of the primers described by Koeleman et al. (1994), and the product of PCR was submitted to digestion by enzyme *Mn*II.

### Laboratory Assessment

On the same day of the verification of BIA and anthropometry, fasting blood was collected to determine the concentration of homocysteine, methionine, and cysteine by HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography).

### Statistical Analysis

The statistical analysis was done using program *SPSS* version 16.0 for Windows<sup>®</sup>. Due to their asymmetrical distribution, variables were presented by means of median and interquartile interval 25-75 (IQ25-75). The association between body fat percentage, levels of cysteine, homocysteine, and methionine, and the T-scores of the femur and spine was evaluated by means of Spearman correlation coefficient. Kappa coefficient was used to verify the degree of agreement in the classification of body composition by the anthropometric method and BIA. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

Table 1 summarizes the clinical picture of patients. The median age at diagnosis was 9 years (IQ25-75=6.25-12 years). Four patients (44%) already had at least 3 systems compromised at diagnosis (Table 1). Parental consanguinity was reported by 3/9 (33.3%) families.

All patients with available clinical data (n=8) were receiving some type of treatment at the time of study inclusion: pyridoxine (n=6), folic acid (n=7), betaine (n=7), acetylsalicylic acid (n=8), dietary methionine restriction (n=8), and supplementation with a methionine-free formula (n=1). However, most patients presented inadequate metabolic control (Table 2). Six patients were non responsive to pyridoxine; one was partially responsive (patient 4), and one was responsive (patient 3). At assessment, median homocysteine was 147.5 $\mu$ mol/L (IQ25-75=43-299); median methionine was 351.5 $\mu$ mol/L (IQ25-75=73-628), and median cysteine was 287.5 $\mu$ mol/L (IQ25-75=155-354).

The results of the assessment of body composition are presented in Table 2. Of the 8 patients, 5 presented a low or lower body fat percentage (below recommendation) according to at least one of the methods. The remaining patients presented an average content of body fat. Kappa coefficient of agreement among methods was 0.50.

Homocysteine levels at assessment and their median of the last 5 years correlated negatively with the current BMI ( $r=-0.946$ ,  $p<0.001$  and  $r=-0.838$ ,  $p=0.009$ , respectively), while the levels of cysteine presented a positive correlation ( $r=0.915$ ,  $p=0.001$ ). The levels of methionine at assessment also presented a negative correlation with the BMI ( $r=-0.788$ ,  $p=0.02$ ). No relation was found between metabolites with height or the percentage of body fat evaluated by the anthropometric method or by BIA. However, the Z-score of the isolated measure of TSF was positively correlated with the levels of cysteine ( $r=0.737$ ,  $p=0.03$ ). The T-score of the femur presented a positive correlation with cysteine ( $r=0.741$ ) and a negative correlation with homocysteine at assessment ( $r=-0.741$ ), although these correlations did not reach statistical significance ( $p=0.09$ ).

The result of the genotypic assessment is presented in Table 1. No allele was detected with mutations p.T191M and p.G307S, while a patient presented mutation p.I278T in homozygous, and 3 unrelated patients presented it in heterozygous. In all these cases, polymorphism c.844ins68 was found in cis with p.I278T, except for individual 9, who presented the allele containing only p.I278T. The Factor V Leiden was found in 2 alleles. In *MTHFR* gene, c.677C>T was detected in 5 alleles, and c.1298A>C was detected in 9. In patients with genotype TT of c.677C>T or heterozygotes for both polymorphisms of *MTHFR* ( $n=2$ ), median homocysteine in 5 years was  $56.8\mu\text{mol/L}$  (IQ25-75=31.7-197.7), while the remaining of patients ( $n=6$ ) presented a median of  $182.9\mu\text{mol/L}$  (IQ25-75=48.4-222.3).

## DISCUSSION

This is the first study to evaluate the relation between the main metabolites of the homocysteine pathway with body composition and bone mass in patients with classical homocystinuria.

The characteristics of our sample, i.e., late diagnosis, clinical manifestations in several systems, and unresponsiveness to pyridoxine, may indicate that classical homocystinuria is underdiagnosed in our region. It is possible that most patients with milder forms of the disease and atypical manifestations are not diagnosed, and lack of knowledge of health professionals

about this disease may be the main factor related to the lack of and delay in its diagnosis. In Brazil, the national newborn screening program does not include the test for homocystinuria.

Increasing evidence showing that levels of cysteine and homocysteine influence body composition especially fat mass led us to study this association in patients with classical homocystinuria. The methods for the assessment of body composition, anthropometry and BIA, were chosen because they are not invasive, have good availability and broad clinical application. Anthropometry is performed by measuring skinfolds at specific areas of the body and is used as a predictor of body fat because it estimates the amount of subcutaneous adipose tissue, which on its turn represents a constant fraction of the body fat content (Pietrobelli and Tatò 2005). The standard error of the body composition estimate by anthropometry varies between 3 and 11% (Wang et al. 2006). The main limitations of the method are the validation of the equations in specific populations and inter-evaluator variations (Ellis 2001).

BIA is verified by means of a low-intensity electrical signal that passes through the body. The method is based on the concept that tissues rich in water and electrolytes are more resistant to the passage of the electric current when compared to the adipose tissue. From the determination of the content of total body water it is possible to calculate the content of lean mass and of fat mass (Kyle et al. 2004a; Pietrobelli and Tatò 2005). The Kushner equation was used in our study, for it is the most accurate formula for the assessment of body fat percentage in several populations (Cooper et al. 2000; Newton et al. 2005; Mattar et al. 2011). The standard error of the estimate of body composition by BIA varies between 3 and 5%. The main factor related to verification errors is the status of body hydration (Kyle et al. 2004, Houtkooper et al. 1996). The disagreement of anthropometry and BIA results in two cases and the median Kappa coefficient found in our sample, indicate that, despite the care taken at taking the measurements, estimation errors related to the methods may have happened.

