

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Investigação de estresse oxidativo em pacientes  
portadores de homocistinúria antes e durante o  
tratamento

Camila Simioni Vanzin

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof Dr Moacir Wajner

Porto Alegre, 2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:Bioquímica

Investigação de estresse oxidativo em pacientes  
portadores de homocistinúria antes e durante o  
tratamento

Camila Simioni Vanzin

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof Dr Moacir Wajner

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas:Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à  
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2012

## AGRADECIMENTOS

À professora Carmen, muito obrigada pela orientação, pela compreensão, pelo incentivo constante na busca pela realização profissional, pela confiança depositada em mim e por todos esses anos de uma prazerosa convivência.

Ao professor Moacir, obrigada pelas importantes contribuições feitas nesse trabalho.

Aos amigos e colegas de pós-graduação Gi Biancini, Gi Negretto, Mano e Carol, obrigada pelas trocas de conhecimentos e angústias muitas vezes e por tantos momentos de alegria.

Aos atuais e ex-bolsistas Daiane, Izabella, Diana, Gilian, Jeniffer, obrigada pela ajuda.

Às colegas e amigas do Laboratório de Análise de Metabólitos do HCPA, Angela, Grazi, Marion e Dani, obrigada pela participação que cada uma teve nesse trabalho e pelos bons momentos que passamos juntas.

Ao PPG Ciências Biológicas:Bioquímica da UFRGS e ao CNPq, obrigada por tornarem possível a concretização desse sonho.

A todos os funcionários do Serviço de Genética Médica do HCPA, pela fundamental participação na realização deste trabalho, em especial ao Juarez, pela separação das amostras.

Aos pacientes e pais de pacientes envolvidos nesse estudo, pela compreensão e pela confiança que nos é depositada.

À minha família, minha gratidão pelo apoio que me foi dado nesse período tão difícil da minha vida. Tudo fica mais fácil quando enfrentamos nossos problemas unidos.

Ao Juliano, obrigada por ser sempre meu companheiro de horas boas e ruins e meu grande incentivador.

Aos amigos, obrigada pela torcida.

A Deus, obrigada pela proteção e pela presença na minha vida.

“Menor que meu sonho não posso ser.”

Lindolf Bell

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>4</b>
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	4
1.2 HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA.....	5
1.3 OUTRAS FORMAS DE HIPER-HOMOCISTEINEMIA.....	11
1.4 RADICAIS LIVRES.....	12
1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	13
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	15
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E HOMOCISTINÚRIA.....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 GERAL.....	19
2.2 ESPECÍFICOS.....	19
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 CAPÍTULO I - ARTIGO 01.....	20
3.2 CAPÍTULO II - ARTIGO 02.....	27
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
<b>ANEXO 1</b> - Lista de Figuras.....	<b>62</b>
<b>ANEXO 2</b> - Parecer da Comissão Científica e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA.....	<b>63</b>
<b>ANEXO 3</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Pacientes com Homocistinúria.....	<b>64</b>
<b>ANEXO 4</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Indivíduos Saudáveis (Controles).....	<b>66</b>
<b>ANEXO 5</b> – Instruções do periódico Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.....	<b>68</b>

## RESUMO

A homocistinúria é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos causado na maioria dos casos pela deficiência na atividade da enzima cistationina- $\beta$ -sintase. Como resultado da deficiência enzimática, ocorre acúmulo de homocisteína (Hcy) e metionina nos fluidos biológicos, o que leva a uma variedade de manifestações clínicas, envolvendo muitos órgãos e tecidos, mas principalmente os olhos, os ossos, o sistema cardiovascular e o sistema nervoso central. Como demonstrado por estudos em pacientes e em modelos animais, o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia de vários erros inatos do metabolismo. Essa condição pode ser causada por uma produção aumentada de espécies reativas, por uma falha nas defesas antioxidantes ou por ambos. Como consequência, o dano oxidativo às biomoléculas é gerado. Estudos em modelos animais demonstram que há uma relação entre Hcy e estresse oxidativo, mas poucos estudos existem avaliando o estresse oxidativo em pacientes portadores de homocistinúria. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar importantes parâmetros de estresse oxidativo em pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico, em pacientes homocistinúricos em tratamento e em indivíduos saudáveis. Nós verificamos um aumento significativo nos níveis de grupamentos carbonilas e nos níveis de malondialdeído, bem como uma diminuição significativa de grupamentos sulfidrilas e do status antioxidante total no plasma de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico, em relação aos controles. Pacientes em tratamento apresentaram uma redução significativa do conteúdo de malondialdeído e das concentrações de Hcy e metionina em relação ao grupo diagnóstico. Além disso, foi demonstrada uma correlação significativa negativa entre os níveis de grupamentos sulfidrilas e as concentrações de Hcy e uma correlação significativa positiva entre os níveis de malondialdeído e as concentrações de Hcy. Posteriormente, foram verificados níveis aumentados de dano ao DNA em pacientes homocistinúricos tratados em relação aos controles. Adicionalmente, foi demonstrado pelo estudo *in vitro*, um efeito concentração dependente da Hcy sobre o dano ao DNA. Avaliados em conjunto, nossos resultados indicam que o estresse oxidativo pode exercer um papel importante na fisiopatologia da homocistinúria e que isso ocorre provavelmente devido às altas concentrações de Hcy encontradas nesses pacientes. Novas abordagens terapêuticas, como o uso de antioxidantes, poderia ser uma alternativa para atingir melhores resultados no tratamento de pacientes homocistinúricos. Além disso, um diagnóstico precoce e, conseqüentemente, um tratamento precoce, poderia evitar que os pacientes permanecessem por longo tempo submetidos à exposição de altas concentrações de Hcy.