In our sample, the assessment of the fat mass indicated that patients with classical homocystinuria presented with low (more frequently) or intermediate body fat percentage. However, only two patients had low weight by the BMI, which indicates that the decrease in adipose tissue was more marked than in total mass. The lack of a relationship between the percentage of total body fat and homocysteine or cysteine may have happened due to the following: the small sample size, an influence of other body compartments, or limitations of the methods used. Furthermore, one should consider that the present sample was composed of treated patients. Even without good metabolic control, treatment prevents complications and modifies the natural history of the disease (Wilcken and Wilcken 1997; Yap 2003). The correlation found between the Z-score of the TSF and the concentration of cysteine is a sign

that there is an association between fat mass and cysteine. It also suggests the existence of a possible alteration in the distribution of adipose tissue in the deficiency of C $\beta$ S, since the measurement of TSF specifically reflects the subcutaneous adipose tissue of the upper limbs. The same relation was not found for the Z-score of SSSF, which is an indicator of subcutaneous fat of the torso. This observation is in line with the necropsy findings of Gibson et al. (1964), who described the existence of a small amount of subcutaneous fat in patients with classical homocystinuria, especially in the limbs.

The association between cysteine and fat mass has been a recent target of studies in healthy individuals. In the large cohort of the Hordaland Homocysteine Study, serum concentration of cysteine presented a strong positive and independent association with the BMI and the percentage of total body fat, even after the adjustment for the concentration of homocysteine. Similarly, homocysteine showed a negative correlation with the BMI and the body fat percentage. Methionine levels were not evaluated. The authors observed that the relation between cysteine and fat mass was much stronger than that with homocysteine and concluded that this was the main determining factor for the percentage of total body fat in that population (Elshorbagy et al. 2008).

Recently, the effect of the deficiency of C $\beta$ S in body composition was evaluated in an animal model of classical homocystinuria. In that study, the authors observed that rats with a deficiency of C $\beta$ S presented around 50% less fat mass when compared to control animals, while the decrease in lean mass was small (9% in females and 14% in males). This decrease was associated with a significant decrease in cysteine levels and in the expression of hepatic *Scd-1* protein, which is a key lipogenic enzyme for the synthesis of monounsaturated fatty acids. To test the hypothesis that the correction of cysteine deficiency could modify this phenotype, a group of animals received supplementation of N-acetylcysteine in water since birth. Although the supplementation normalized cysteine levels, it did not change the expression of protein *Scd-1* and the body fat percentage (Gupta and Kruger 2011). The following are possible explanations for this: the observed decrease in the intake of water and feed, the antioxidant effect of N-acetylcysteine, or the influence of other metabolites of the homocysteine pathway in body composition.

In our study, methionine levels also showed a positive association with the BMI. However, there is no evidence that methionine alone has effects in the body composition (Elshorbagy et al. 2011). It is possible that the relation found herein is only a reflex of homocysteine levels, which when elevated are reconverted to methionine by the remethylation route.

To evaluate the effect of the decrease in fat mass in bone health, we investigated the relation between densitometry T-scores and biochemical and body composition parameters. No association between the percentages of total body fat or isolated skinfolds with bone density was found. However, the T-score of the femur presented a tendency of a positive association with cysteine and of a negative association with homocysteine. Cysteine seems to play a central role in the development of osteoporosis, since the latter is not observed in other types of homocystinuria without cysteine deficiency (Wilcken 2006). In the same Hordaland cohort, cysteine levels were positively associated with bone mineral density, but this relation was lost when adjusted for lean mass and fat mass, demonstrating the effect mediated by body composition. On its turn, the concentration of homocysteine was inversely related to bone mass in male individuals, independently from other variables (Elshorbagy et al. 2009). In our study, all patients with osteoporosis or osteopenia received a specific treatment for it, and this may have influenced results.

The screening for common pathogenic mutations in the CBS gene revealed that, among the mutations studied, mutation p.I278T was the most prevalent in our population, although in only one patient it was not in cis with c.844ins68, being therefore pathogenic. This mutation, which is found in several parts of the world, is associated with responsiveness to pyridoxine and an attenuated phenotype. In our sample, the affected patient (patient 9) was diagnosed late, after two thromboembolic events, although she presented with *ectopia lentis*. Initial treatment showed that this patient was not pyridoxine-responsive. Although uncommon, the non-responsiveness to pyridoxine associated to mutation p.I278T has already been described (Kim et al. 1997). It is likely that the second mutation, yet unidentified, contributes to this phenotype.

Mutation p.G307S is common in populations of Celtic origin, being responsible for over 70% of the mutated alleles in Ireland (Gallagher et al. 1995). The absence of this mutation in our sample shows its rarity in our continent, since, until now, no allele has been detected in Latin America. On the other hand, mutation p.T191M is very prevalent in countries of the Iberian Peninsula and Latin American countries (Cozar et al. 2011, De Lucca and Casique 2004; Porto et al. 2005, Bermudez et al. 2006). The fact that no allele for this mutation was detected in our sample may be explained by the predominantly German and Italian background of the south region of Brazil, where most of the patients in the present study came from. Besides, one should consider that private mutations are common in classical homocystinuria (Kraus et al. 1999). Besides the present study, the only other Brazilian study that genotyped patients with classical homocystinuria (Porto et al. 2005) found, in 11



unrelated patients, a frequency of 13% for mutations p.T191M and p.I278T as well as the absence of mutation p.G307S; 3/11 patients were heterozygotes for p.I278T, but only one allele with insertion c.844ins68 was detected.

In family 1, discordant results were found in relation to double mutation c.[833T>C;844ins68]. While 2 patients and their mother were heterozygotes for this alteration, patient 1c was homozygote. These findings were confirmed for the 4 individuals in two independent samples by PCR-RFLP. Moreover, the region involved was sequenced in patients 1b and 1c as well as in their mother. Unfortunately, the DNA of their father was not available for analysis. As the clinical history of the father was not compatible with classical homocystinuria and as both physical exam and homocysteine levels of the mother were also not suggestive of this diagnosis, further studies will be conducted in order to exclude hypotheses such as false paternity/maternity or uniparental disomy in 1c.

Of the 4 patients who had already presented thromboembolic events, only one (patient 5) was heterozygote for Factor V Leiden. Moreover, this patient was homozygote TT for polymorphism C.677C>T and heterozygote for C.1298A>C of *MTHFR* gene. This patient presented a severe clinical phenotype, with significant ocular and bone complications, although he did not present severe neurological compromise. Also, this patient presented the highest value of mean homocysteine in our sample, despite therapeutic measures. This unfavorable genotype may have contributed to the clinical picture presented by this patient. However, in the total sample, five year homocysteine levels did not indicate that polymorphisms in *MTHFR* were associated to higher values of homocysteine. The lack of knowledge about the pathogenic mutations in C $\beta$ S and the small sample size limited the assessment of the relation between the genotypes of *MTHFR* and *F5* and the phenotype severity (e.g., the occurrence of thromboembolic events).

In conclusion, our study demonstrated for the first time the impact of the deficiency of C $\beta$ S in human body composition. Still, the decrease in content of body fat mediated by cysteine and/or homocysteine may be one of the pathogenic mechanisms of C $\beta$ S deficiency; however, further studies are necessary to prove this relation. The screening of pathogenic mutations in *C $\beta$ S* gene detected only one pathogenic allele; this suggests the presence of rare or private mutations in these patients. No association between the genotypes of *MTHFR* and *F5* and phenotype severity was seen in this sample.

**Acknowledgements:** The authors would like to thank the team of the outpatient clinic for the treatment of metabolic disorders of the Genetics Service of HCPA for their collaboration in the study. The present study was financed by FIPE-HCPA and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*.

## REFERENCES

- Bermúdez M, Frank N, Bernal J et al (2006) High Prevalence of CBS p.T191M Mutation in Homocystinuric Patients from Colombia. *Hum Mutat* 27:887.
- Brenton DP, Dow CJ, James JI et al (1972) Homocystinuria and Marfan's Syndrome – A Comparison. *J Bone Joint Surg Br* 54:277-98.
- Chassé JF, Barouki R (2009) Characterisation of a human liver cystathionine beta synthase mRNA sequence corresponding to the c.[833T>C;844\_845ins68] mutation in CBS gene. *Mol Cell Biochem* 332:183-187.
- Cooper BA, Aslani AA, Ryan M et al (2000). Comparing different methods of assessing body composition in end-stage renal failure. *Kidney Int* 58: 408–416
- Cozar M, Urreizti R, Vilarinho L et al (2011) Identification And Functional Analyses of CBS Alleles In Spanish And Argentinian Homocystinuric Patients. *Hum Mutat* 32: 835-42.
- De Lucca M, Casique L (2004) Characterization of cystathionine b-synthase gene mutations in homocystinuric Venezuelan patients: identification of one novel mutation in exon 6. *Mol Genet Metab* 81:209–215.
- Elshorbagy AK, Gjesdal CG, Nurk E et al (2009) Cysteine, homocysteine and bone mineral density: a role for body composition? *Bone* 44:954-958.
- Ellis KJ (2001) Selected Body Composition Methods Can Be Used in Field Studies. *J Nutr* 131:1589-1595.
- Elshorbagy AK, Nurk E, Gjesdal CG et al (2008) Homocysteine, cysteine, and body composition in the Hordaland Homocysteine Study: does cysteine link amino acid and lipid metabolism? *Am J Clin Nutr* 88:738-46.
- Elshorbagy AK, Valdivia-Garcia M, Mattocks DAL (2011) Cysteine supplementation reverses methionine restriction effects on rat adiposity: significance of stearyl-coenzyme A desaturase. *J Lipid Res* 52: 104-112
- Fontanive R, Paula TP, Peres WAF (2007) Avaliação da Composição Corporal de Adultos. In Duarte ACG. *Avaliação Nutricional – Aspectos clínicos e laboratoriais*. São Paulo:Atheneu, 41-63.
- Frisancho R (1990) Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Michigan: University of Michigan Press, 37-52.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R et al (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase *Nat Genet* 10:111-113.
- Gallagher PM, Ward P, Tan S et al (1995) High frequency (71%) of cystathionine  $\beta$ -synthase mutation G307S in Irish homocystinuria patients. *Hum Mutat* 6:177–180.

Gibson JB, Carson NA, Neill DW (1964) Pathological findings in homocystinuria. *J Clin Pathol.* 17:427-37.

Gupta S, Kruger WD (2011) Cystathione Beta-Synthase Deficiency Causes Fat Loss in Mice. *PLoS ONE* 6:1-10.

Heyward VH, Wagner DR (2004) Applied body composition assessment. Hardcover, 3-14.

Houtkooper LB, Lohman TG, Going SB, Howell WH (1996) Why bioelectrical impedance analysis should be used for estimating adiposity. *Am J Clin Nutr.* 64:436-448.

Kim CE, Gallagher PM, Guttormsen AB (1997) Functional modeling of vitamin responsiveness in yeast: a common pyridoxine-responsive cystathionine beta-synthase mutation in homocystinuria. *Hum Mol Genet* 13:2213-2221.

Klerk M, Verhoef P, Clarke R et al (2002) MTHFR 677C>T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease A Meta-analysis. *JAMA* 288:2023-2030.

Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Verbruggen B et al (1998). Homozygous Cystathionine b-Synthase Deficiency, Combined With Factor V Leiden or Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase in the Risk of Venous Thrombosis. *Blood* 91: 2015-2018.

Koeleman BPC, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM (1994) Activated Protein C Resistance as an Additional Risk Factor for Thrombosis in Protein C-Deficient Families. *Blood* 84:1031-1035

Kraus JP, Janošik M, Kozich V et al (1999) Cystathionine b-Synthase Mutations in Homocystinuria. *Hum Mutat* 13:362.375

Kushner RF, Schoeller DA (1986) Estimation of total body water by bioelectrical impedance analysis. *Am J Clin Nutr* 44:417-24.

Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD et al (2004a) Bioelectrical impedance analysis – part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* 23:1226-1243.

Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD et al (2004b) Bioelectrical impedance analysis – part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr* 23:1430-1453.

Mandel H, Brenner B, Berant M et al (1996) Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden – effect on thrombosis. *N Engl J Med* 334:763-768.