## ABSTRACT

Homocystinuria is an inherited error of metabolism of amino acids caused in most cases by deficiency of cystathionine  $\beta$ -synthase. As result of enzymatic deficiency, occur accumulation of homocysteine (Hcy) and methionine in biological fluids, which leads to a variety of clinical manifestations, involving many organs and tissues, but mainly the eyes, the bones, the cardiovascular system and the central nervous system. As demonstrated by studies involving patients and animal models, the oxidative stress may be involved in pathophysiology of various inherited errors of metabolism. This condition may be caused by an increased production of reactive species, by a fail in antioxidant defense, or both. Consequently, the oxidative damage to biomolecules is generated. Studies in animal models have been shown a relationship between Hcy and oxidative stress, but scarce studies exist evaluating the oxidative stress in homocystinuric patients. Therefore, the aim of this study was to evaluate important parameters of oxidative stress in homocystinuric patients at diagnosis, in homocystinuric patients under treatment and in healthy individuals. We found a significant increase of carbonyl groups and malondialdehyde levels, as well as a reduction of sulfhydryl groups and total antioxidant status in plasma of homocystinuric patients at diagnosis relative to controls. Patients under treatment presented a significant reduction of the content of malondialdehyde, Hcy and methionine concentrations relative to patients at diagnosis. Furthermore, it was demonstrated a significant negative correlation between sulfhydryl group content and Hcy levels and a significant positive correlation between malondialdehyde and Hcy levels. It was demonstrated also increased levels of DNA damage in homocystinuric patients under treatment relative to controls. Additionally, it was verified by *in vitro* study, a concentration-dependent effect of Hcy on the DNA damage. Taken together, our data indicate that the oxidative stress may play a important role in pathophysiology of homocystinuria, probably due to high Hcy concentrations found in these patients. New therapeutic approaches, as the use of antioxidants, could be an alternative in order to improve the results of therapy in homocystinuric patients. Furthermore, an early diagnosis and, consequently, an early treatment, could avoid that the patients remain for a long time subjected to exposure of high concentrations of Hcy.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ATP - adenosina trifosfato

CAT - catalase

CBS - cistationina- $\beta$ -sintase

DNA – ácido desoxirribonucleico

EIM - erros inatos do metabolismo

ERO – espécies reativas de oxigênio

GPx - glutationala peroxidase

GR - glutationala redutase

GSH - glutationala reduzida

GSSG - glutationala oxidada

Hcy - homocisteína

4-HNE - 4-hidroxinonenal

HPLC - High performance liquid chromatography

ID - índice de dano

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LC-MS/MS - cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem

MDA - malondialdeído

PLP - piridoxal fosfato

SAH - S-adenosilhomocisteína

SAM - S-adenosilmetionina

SOD - superóxido dismutase

TAS – status antioxidante total

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

TRAP - potencial antioxidante reativo total



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Erros Inatos do Metabolismo

A primeira menção ao termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi feita por Garrod, em seus trabalhos publicados entre 1898 e 1902, sobre pacientes com alcaptonúria. Garrod definiu erros inatos como uma variação bioquímica rara, hereditária e perpétua, que ocorre devido a um bloqueio numa via enzimática secundário a perda da atividade de uma enzima (Childs et al., 2001).

Desde os estudos de Garrod, muitos pesquisadores têm detectado novas doenças metabólicas hereditárias e os EIM já foram descritos em praticamente todas as áreas do metabolismo humano normal. Os EIM podem ser classificados em três grupos: desordens que levam à intoxicação, desordens do metabolismo energético e desordens envolvendo moléculas complexas. O primeiro grupo inclui os EIM intermediário que levam à intoxicação aguda ou progressiva pelo acúmulo de compostos tóxicos próximos ao bloqueio metabólico. Fazem parte desse grupo os EIM de aminoácidos (homocistinúria, fenilcetonúria, doença da urina do xarope do bordo, tirosinemia, etc), a maioria das acidúrias orgânicas (metilmalônica, propiônica, isovalérica, etc), os defeitos do ciclo da uréia, as intolerâncias aos açúcares (galactosemia, intolerância hereditária a frutose, etc), as intoxicações por metais (Wilson, hemocromatose, etc) e as porfirias. O segundo grupo de EIM consiste em desordens com sintomas decorrentes à deficiência na produção de energia ou na sua utilização pelo fígado, coração, músculo, cérebro ou outros tecidos. Esse grupo pode ser dividido em defeitos energéticos citoplasmáticos e mitocondriais. Os defeitos mitocondriais são mais severos e compreendem as acidemias lácticas congênitas, as desordens da cadeia respiratória mitocondrial e os defeitos da oxidação de ácidos graxos e corpos cetônicos. Os defeitos citoplasmáticos são geralmente menos severos e incluem as desordens da glicólise, do metabolismo do

glicogênio, e da gliconeogênese, o hiperinsulinismo, as desordens do metabolismo da creatina e os defeitos da via das pentoses. Por fim, o terceiro grupo de EIM envolve organelas celulares e inclui doenças que alteram a síntese ou o catabolismo de moléculas complexas. Todas as desordens lisossomais, peroxissomais, de glicosilação e os erros inatos da síntese do colesterol pertencem a esse grupo (Saudubray et al., 2006).

Os EIM são individualmente raros, mas coletivamente numerosos. A maioria dos casos apresenta um padrão de herança autossômica recessiva, acometendo vários órgãos e sistemas (Jimenez-Sanchez et al., 2001). Nesse sentido, é de fundamental importância o reconhecimento precoce deste grupo de patologias, pois, muitas vezes a ocorrência de dano neurológico está relacionada ao tempo e ao período de exposição ao metabólito tóxico. Portanto, a intervenção adequada e imediatamente após o diagnóstico é, em muitos casos, determinante fundamental para definir o prognóstico dessas situações (Schwartz et al., 2008). O objetivo do tratamento é restaurar a homeostase química e fisiológica, o que pode ser alcançado por meio de restrição do substrato acumulado através da dieta, reposição do produto deficiente, suplementação com coenzimas ou reposição enzimática (Treacy et al., 2001).

O presente trabalho está relacionado com um EIM dos aminoácidos, a homocistinúria.