Mattar L, Godart N, Melchior JC et al (2011). Underweight patients with anorexia nervosa: Comparison of bioelectrical impedance analysis using five equations to dual X-ray absorptiometry. *Clin Nutr* 30:746-752.

Miller SA, Dykes DD, Olesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.

- Miyaki K (2010) Genetic Polymorphisms in Homocysteine Metabolism and Response to Folate Intake: A Comprehensive Strategy to Elucidate Useful Genetic Information. *J Epidemiol* 20:266-270.
- Mudd SH, Levy HL, Kraus JP (2001) Disorders of transsulfuration. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW et al, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw Hill; 2007-2043.
- Mudd SH, Skovby F, Levy HL et al (1985) The Natural History of Homocystinuria Due to Cystathionine B-Synthase Deficiency. *Am J Hum Genet* 37:1-31.
- Newton Jr RL, Alfonso A, White MA et al (2005) Percent body fat measured by BIA and DEXA in obese, African-American adolescent girls. *Int J Obes* 29:594-602.
- Pietrobelli A, Tatò L (2005) Body composition measurements: From the past to the future. *Acta Paediatr Suppl* 94: 8-13.
- Porto MP, Galdieri LC, Pereira VG et al (2005) Molecular analysis of homocystinuria in Brazilian patients. *Clin Chim Acta* 362:2005.
- Reid IR (2008) Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int* 19:595-606.
- Shih VE, Fringer M, Mandell R et al (1995) A Missense Mutation (I278T) in the Cystathionine  $\beta$ -Synthase Gene Prevalent in Pyridoxine-Responsive Homocystinuria and Associated with Mild Clinical Phenotype. *Am J Hum Genet* 57: 34-39.
- Skovby F (2003) Disorders of Sulfur Amino Acids. In Blau N, Hoffmann GF, Blaskovics ME, Gibson KM. *Physician's guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Disorders*. Hardcover: Springer, 243-260.
- Sperandeo MP, Panico MP, Pepe A et al (1995) Molecular Analysis of patients affected by homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency: report of a new mutation in exon 8 and a deletion in intron 1. *J Inher Metab Dis* 18:211-214.
- Urreizti R, Asteggiano C, Bermudez M et al (2006) The p.T191M mutation of the C $\beta$ S gene is highly prevalent among homocystinuric patients from Spain, Portugal and South America. *J Hum Genet* 51:305-313.
- Urreizti R, Balcells S, Rodés M et al (2003) Spectrum of C $\beta$ S Mutations in 16 Homocystinuric Patients from the Iberian Peninsula: High Prevalence of T191M and Absence of I278T or G307S. *Hum Mutat Mutation in Brief* 624.
- Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM et al (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62:1044-1051.
- Wang J, Thornton JC, Kolesnik S, Pierson RN (2000) Anthropometry in Body Composition An Overview. *Ann N Y Acad Sci* 904:317-326.

Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J et al (2001) The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156: 409-415.

Wilcken B (2006) Disorders of Sulfur Amino Acids. In Blau N, Hoffmann GF, Leonard J, Clarke JTR. *Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases*. Hardcover: Springer, 105-115.

Wilcken DEL, Wilcken B (1997) The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effect of treatment. *J Inherit Metab Dis* 20:295-300.

Xin X, Song Y, Ma J et al (2009) Gene polymorphisms and risk of adult early-onset ischemic stroke: A meta-analysis. *Thromb Res.* 124:619-624.

Yap S (2003) Classical Homocystinuria: Vascular risk and its prevention. *J Inherit Metab Dis* 26:259-265.

**Table 1.** Classical homocystinuria: profile of sample included in study and search of common mutations in *CβS* gene and in possible modifying genes (*F5* and *MTHFR*) (n=11)\*

Patient	Gender	Present	Age at	5 Year Hcy	Highest	Genotypes										
		Age	Diagnosis	(median)	Hcy Value	Clinical Manifestations				CβS				F5	MTHFR	
		(years)	(years)	(μmol/L)	(μmol/L)	Ocular	Bone	Vascular <sup>1</sup>	CNS	p.I278T	p.T191M	p.G307S	c.844ins68	p.R506Q <sup>3</sup>	c.677C>T	c.1298A>C
1a	F	31	12	248	361.4	+	+	+	+	+/- <sup>2</sup>	-/-	-/-	+/-	-/-	CC	AC
1b	M	35	14	152.4	205	+	+	-	+	+/- <sup>2</sup>	-/-	-/-	+/-	-/-	CC	AC
1c	F	26	7	264.8	350	+	+	-	+	+/+ <sup>2</sup>	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	AC
2	F	22	8	63.4	182.9	+	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	CC	AC
3	M	18	4	189.4	219.4	+	+	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	CC	AC
4	M	17	2	32	56.3	+	+	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	CT	AC
5	M	21	6	205.6	344	+	+	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	TT	AC
6	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	CT	AC
7	M	10	14	NA	NA	+	NA	NA	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	CC	AC
8	M	12	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+/- <sup>2</sup>	-/-	-/-	+/-	-/-	CT	AA
9	F	28	25	30.8	250	+	+	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	CC	AA

\* Patients of the same family are represented by the same number.

F: female; M: male; Hcy: homocysteine; NA: data not available; CNS: central nervous system, (+) present, (-) absent.

**1:** Patients 1a and 4 presented cerebrovascular events, and patients 5 and 9 presented deep venous thrombosis

**2:** In patients 1a, 1b, 1c, and 8, mutation p.I278T was found in cis with insertion c.844ins68, which characterized it as being non-pathogenic.