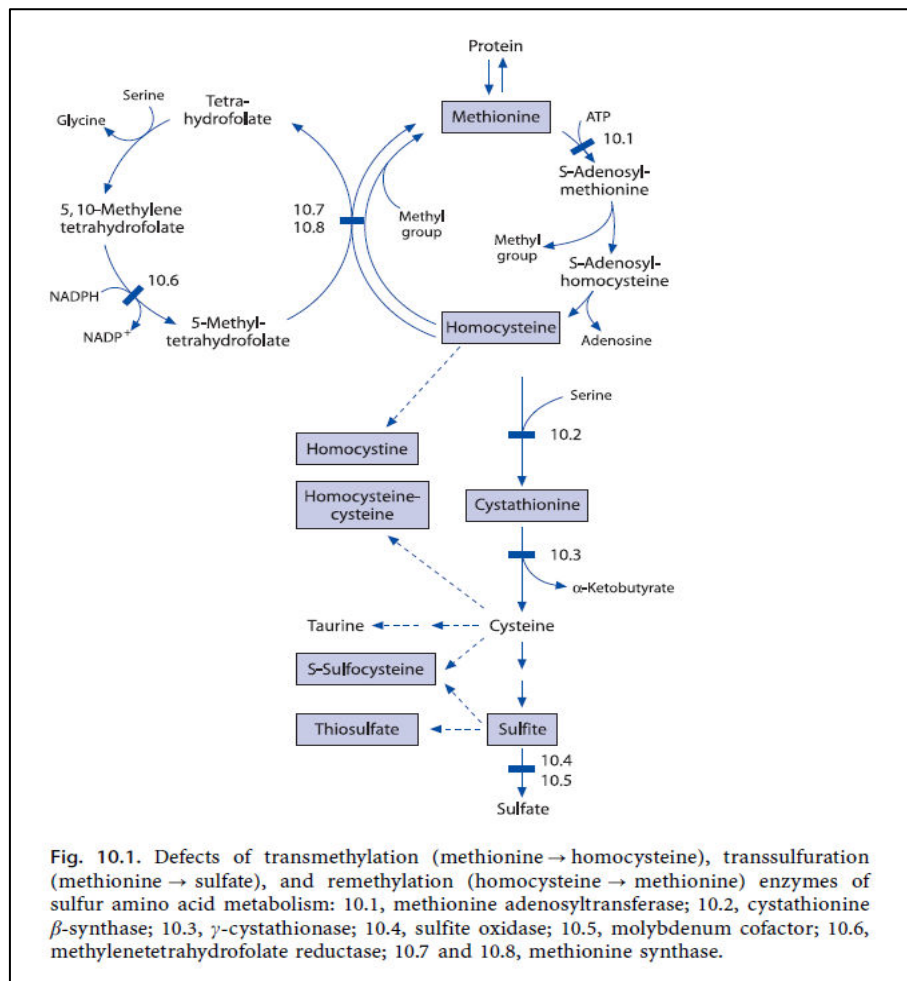
## **1.2 Homocistinúria Clássica**

A homocistinúria devido à deficiência da enzima cistationina- $\beta$ -sintase (CBS) é conhecida como homocistinúria clássica e foi primeiramente descrita por Carson e Neill (1962) e mais tarde por Gerritsen et al. (1962). Como consequência do bloqueio enzimático, os aminoácidos homocisteína (Hcy) e metionina e uma variedade de outros

metabólitos da Hcy acumulam-se no organismo e são excretados na urina dos pacientes afetados (Mudd et al., 2001).

A Hcy é um aminoácido contendo um grupo tiol, cujo metabolismo está na intersecção de duas vias metabólicas: remetilação e transulfuração (Figura 1). Na via de remetilação, a Hcy recebe um grupo metil, que pode ser doado pelo N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolato ou pela betaína, para formar metionina. A reação com N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolato ocorre em todos os tecidos e é vitamina B<sub>12</sub> dependente, enquanto a reação com betaína é confinada principalmente ao fígado e é vitamina B<sub>12</sub> independente. Uma considerável proporção de metionina é, então, ativada pelo ATP para formar S-adenosilmetionina (SAM), que serve primariamente como doador de grupos metil a uma variedade de aceptores. S-adenosilhomocisteína (SAH), o produto dessas reações de metilação, é subsequentemente hidrolisada, gerando Hcy, que então se torna disponível para iniciar um novo ciclo de transferência de grupos metil. É importante notar que essa hidrólise é uma reação reversível que favorece a síntese de SAH, e que elevadas concentrações celulares desse metabólito acompanham todas as formas de hiper-homocisteinemia. Na via de transulfuração, a Hcy se condensa com a serina para formar cistationina em uma reação irreversível catalisada pela enzima dependente de piridoxal fosfato (PLP), CBS. A cistationina é hidrolisada por uma segunda enzima dependente de PLP,  $\gamma$ -cistationase, para formar cisteína e  $\alpha$ -acetobutirato. O excesso de cisteína é oxidado a taurina ou a sulfatos inorgânicos, que são excretados na urina. Então, em adição à síntese de cisteína, a via de transulfuração efetivamente cataboliza o excesso de Hcy. Na homocistinúria clássica, há um bloqueio na via de transulfuração devido à inibição da enzima CBS. Sob essas condições, a taxa da síntese de metionina é aumentada, levando a um temporário aumento na concentração de SAM intracelular. Esse aumento continuará até que o nível desse

metabólito seja suficiente para inibir por feedback negativo a enzima N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-tetraidrofolato redutase (MTHFR), tornando assim, a via de remetilação inibida. Conseqüentemente, ambas as vias do metabolismo da Hcy são prejudicadas e isso resulta em hiper-homocisteinemia severa (Selhub, 1999).



Adaptado de Skovby, 2003.

A patofisiologia da deficiência de CBS ainda não está completamente elucidada, mas o acúmulo de Hcy provavelmente desempenha um papel principal na determinação de algumas das mais relevantes manifestações clínicas. Os olhos, o esqueleto, o sistema nervoso central e o sistema vascular estão envolvidos na apresentação clínica típica. O paciente é normal ao nascimento e, se não tratado, progressivamente desenvolve o quadro clínico completo. Luxação das lentes oculares (ectopia lentis), miopia e

glaucoma são frequentes, severas e características complicações oculares. Deslocamento e degeneração da retina podem eventualmente aparecer. Ectopia lentis é detectada na maioria dos pacientes não tratados entre 5 e 10 anos de idade e em quase todos os pacientes não tratados no final da quarta década de vida e representa frequentemente uma pista para o diagnóstico. Osteoporose é quase invariavelmente detectada, pelo menos após a infância. Como na Síndrome de Marfan, os pacientes homocistinúricos tendem a ser altos, com afinamento e alongamento (dolicoostenomelia) dos ossos longos perto da puberdade e com aracnodactilia, presente em cerca de metade dos pacientes. Atraso no desenvolvimento e retardo mental afetam cerca de 60% dos pacientes em graus variáveis de severidade. Convulsões e distúrbios psíquicos são também reportados em aproximadamente metade dos casos. Sinais neurológicos focais podem ser uma consequência de acidentes cérebro-vasculares. Complicações tromboembólicas, ocorrendo em artérias e veias de todas as partes do corpo, constituem a principal causa de morbidade e mortalidade. O prognóstico é influenciado pelo local e pela extensão da oclusão vascular. Tromboflebitis e embolismo pulmonar são os mais comuns acidentes vasculares encontrados em pacientes homocistinúricos (Andria et al., 2006).

A presença de um ou mais dos sinais clínicos típicos podem levar a suspeita de homocistinúria. No entanto, o diagnóstico definitivo é baseado na presença de certas anormalidades bioquímicas (Mudd et al, 2001). No plasma normal, a Hcy existe em várias formas: a forma reduzida (aproximadamente 1%), ligada a resíduos de cisteína em proteínas (aproximadamente 70%) e ligada à cisteína livre, formando o dissulfeto misto cisteína-Hcy (aproximadamente 30%). Quando os níveis de Hcy estão elevados, o dissulfeto homocistina (Hcy-Hcy) é formado. Todas essas formas podem ser convertidas em Hcy pela redução química e, então, medidas como Hcy total (tHcy) (Fowler, 2008). Na deficiência de CBS, a presença de homocistina na urina é comum e

pode ser suspeitada quando a reação urinária do cianeto-nitroprussiato é positiva. Além disso, aminoácidos devem ser medidos no plasma ou soro de todos os indivíduos suspeitos. Na homocistinúria devido a deficiência de CBS, essa medida deve revelar níveis plasmáticos elevados de tHcy, usualmente acompanhados por uma concentração marcadamente reduzida de cisteína. Além disso, uma concentração aumentada de metionina é encontrada na maioria dos pacientes. A hipermetioninemia é um achado importante já que, nos defeitos metabólicos da metilação da Hcy (que são causas alternativas de homocistinúria) a concentração sanguínea de metionina é baixa ou normal (Mudd et al., 2001).

Vários métodos são empregados para a determinação da tHcy no plasma, incluindo cromatografia líquida de alta performance (HPLC), eletroforese capilar, cromatografia gasosa com ou sem espectrometria de massas, imunoensaios e cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) (Fowler, 2008). A tecnologia de LC-MS/MS representa um significativo avanço tecnológico para a detecção de aminoácidos e outras moléculas de importância no diagnóstico de doenças genéticas, com alta sensibilidade e especificidade (Sweetman, 1996).

A deficiência de CBS apresenta herança autossômica recessiva. A maioria dos pacientes homocistinúricos é heterozigoto composto, com exceção dos homozigotos I278T/ I278T e G307S/ G307S. A mutação I278T usualmente confere responsividade ao tratamento com vitamina B<sub>6</sub>, já a mutação G307S parece ser incompatível com a responsividade a essa vitamina (Mudd et al., 2001). Vários países realizam triagem neonatal para a deficiência de CBS. A triagem baseia-se basicamente na detecção de hipermetioninemia, a qual nem sempre está presente ao nascimento, podendo levar a uma significativa perda de pacientes (Skrovby, 2003). Isso pode parcialmente explicar porque a frequência geral observada para deficiência de CBS é baixa, variando de

1:200.000 a 1:335.000 nascidos vivos (Mudd et al., 2001). Países como Noruega e Irlanda apresentem frequências mais elevadas, como 1:6.400 e 1:65.000 nascidos vivos, respectivamente (Yap e Naughten, 1998; Refsum et al., 2004).

A importância do diagnóstico da homocistinúria devido à deficiência de CBS está relacionada ao fato de o tratamento, quando instituído na infância, poder reduzir o risco cardiovascular em 80 a 90%. No entanto, ainda não está claro se esses resultados derivam inteiramente da diminuição dos níveis extremamente altos de Hcy pré-tratamento ou de algum outro aspecto do tratamento (Yap et al., 2001).

O tratamento na homocistinúria clássica tem dois objetivos principais: controlar ou eliminar as anormalidades bioquímicas e tratar as complicações. Sempre que possível, a terapia para alcançar o controle bioquímico deve começar antes que as manifestações clínicas ocorram, já que muitas dessas complicações são irreversíveis (Mudd et al., 2001).

A piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) na dose de aproximadamente 200mg/dia deve ser administrada nos indivíduos que demonstram ser responsivos a essa vitamina (B<sub>6</sub>-responsivos). A piridoxina também pode ser incluída no tratamento apesar da evidência de não responsividade, nesse caso é usada tipicamente nas doses de 100-200mg/dia. Os indivíduos B<sub>6</sub>-não responsivos requerem uma dieta restrita em metionina com frequente monitoramento metabólico. A maioria dos indivíduos B<sub>6</sub>-responsivos também requer uma dieta com restrição protéica para controle metabólico (Rao et al., 2008). Em um estudo internacional de grande porte, iguais proporções de pacientes foram classificadas como sendo responsivos e não responsivos à piridoxina (Mudd et al., 1985).

A betaína fornece um caminho alternativo de remetilação para converter o excesso de Hcy em metionina podendo, assim, ajudar a prevenir as complicações, particularmente a trombose (Lawson-Yuen e Levy, 2006). Ao converter Hcy em

metionina, a betaína diminui as concentrações plasmáticas de tHcy e Hcy livre, mas aumenta a concentração plasmática de metionina (Rao et al., 2008). Embora a betaína seja usualmente administrada via oral na dose de 6 – 9g/dia, a dose ótima ainda não está determinada (Schwahn et al., 2003).

O folato e a vitamina B<sub>12</sub> otimizam a conversão da Hcy em metionina pela metionina sintase, ajudando assim, a diminuir a concentração plasmática de Hcy. A dose usual de folato a ser administrada é de 5mg/dia. A vitamina B<sub>12</sub> é administrada como hidroxicobalamina na dose de 1mg intramuscular 1 vez por mês.

Como a homocistinúria é uma desordem genética, o monitoramento frequente dos níveis sanguíneos de Hcy deve ser realizado e a duração do tratamento deve ser por toda a vida. Os indivíduos afetados devem ser monitorados em intervalos regulares para detectar alguma complicação clínica que os mesmos possam desenvolver; neste caso, uma terapia apropriada para a complicação deve ser dada o mais rápido possível (Rao et al., 2008).