**3:** Factor V Leiden

**Table 2.** Results of the biochemical assessment, bone densitometry, and body composition by anthropometry and BIA (n=8)

<i>Patient</i>	<i>Hcy</i> ( $\mu\text{mol/L}$ )	<i>Met</i>	<i>Cys</i>	<i>T Score – bone densitometry</i>		<i>Height</i> ( <i>m</i> )	<i>BMI</i> ( $\text{kg/m}^2$ )		<i>Anthropometry</i>		<i>BIA</i>	
				<i>Spine</i>	<i>Femur</i>		<i>Classification</i>	<i>% Body Fat</i>	<i>Classification*</i>	<i>% Body Fat</i>	<i>Classification*</i>	
1a	186.64	88.5	354.63	0.9	-0.9	1.74	20.54	Eutrophy	16.84	Intermediate	19.72	Intermediate
1b	322.23	630.5	138.82	-1.4	-1.3	1.64	17.25	Underweight	17.83	Low	22.56	Low
1c	321.73	593.3	124.97	-2.6	-1.9	1.62	17.37	Underweight	19.25	Low	18.69	Low
2	109.76	624.6	226.49	-0.5	-0.8	1.73	20.38	Eutrophy	22.76	Low	18.96	Low
3	10.82	110.3	354.63	-1.3	NA	1.78	21.28	Eutrophy	14.7	Intermediate	14.87	Intermediate
4	42.71	26.08	390.81	-1.4	0.2	1.68	23.03	Eutrophy	20.1	Intermediate	10.36	Low
5	233.86	915.3	206.93	-4.5	-2.4	1.80	18.95	Eutrophy	12.84	Intermediate	15.27	Intermediate
9	48.65	69.2	349.62	NA	NA	1.78	21.68	Eutrophy	19.7	Low	29.8	Intermediate

\*Patients classified as having low body fat include patients with low and not recommend levels of body fat.

Hcy: homocysteine, Met: methionine, Cys: cysteine, NA: data not available, BMI: body mass index; BIA: electrical bioimpedance

Reference values of: Hcy: 5-15 $\mu\text{mol/L}$ ; Met: 5-3 $\mu\text{mol/L}$ ; Cys: 174-378 $\mu\text{mol/L}$  (Skovby 2003). Hcy target values for the treatment of classical homocystinuria are <20 $\mu\text{mol/L}$  for pyridoxine-responsive patients and <60 $\mu\text{mol/L}$  for the remaining patients (Wilcken 2006).



## 6. CONCLUSÕES

### **Objetivo primário 1. Caracterizar a composição corporal de pacientes com homocistinúria clássica por meio de antropometria e de bioimpedância elétrica.**

Encontramos cinco pacientes com baixo percentual de gordura por pelo menos um dos métodos enquanto que, pelo IMC, dois apresentavam baixo peso. Os resultados sugerem que a redução na massa adiposa é frequente em pacientes com homocistinúria clássica e independe da redução de massa corporal total.

### **Objetivo primário 2. Avaliar a frequência de mutações comuns nos genes *CBS*, *MTHFR* e *F5* em pacientes brasileiros com homocistinúria clássica.**

No gene *CβS*, apenas uma das mutações patogênicas pesquisadas foi identificada (p.I278T), e somente em um alelo. Esta baixa frequência de mutações comuns sugere que esta população seja portadora de mutações raras ou privadas. A frequência dos polimorfismos nos genes *CβS*, *MTHFR* e *F5* foi semelhante ao relatado na literatura.

### **Objetivo secundário 1. Relacionar os achados genéticos com dados clínicos - responsividade à piridoxina, história de evento tromboembólico - e bioquímicos: níveis séricos de cisteína, metionina e homocisteína.**

Não foi possível relacionar o genótipo da *CβS* com a responsividade à piridoxina, uma vez que apenas um alelo mutado foi detectado. Considerando a amostra total, não foi encontrada relação entre mutações nos genes *MTHFR* e *F5* e a gravidade do fenótipo. O pequeno tamanho amostral e o desconhecimento das mutações patogênicas na *CβS* limitaram esta avaliação.

### **Objetivo secundário 2. Avaliar a relação entre o percentual de gordura corporal e o índice de massa corporal com os níveis séricos de cisteína, metionina e homocisteína.**

Não foi encontrada correlação entre o percentual de gordura total e os níveis de cisteína, metionina e homocisteína. No entanto, a forte relação inversa entre IMC e os níveis de

metionina e homocisteína e a relação positiva do IMC com cisteína demonstra o efeito significativo da deficiência de C $\beta$ S na massa corporal. A falta de relação entre percentual de gordura e os metabólitos pode ter ocorrido pelos seguintes motivos: erros relacionados aos métodos, alterações concomitantes em outros compartimentos corporais (como massa muscular) ou distribuição anormal do tecido adiposo. Esta última hipótese é suportada pela relação encontrada entre cisteína e DCT (que reflete o tecido adiposo de membros superiores) e relatos da literatura, que descrevem baixo conteúdo de tecido adiposo subcutâneo em membros de pacientes com homocistinúria clássica.

**Objetivo secundário 3. Relacionar os níveis de cisteína, homocisteína e metionina e o percentual de gordura com os escores T de fêmur e coluna mensurados por densitometria óssea.**

Não foi encontrada relação entre o percentual de gordura e os escores T da densitometria. Houve tendência do escore T de fêmur correlacionar-se positivamente com cisteína e negativamente com homocisteína, e é provável que a falta de significância tenha ocorrido pelo tamanho amostral (apenas 6 pacientes tinham resultado do escore T de fêmur).

**Objetivo secundário 4. Determinar a concordância dos dois métodos utilizados para avaliação da composição corporal (antropometria e bioimpedância elétrica).**

Observou-se concordância mediana entre os testes, sendo que dois pacientes apresentaram resultados conflitantes. Não foi possível estabelecer o melhor método a ser utilizado nesta população, e novos estudos serão necessários para identificar qual o método mais acurado.

## 7. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A relação entre o metabolismo alterado da homocisteína e a adiposidade foi descrita recentemente em indivíduos saudáveis e em modelo animal de homocistinúria clássica. Nosso estudo é inédito na investigação de alterações na composição corporal (adiposidade) em pacientes com homocistinúria clássica. Infelizmente, os métodos utilizados não são livres de erro, e isto pode ter subestimado o real efeito da deficiência de  $C\beta S$  na massa adiposa. A utilização de métodos de imagem pode melhorar a acurácia do teste e permite a avaliação de outros compartimentos corporais, especialmente massa magra. O alto custo e limitada disponibilidade desta técnica inviabilizaram seu uso nesta avaliação inicial.

Embora nosso estudo não tenha demonstrado relação entre a massa adiposa e a densidade mineral óssea, evidências sugerem que o efeito da cisteína na perda mineral óssea seja mediado pela massa corporal. A ampliação do tamanho amostral e análises longitudinais poderão demonstrar esta relação.

Uma das principais limitações de nosso estudo foi o tamanho amostral; no entanto, é preciso considerar que a homocistinúria clássica é uma doença genética rara (prevalência 1:344.000 indivíduos) e provavelmente subdiagnosticada. Já a hiperhomocisteinemia moderada é frequente na população e parece estar envolvida no desenvolvimento e progressão de diversas doenças, especialmente as cardiovasculares, que são a maior causa de morbimortalidade no mundo. Além de possíveis implicações no tratamento da homocistinúria clássica, o estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na deficiência de  $C\beta S$  é importante também para o entendimento do modo de ação da homocisteína ou de outros metabólitos na saúde da população em geral.

A triagem por mutações comuns no gene  $C\beta S$  por PCR-RFLP revelou apenas uma mutação patogênica. Uma vez que esta estratégia não se mostrou efetiva para detecção de mutações nesta amostra, procederemos ao sequenciamento do gene para identificação das mutações. Além disso, a inclusão de pacientes de outros centros do país poderá identificar o perfil de mutações no gene  $C\beta S$  de pacientes brasileiros com homocistinúria clássica.

Os resultados discordantes encontrados na família 1, relativos à dupla mutação c.[833T>C;844ins68] no gene  $C\beta S$ , foram confirmados por meio de repetição de PCR-RFLP em amostras diferentes e também por sequenciamento da região afetada (apêndice I e II). Enquanto que a mãe e os pacientes 1a e 1b eram heterozigotos, a paciente 1c era homozigota para a inserção; a homozigotidade de 1c foi um achado inesperado, visto que 1a, 1b e 1c deveriam ser portadores das mesmas mutações patogênicas, e que, considerando os resultados

encontrados em 1a e 1b, uma das mutações patogênicas deveria estar localizada no alelo com a inserção e a outra mutação patogênica no alelo sem a inserção. O DNA do pai não era disponível para análise, mas tanto ele quanto a mãe não eram afetados. Estudos adicionais serão realizados nesta família para excluir hipóteses como falsa paternidade/maternidade ou dissomia uniparental na paciente 1.

A partir dos resultados deste estudo, planejamos desenvolver os seguintes trabalhos junto a nosso grupo de pesquisa:

- Avaliar a composição corporal por outros métodos, especialmente métodos de imagem como DXA. Além da quantificação da massa adiposa e massa livre de gordura, este método permite ainda a avaliação simultânea da densidade mineral óssea.
- Realizar sequenciamento dos éxons codificantes do gene *CβS* a fim de identificar as mutações patogênicas em nossa amostra.
- Identificar e estudar outros genes potencialmente modificadores de fenótipo e/ou relacionados à resposta terapêutica.
- Realizar estudos genéticos na família 1 com o objetivo de investigar a causa dos resultados discordantes observados nos três irmãos afetados.

## ANEXO I

## Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – PACIENTES HCPA

Projeto: AVALIAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE PACIENTES COM HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA

Pesquisador responsável: **Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS. Telefone: (51) 33598011.**

Prezado Paciente ou responsável,

A homocistinúria é uma doença hereditária na qual um aminoácido chamado homocisteína não consegue ser adequadamente transformado em outras substâncias em nosso corpo. Essa doença é determinada por uma alteração genética que faz com que uma molécula (chamada enzima) seja defeituosa e não consiga quebrar a homocisteína.

Este estudo tem como objetivo realizar a avaliação clínica e genética de pacientes com homocistinúria clássica. Acredita-se que os resultados desta pesquisa possam melhorar o conhecimento sobre a doença, o que pode contribuir para a melhoria no diagnóstico e tratamento dela no futuro.

Caso você decida participar desta pesquisa, o seu prontuário será consultado a fim de que sejam obtidas informações sobre seu diagnóstico, tratamento e resultados de exames já realizados. Durante uma das suas consultas ambulatoriais, também será realizada coleta de sangue para análise do DNA e de outros exames laboratoriais. Através da análise de DNA, serão pesquisadas as possíveis mutações causadoras da doença. Além disso, caso você permita, parte do sangue coletado será armazenado para futuras análises.

Você concordou que, se restar algum material coletado após a realização dos exames previstos neste estudo, este material poderá ser armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros, desde que eu revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros:

- ( ) Sim, eu concordei.  
 ( ) Não, eu não concordei. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado.

O estudo também prevê a realização do exame de bioimpedância elétrica. Este é um exame não invasivo e não doloroso utilizado para avaliar a composição corporal (quantidade de gordura e de massa muscular). Existem hipóteses de que indivíduos com homocistinúria possam ter alteração na composição corporal, podendo apresentar baixo teor de gordura.

Também serão aferidos peso, altura e outras medidas corporais, chamadas pregas cutâneas. Estas medidas serão utilizadas para complementar os dados da bioimpedância.

Estima-se que o tempo para realização destas medidas (bioimpedância, pregas e coleta de sangue) seja de aproximadamente 45 minutos.

Não haverá despesas ou ressarcimento para os participantes da pesquisa.

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

24 / 08 / 2011

### RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (a pele pode ficar roxa e pode ocorrer dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. A bioimpedância elétrica utiliza corrente elétrica de baixa voltagem, que não acarreta riscos para o corpo humano. O preparo para o exame exige algumas medidas, como evitar alimentos como chá e café, jejum de no mínimo duas horas, evitar exercícios físicos intensos e beber bastante água.

### DÚVIDAS

Em caso de dúvidas em relação à pesquisa, você deve contatar a Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz (fone 51-99017418 ou 33598011), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Também poderá ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA – fone 51 3359-7640.

### RECUSA OU DESCONTINUIÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isso não afetará seu tratamento no HCPA. Sua participação pode ser interrompida a qualquer momento por você, e não havendo qualquer tipo de prejuízo no seu atendimento normal.

### CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Caso alguma informação deste estudo seja de seu interesse, faremos o possível para informá-lo.