### **1.3 Outras Formas de Hiper-Homocisteinemia**

Além da deficiência de CBS, outros defeitos enzimáticos podem levar à homocistinúria. Entre esses estão incluídos defeitos de remetilação devido às deficiências das enzimas MTHFR e metionina sintase, bem como defeitos no metabolismo intracelular da cobalamina (Fowler, 2008). Os principais achados bioquímicos dos defeitos de remetilação são a alta excreção de homocistina na urina e a hiper-homocisteinemia com baixos ou relativamente normais níveis de metionina plasmática, o que diferencia essas desordens da homocistinúria clássica devido à deficiência de CBS, na qual os níveis de metionina plasmática estão elevados (Rosenblatt e Fenton, 2001).



Elevados níveis de Hcy também podem ocorrer em deficiências nutricionais de vitamina B<sub>12</sub> e folato. Vários medicamentos, tais como o composto antifolato metotrexato e o anestésico óxido nitroso podem interferir com o metabolismo da metionina e levar a leves aumentos de Hcy. Além disso, a função renal anormal também pode levar a níveis plasmáticos aumentados de Hcy (Fowler, 2008).

## 1.4 Radicais Livres

Um radical livre é uma espécie capaz de existência independente (daí o termo livre) que possui um ou mais elétrons desemparelhados, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. A presença de um ou mais elétrons desemparelhados usualmente torna a molécula altamente reativa, embora a reatividade química dos radicais livres varie amplamente. Existem muitos tipos de radicais livres nos sistemas biológicos. De fato, a molécula de oxigênio é um radical. A forma mais reativa do oxigênio, o oxigênio *singlet*, pode ser gerado por uma entrada de energia que rearranja os elétrons. Se um único elétron é fornecido ao oxigênio, o produto é o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). A adição de mais um elétron ao O<sub>2</sub><sup>•-</sup> forma a espécie reativa peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) inclui não somente os radicais livres, mas também alguns derivados não radicalares do oxigênio. Dessa forma, todo radical livre é uma ERO, mas nem toda ERO é um radical livre (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Os radicais livres extraem elétrons (usualmente como átomos de hidrogênio) de outros compostos para poder completar seus próprios orbitais, iniciando assim, uma reação em cadeia. O radical hidroxil (OH<sup>•</sup>) é provavelmente o mais potente entre as ERO. Esse radical inicia reações em cadeia que formam peróxidos lipídicos e radicais orgânicos. O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é também altamente reativo, mas possui solubilidade limitada em lipídeos. Entretanto, ele pode gerar o OH<sup>•</sup> por reação não-enzimática com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na

reação de Haber-Weiss. Metais de transição, tais como  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  catalisam a formação do  $\text{OH}^\cdot$  a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela reação não enzimática de Fenton. Devido ao fato de o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ser lipossolúvel, esse pode difundir pelas membranas e gerar o  $\text{OH}^\cdot$  em sítios localizados contendo  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ , tal como a mitocôndria (Smith et al., 2005).

Além das ERO, existem ainda as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de bromo e as espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), uma importante molécula sinalizadora em animais e plantas (Halliwell, 2006).

As ERO estão constantemente sendo formadas na célula; aproximadamente 3 a 5% do oxigênio consumido por um indivíduo são convertidos em radicais livres de oxigênio. Alguns são produzidos como produtos acidentais de reações enzimáticas normais, que escapam do sítio ativo de enzimas que contêm metais durante reações de oxidação. Outros, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , são produtos fisiológicos de oxidases nos peroxissomos. A produção deliberada de radicais livres tóxicos ocorre na resposta inflamatória. Medicamentos, radiação, poluentes do ar e outros agentes químicos, também podem aumentar a produção de radicais livres nas células (Smith et al., 2005).

## 1.5 Defesas Antioxidantes

O termo antioxidante é definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, significativamente atrasa ou previne a oxidação desse substrato. O termo substrato oxidável inclui quase toda molécula encontrada *in vivo* (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O sistema antioxidante inclui vários tipos de agentes. Por exemplo, agentes que removem cataliticamente as espécies reativas, como fazem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). A SOD remove o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por catalisar sua dismutação, uma vez que um  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é reduzido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  enquanto o outro é

oxidado a  $O_2$  (Halliwell e Gutteridge, 2007). Uma vez que o  $H_2O_2$  é formado, esse deve ser reduzido à  $H_2O$  para prevenir a formação do  $OH^\cdot$  pela reação de Fenton ou de Haber-Weiss. Uma das enzimas capaz de reduzir o  $H_2O_2$  é a CAT, a qual é encontrada principalmente nos peroxissomos, e em menor extensão no citosol e na fração microsomal da célula. As glutations-peroxidases existem como uma família de enzimas contendo selênio com algumas diferenças nas suas propriedades e na distribuição tecidual. Nas células, são encontradas principalmente no citosol e nas mitocôndrias, e são a principal maneira de remover do  $H_2O_2$  produzido fora dos peroxissomos (Smith et al., 2005). A GPx elimina o  $H_2O_2$  pelo acoplamento da sua redução à  $H_2O$  com a oxidação da glutatona reduzida (GSH). O produto dessa reação, glutatona oxidada (GSSG), consiste de duas GSH ligadas por uma ponte dissulfeto, e pode ser convertido novamente a GSH pela enzima glutatona redutase (GR) (Halliwell, 2006).

Outra linha de agentes antioxidantes atua diminuindo a formação de espécies reativas. Nessa categoria podem-se incluir proteínas que minimizam a disponibilidade dos pró-oxidantes, tais como íons ferro, íons cobre ou heme. Como exemplos estão transferrina, albumina, haptoglobina, hemopexina e ceruloplasmina. Proteínas que protegem biomoléculas contra o dano oxidativo por outros mecanismos, como fazem as chaperonas, também são consideradas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Compostos como os carotenóides, podem exercer efeitos antioxidantes, bem como de *quench* de oxigênio *singlet*. Carotenóides é um termo aplicado ao  $\beta$ -caroteno (o precursor da vitamina A) e aos compostos similares como zeaxantina e luteína (Smith et al, 2005).

Por fim, também fazem parte do sistema de defesa antioxidante aqueles agentes que são preferencialmente oxidados pelas espécies reativas a fim de preservar

biomoléculas mais importantes. São exemplos desse grupo GSH, bilirrubina, urato, albumina, plasmalogênios,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e ascorbato (vitamina C).