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Responsável legal:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos e procedimentos para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Porto Alegre, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome e Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

**VERSÃO APROVADA**

24 / 08 / 2017  
11.0386

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido –  
PACIENTES EXTERNOS (Não acompanhados no HCPA)**

**Projeto:** AVALIAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE PACIENTES COM HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA

Pesquisador responsável: **Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS. Telefone: (51) 33598011.

Prezado Paciente ou responsável,

A homocistinúria é uma doença hereditária na qual um aminoácido chamado homocisteína não consegue ser adequadamente transformado em outras substâncias em nosso corpo. Essa doença é determinada por uma alteração genética que faz com que uma molécula (chamada enzima) seja defeituosa e não consiga quebrar a homocisteína.

Este estudo tem como objetivo realizar a avaliação clínica e genética de pacientes com homocistinúria clássica. Acredita-se que os resultados desta pesquisa possam melhorar o conhecimento sobre a doença, o que pode contribuir para a melhoria no diagnóstico e tratamento dela no futuro.

Caso você decida participar desta pesquisa, o seu prontuário será consultado a fim de que sejam obtidas informações sobre seu diagnóstico, tratamento e resultados de exames já realizados. Durante uma das suas consultas, também será realizada coleta de sangue para análise do DNA. Através da análise de DNA, serão pesquisadas as possíveis mutações causadoras da doença. Além disso, caso você permita, parte do sangue coletado será armazenado para futuras análises.

Você concordou que, se restar algum material coletado após a realização dos exames previstos neste estudo, este material poderá ser armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros, desde que eu revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros:

(  ) Sim, eu concordei.

(  ) Não, eu não concordei. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado.

Estima-se que o tempo para realização desta medida (coleta de sangue) seja de aproximadamente 15 minutos.

Não haverá despesas ou ressarcimento para os participantes da pesquisa.

**RISCOS E DESCONFORTOS**

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (a pele pode ficar roxa e pode ocorrer dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado.

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

**VERSÃO APROVADA**

24 / 08 / 2011

11.0386

**DÚVIDAS**

Em caso de dúvidas em relação à pesquisa, você deve contatar a Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz (fone 51-99017418 ou 33598011), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Também poderá ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA – fone 51 3359-7640

**RECUSA OU DESCONTINUIÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO**

Sua participação é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isso não afetará seu tratamento. Sua participação pode ser interrompida a qualquer momento por você, e não havendo qualquer tipo de prejuízo no seu atendimento normal.

**CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES**

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Caso alguma informação deste estudo seja de seu interesse, faremos o possível para informá-lo.

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Responsável legal:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos e procedimentos para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome e Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

**VERSÃO APROVADA**

24 / 08 / 2011

11.0386





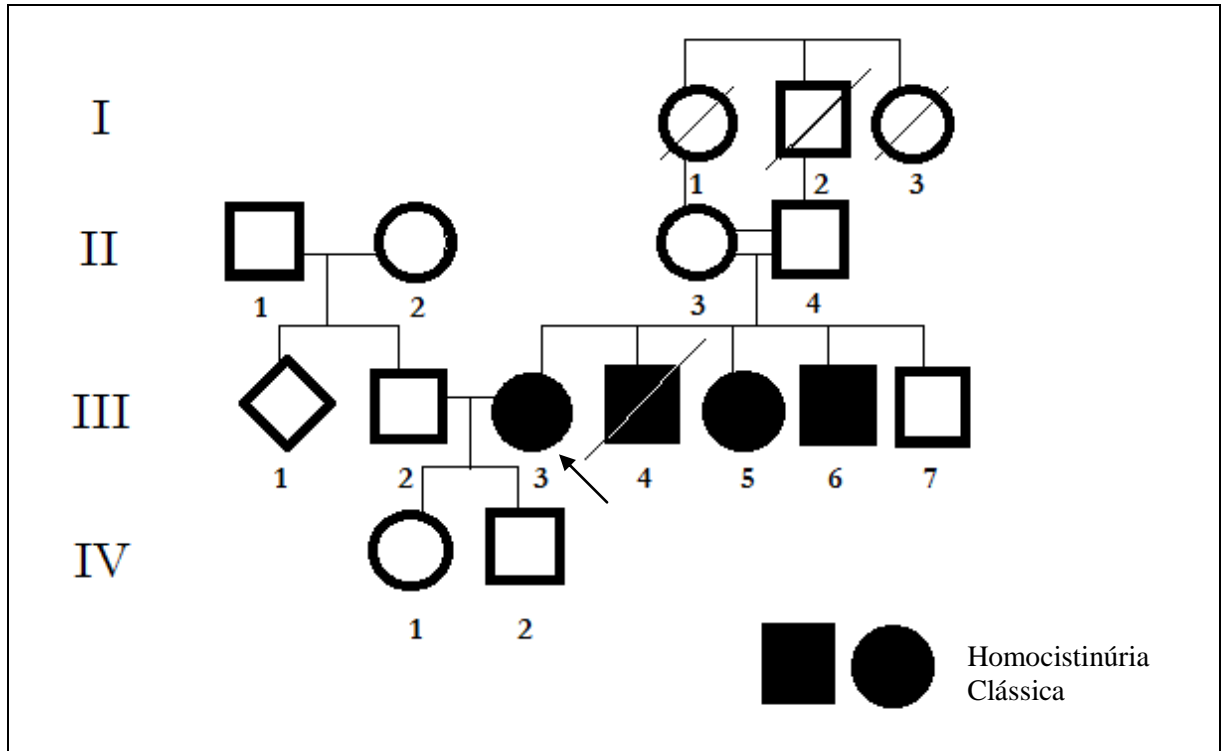
## ANEXO II

### **Instruções para realização do exame de bioimpedância elétrica**

1. Ingerir no mínimo 8 copos de água (2 litros) no dia anterior à realização do exame.
2. Não fazer ginástica ou exercícios vigorosos no dia anterior ao exame.
3. Não ingerir 72h (3 dias) antes do exame álcool, chá, café, refrigerantes, chocolates e bebidas energéticas que contenham cafeína.
4. Retirar jóias, relógio ou outros objetos metálicos no dia da realização do exame.
5. Não comer até duas horas antes do teste.
6. Entre as mulheres, este teste não deve ser feito no período pré-menstrual.