As defesas antioxidantes não são 100% efetivas, já que o dano oxidativo ao DNA, proteínas, lipídios e outras moléculas pode ser demonstrado nos sistemas vivos em ambiente aeróbio. Sendo assim, alguns autores classificam como defesa antioxidante os sistemas de reparo necessários para lidar com moléculas danificadas (reparo ao DNA) ou para degradar lipídios e proteínas danificados (Halliwell e Gutteridge, 2007).

## **1.6 Estresse Oxidativo**

Estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio no balanço pró-oxidante - antioxidante, em favor do primeiro, levando a dano celular potencial. Tal dano é frequentemente chamado de dano oxidativo e pode ser definido como o dano biomolecular causado pelo ataque de espécies reativas aos constituintes de organismos vivos. Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de:

- Níveis diminuídos de antioxidantes. Por exemplo, mutações levando a níveis diminuídos de defesas antioxidantes (GSH, SOD); depleção de antioxidantes da dieta e outros constituintes dietéticos essenciais.

- Produção aumentada de espécies reativas. Por exemplo, presença de toxinas que produzem espécies reativas; excessiva ativação dos sistemas naturais produtores de espécies reativas (ativação inapropriada de células fagocíticas nas doenças inflamatórias crônicas) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A célula pode responder de várias maneiras ao estresse oxidativo, dependendo do tipo celular em questão e da severidade do estresse oxidativo. Essas respostas podem ser:

- 1) *Proliferação aumentada.*

2) *Adaptação* da célula ou organismo por regulação positiva dos sistemas de reparo, os quais podem: (a) completamente proteger contra o dano; (b) proteger contra o dano em alguma extensão, mas não completamente; ou (c) super-proteger – as células tornam-se então resistentes aos altos níveis de estresse oxidativo impostos subsequentemente.

3) *Injúria celular*. Isso envolve dano a alguns ou todos marcadores moleculares: lipídeos, proteínas, carboidratos, etc.

4) *Senescência*. As células sobrevivem, mas não podem mais se dividir.

5) *Morte celular*. Após a injúria a célula pode: (a) se recuperar do dano oxidativo por reparo ou substituição das moléculas lesadas; (b) sobreviver com dano oxidativo persistente; ou (c) o dano oxidativo, especialmente ao DNA, pode desencadear morte por apoptose ou necrose (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Evidências de danos por radicais livres foram descritas em mais de 100 estados patológicos. Em alguns desses, o dano por radicais livres é a causa primária da doença; em outros, ele aumenta as complicações da doença (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As reações em cadeia que formam radicais livres e peróxidos lipídicos nas membranas exercem uma importante contribuição para o dano induzido por ERO. A peroxidação de lipídeos (lipoperoxidação) invariavelmente altera ou danifica a estrutura molecular lipídica. Quando os lipídeos danificados são constituintes de membranas biológicas, o arranjo coeso da bicamada lipídica e a organização estrutural estável são perdidos. Além da natureza autodestrutiva da lipoperoxidação de membrana, os aldeídos (tal como o malondialdeído) que são formados como produtos dessa reação, podem fazer ligações cruzadas com proteínas. A perturbação da integridade da membrana mitocondrial pode resultar na produção adicional de radicais livres.

Nas proteínas, os aminoácidos prolina, histidina, arginina, cisteína e metionina são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo. Como consequência do dano, as proteínas podem se fragmentar ou os resíduos podem formar ligações cruzadas com outros constituintes. Além disso, o dano oxidativo aumenta a susceptibilidade das proteínas à digestão proteolítica (Smith et al., 2005).

As ERO também são a principal fonte de dano ao DNA. O DNA é um alvo particularmente importante para a oxidação; o dano ao DNA gera várias classes de produtos que podem ser identificados, incluindo produtos de oxidação de bases e produtos de fragmentação (quebra de fita simples ou dupla), ligações cruzadas e produtos de fragmentação de açúcares (Cooke et al., 2006). A ligação inespecífica de  $Fe^{2+}$  ao DNA facilita a produção localizada do  $OH\cdot$ , o qual pode causar alterações de bases no DNA e rompimentos de fita (Smith et al., 2005). Além disso, foi sugerido que mutações no DNA celular desempenham um papel na etiologia de várias doenças. Ainda, a mutação ao DNA é uma etapa crucial na carcinogênese e elevados níveis de lesões ao DNA têm sido vistos em muitos tumores (Cooke et al., 2006).

## **1.7 Estresse Oxidativo e Homocistinúria**

Nos EIM, o estresse oxidativo pode ser causado pelo acúmulo de metabólitos tóxicos que levam à produção excessiva de radicais livres ou à depleção da capacidade antioxidante. Trabalhos recentes demonstram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia de vários EIM, como nas acidemias propriônica e metilmalônica (Fontella et al., 2000; Ribas et al., 2010a, 2010b); em aminoacidopatias, como na doença da urina do xarope do bordo (Bridi et al., 2005; Barschak et al., 2006, 2008; Mescka et al., 2011) e na fenilcetonúria (Sierra et al., 1998; Sirtori et al. 2005; Sitta et al., 2006, 2009, 2011); em desordens peroxissomais, como na

adrenoleucodistrofia ligada ao X (Vargas et al., 2004; Deon et al., 2006, 2007) e na mucopolissacaridose tipo II (Filippon et al., 2011a, 2011b ). Em relação à homocistinúria, estudos em modelos animais demonstram que há uma possível associação entre as altas concentrações de Hcy e a produção de espécies reativas, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo na homocistinúria (Streck et al., 2003; Robert et al., 2005; Matté et al., 2009; da Cunha et al., 2011). O estresse oxidativo vem sendo considerado um possível mecanismo através do qual a Hcy exerce seus efeitos tromboembólicos (Mudd et al., 2001). Acredita-se que as espécies reativas que são geradas durante a auto-oxidação da Hcy possam mediar a citotoxicidade endotelial da Hcy (Starkebaum e Harlan, 1986; Loscalzo, 1996). No entanto, existem poucos estudos na literatura avaliando em pacientes homocistinúricos o possível papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da homocistinúria.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Levando em consideração que dados na literatura mostram um possível papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da homocistinúria e, principalmente, que poucos estudos existem avaliando essa condição em pacientes portadores de homocistinúria, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar vários parâmetros de estresse oxidativo (dano a lipídeos, proteínas e DNA, bem como defesas antioxidantes) em plasma e sangue total de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico e durante o tratamento.

### **2.2 Objetivos específicos**

**Capítulo 1:** Avaliar parâmetros de estresse oxidativo, a saber, conteúdo de grupamentos carbonílicos, conteúdo de grupamentos sulfidrila, níveis de malondialdeído e status antioxidante total em pacientes com homocistinúria no momento do diagnóstico e durante o tratamento preconizado, bem como em indivíduos saudáveis. Correlacionar as concentrações plasmáticas de Hcy e de metionina com os parâmetros de estresse oxidativo avaliados.

**Capítulo 2:** Analisar o dano ao DNA em leucócitos de pacientes homocistinúricos tratados e de indivíduos saudáveis através do ensaio cometa. Avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de Hcy sobre o dano ao DNA em leucócitos.



### **3. RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados na forma de artigos científicos.

#### **3.1 Capítulo I – Artigo 01**

Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: A possible role for homocysteine.

Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Sitta, A.; Wayhs, C.A.Y.; Pereira, I.N.; Rockenbach, F.; Garcia, S.C.; Wyse, A.T.S.; Schwartz, I.V.D.; Wajner, M.; Vargas, C.R.

Periódico: Molecular Genetics and Metabolism

Status: Publicado



## Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: A possible role for homocysteine

Camila Simioni Vanzin<sup>a,b</sup>, Giovana Brondani Biancini<sup>a,b</sup>, Angela Sitta<sup>a,b</sup>, Carlos Alberto Yasin Wayhs<sup>b,c</sup>, Izabela Netto Pereira<sup>b</sup>, Francieli Rockenbach<sup>c</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>c</sup>, Angela Terezinha de Souza Wyse<sup>a</sup>, Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>b</sup>, Moacir Wajner<sup>a,b</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos 2700, Porto Alegre, RS, 90035-000, Brazil

<sup>b</sup> Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 May 2011

Received in revised form 16 June 2011

Accepted 16 June 2011

Available online 24 June 2011

#### Keywords:

Homocystinuria

Oxidative stress

Oxidative damage

Antioxidant defenses

Plasma

### ABSTRACT

Homocystinuria is an inherited disorder biochemically characterized by high urinary excretion of homocystine and increased levels of homocysteine (Hcy) and methionine in biological fluids. Affected patients usually have a variety of clinical and pathologic manifestations. Previous experimental data have shown a relationship between Hcy and oxidative stress, although very little was reported on this process in patients with homocystinuria. Therefore, in the present study we evaluated parameters of oxidative stress, namely carbonyl formation, malondialdehyde (MDA) levels, sulfhydryl content and total antioxidant status (TAS) in patients with homocystinuria at diagnosis and under treatment with a protein restricted diet supplemented by pyridoxine, folate, betaine, and vitamin B<sub>12</sub>. We also correlated plasma Hcy and methionine concentrations with the oxidative stress parameters examined. We found a significant increase of MDA levels and carbonyl formation, as well as a reduction of sulfhydryl groups and TAS in plasma of homocystinuric patients at diagnosis relatively to healthy individuals (controls). We also verified that Hcy levels were negatively correlated with sulfhydryl content and positively with MDA levels. Furthermore, patients under treatment presented a significant reduction of the content of MDA, Hcy and methionine concentrations relatively to patients at diagnosis. Taken together, the present data indicate that lipid and protein oxidative damages are increased and the antioxidant defenses diminished in plasma of homocystinuric patients, probably due to increased reactive species elicited by Hcy. It is therefore presumed that oxidative stress participates at least in part in the pathogenesis of homocystinuria.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Homocystinuria is an inherited metabolic disorder characterized by high levels of homocysteine (Hcy) in biological fluids. Cystathionine β-synthase (CBS) deficiency is the most frequently encountered cause of homocystinuria, but also genetic defects involving the enzymes methylene-H<sub>4</sub>folate reductase (MTHFR) and methionine synthase may lead to abnormal accumulation of homocysteine in biological fluids. In contrast to most cases of CBS deficiency, hypermethioninemia is absent in the latter conditions. CBS deficiency is inherited as an autosomal recessive trait. Some patients have small

residual activities of CBS, whereas in others this activity cannot be measured. Individual affected by CBS deficiency usually have a variety of clinical and pathologic abnormalities, such as ectopia lentis (dislocation of the ocular lens), osteoporosis, thinning and lengthening of the long bones, thromboembolism and mental retardation. Management of CBS deficiency has two major aims: control or elimination of biochemical abnormalities and supportive treatment of complications [1]. Treatment with the cofactor of CBS, pyridoxine (vitamin B<sub>6</sub>), at a dose of approximately 200 mg/day should be given to those shown to be B<sub>6</sub>-responsive. The majority of B<sub>6</sub>-responsive individuals also require a protein-restricted diet for metabolic control. B<sub>6</sub>-nonresponsive neonates require a methionine-restricted diet with frequent metabolic monitoring [2]. B<sub>6</sub>-responsive individuals generally have milder, or more slowly developing manifestations than those B<sub>6</sub>-nonresponsive [1]. In a large international survey, virtually equal proportions of patients were judged to be B<sub>6</sub>-responsive and B<sub>6</sub>-nonresponsive [3]. Treatment with betaine provides an alternate pathway to convert excess of homocysteine into methionine and may help to prevent complications, particularly thrombosis [4]. The dose of

*Abbreviations:* CBS, cystathionine β-synthase; Hcy, homocysteine; MTHFR, methylene-H<sub>4</sub>folate reductase; ROS, reactive oxygen species; MDA, malondialdehyde; TAS, total antioxidant status; Met, methionine; PBSC, protein-bound sulfhydryl groups.

\* Corresponding author at: Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Bairro: Bom Fim, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-003. Fax: + 55 51 3359 8309.

E-mail address: [crvargas@hcpa.ufrgs.br](mailto:crvargas@hcpa.ufrgs.br) (C.R. Vargas).

betaine used has been 6 to 9 g/day in two divided doses [5]. Furthermore, folate and vitamin B<sub>12</sub> optimize the conversion of homocysteine to methionine by methionine synthase, thus helping to decrease the plasma homocysteine concentration. Folic acid is given orally at 5 mg/day and vitamin B<sub>12</sub> is given as hydroxocobalamin at 1 mg IM per month to homocystinuric patients [2].