## APÊNDICE I

Heredograma da família 1.



Legenda: II3, genótipo c.[833T>C;844ins68]/[-]

III3 (paciente 1a), genótipo c.[833T>C;844ins68]/[-]

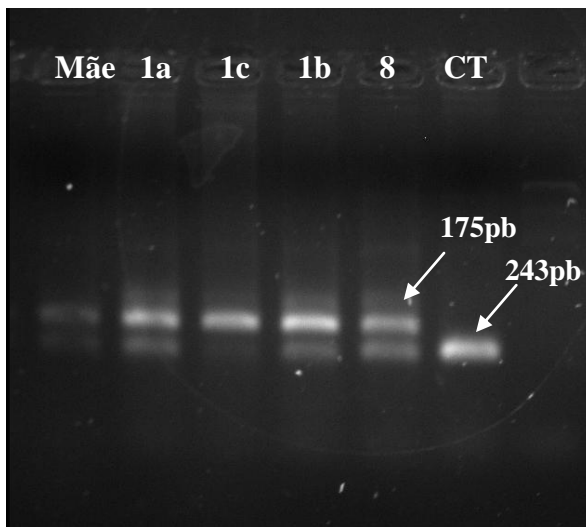
III5 (paciente 1c), genótipo c.[833T>C;844ins68]/c.[833T>C;844ins68]

III6 (paciente 1b), genótipo c.[833T>C;844ins68]/[-]

## APÊNDICE II

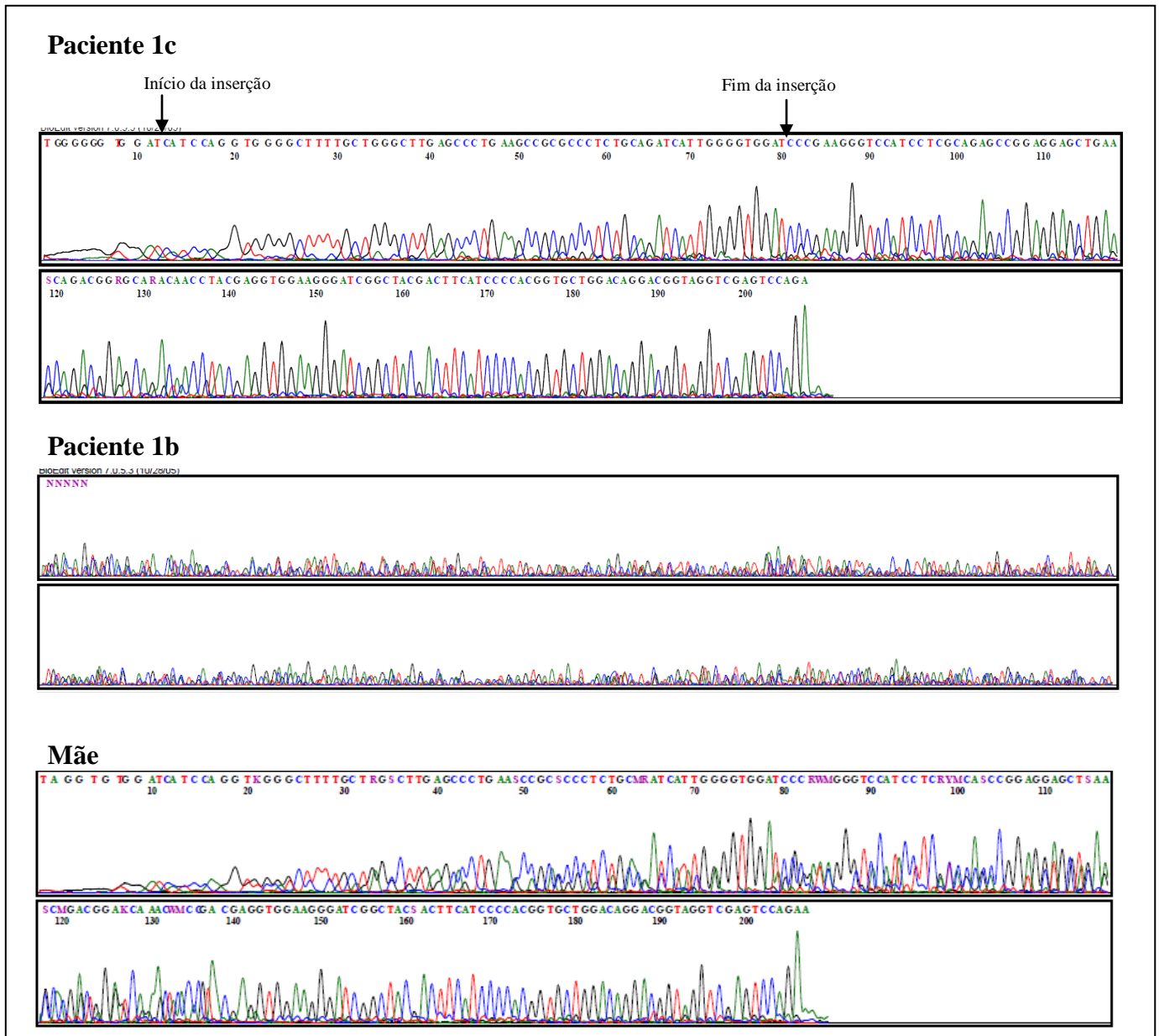
### Resultado da avaliação do éxon 8 do gene *CβS* por PCR e sequenciamento.

1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do éxon 8. A presença de banda dupla indica heterozigose para o polimorfismo c.844ins68.



Na ordem: mãe (família 1), paciente 1a, 1c, 1b, controle positivo (paciente 8) e controle negativo (CT). As bandas de 175 e 243pb (com inserção) são identificadas na figura.

## 2. Resultado do sequenciamento da paciente 1c, 1b e da mãe.



Na mãe e no paciente 1b, a sobreposição de bandas indica a heterozigose para o polimorfismo c.844ins68, enquanto que na paciente 1c é possível identificar a sequência da inserção em homozigose.