Although the pathogenesis of homocystinuria is not fully established, some experimental works have stressed a role for oxidative stress as a possible mechanism of tissue damage in this disorder [6]. This pathological condition can be defined as a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former, leading to potential cell damage [7,8]. In this scenario, most thiols autoxidize in the presence of transition metal catalysts and molecular oxygen, and the thiol molecule homocysteine under certain conditions can similarly undergo autoxidation, generating the reactive oxygen species (ROS) superoxide anion, hydrogen peroxide, or hydroxyl radical. It has been suggested that these species may lead to endothelial cellular damage, lipid peroxidation and inhibition of nitric oxide-related cerebrovascular responses [9–12]. Some studies have investigated the role of oxidative stress in animal models of hyperhomocysteinemia [13–15], but scarce studies have been published evaluating parameters of oxidative stress in patients with homocystinuria.

Therefore, in the present work, we evaluated important parameters of oxidative stress, namely carbonyl content, sulfhydryl content, malondialdehyde (MDA) levels and total antioxidant status (TAS) in patients with homocystinuria at diagnosis and under treatment and in healthy individuals. We also correlated plasma homocysteine and methionine concentrations with the oxidative stress parameters examined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and controls

Subjects with homocystinuria were recruited from the Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Plasma samples were obtained from 9 patients with homocystinuria at diagnosis (median age: 10 years; range: 4–27 years), 11 patients with homocystinuria under treatment (median age: 19 years; range: 12–32 years), and 11 healthy individuals with comparable age and sex (median age: 22 years; range: 5–30 years). The main features of patients with homocystinuria are summarized in Table 1. All patients were diagnosed after the neonatal period by identification of abnormal elevated concentrations of homocysteine and methionine in plasma. The major clinical manifestations were ectopia lentis, seizures, developmental delay, thinning and lengthening of the long bones (*marfanoid* appearance). The average duration of treatment was 11 years (range: 5–20 years). The treatment consisted of a protein-restricted diet supplemented by pyridoxine (median dose: 500 mg/day; range: 100–750 mg/day), folic acid (median dose: 5 mg/day; range: 2–5 mg/day), betaine (median dose: 6 g/day; range: 2–6 g/day) and vitamin B<sub>12</sub> (median dose: 1 mg IM/month).

The present study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. Informed consent was obtained according to the guidelines of our committee.

### 2.2. Plasma preparation

Plasma was separated from whole blood samples obtained from individuals (controls and patients with homocystinuria) by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at 3000 ×g for 10 min at 4 °C, plasma was removed by aspiration and frozen at –80 °C until analysis.

**Table 1**  
Clinical and metabolic features of patients with homocystinuria.

Patient	Sex	Age at diagnosis, years	Duration of treatment, years	B <sub>6</sub> -responsive
*C.C.	M	10	–	–
*I.C.	M	10	–	–
*A.C.	M	4	–	–
*R.S.	F	9	–	–
*B.S.	F	10	–	–
*J.C.	F	10	–	–
*K.S.	M	5	–	–
*D.S.	F	27	–	–
*B.S.	F	8	–	–
A.B.	M	6	6	No
L.L.	M	4	10	Yes
A.P.	M	23	5	NA
L.Z.	M	2	13	Yes
M.S.	M	6	13	No
N.C.	F	4	19	No
F.R.	F	8	11	No
A.C.	F	8	20	No
R.C.	M	13	19	No
D.C.	M	10	10	No
R.F.	M	12	6	NA

NA indicates not available.

\* Patients with homocystinuria at diagnosis (untreated).

### 2.3. Carbonyl measurement

Carbonyl content was measured according to the method described by Levine et al. [16]. Briefly, duplicate aliquots of plasma (100 µL) were treated with 100 µL of 28% trichloroacetic acid. The tubes were centrifuged at 8000 ×g for 10 min to obtain the protein pellet. One milliliter of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) prepared in 2 M HCl or 1.0 mL of 2 M HCl (blank) was added to the precipitates and incubated at 37 °C for 90 min. After, the samples were centrifuged and the DNPH excess was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1 (v/v). The final protein pellet was dissolved in 200 µL of 6 M guanidine hydrochloride. Quantification was performed using a spectrophotometer at 370 nm. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone (21.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Values of carbonyl content were expressed in nmol carbonyl/mg protein.

### 2.4. Sulfhydryl measurement

This assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm [17]. Thirty microliters of plasma were incubated with an equal volume of DTNB at room temperature for 30 min in a dark room. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as nmol TNB.

### 2.5. Malondialdehyde (MDA) measurement

The MDA levels in plasma were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC)-VIS, as described by Grotto et al. [18]. A volume of 75 µL of plasma was added to 25 µL of standard (dimethylacetal) or water plus 25 µL of 3 N NaOH and the mixture was incubated at 60 °C for 30 min in a shaking water bath system. After this, 125 µL of 6% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and 125 µL of 0.8% TBA were added and the mixture was heated at 90 °C for 45 min. Then, the mixture was cooled, 50 µL of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added and the extraction with 300 µL of *n*-butanol was performed, followed by centrifugation. Twenty microliters of the butanol layer was injected into HPLC with a visible detector, using a reverse-phase column. The mobile phase was a mixture of Milli-Q water and methanol

(50:50, v/v). The flow rate was maintained isocratically at 0.6 ml/min, the absorbance of the eluent was monitored at 532 nm and the total run time was 8 min. The results were expressed in  $\mu\text{M}$ .

### 2.6. Total antioxidant status (TAS)

TAS, which represents the quantity of the tissue antioxidants, was determined by kit from RANDOX Laboratories. The plasma sample was incubated with ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) plus a peroxidase (metmyoglobin) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  to produce the cation  $\text{ABTS}^+$ . A relatively stable blue-green color occurred and was measured at 37 °C at 600 nm. Antioxidants in the added sample cause suppression of this color production to a degree which is proportional to their concentration [19,20]. The results were expressed in mmol/L.

### 2.7. Homocysteine (tHcy) measurement

The total homocysteine levels in plasma were measured by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), as described by Magera et al. [21]. This method is based on the analysis of 100  $\mu\text{L}$  of plasma with 20  $\mu\text{L}$  of homocysteine- $\text{d}_8$  (2 nmol) added as internal standard. After the step of reduction with 20  $\mu\text{L}$  of 500 mM dithiothreitol followed by deproteinization, the analysis was performed in the multiple reaction monitoring mode in which tHcy and Hcy- $\text{d}_4$  were detected through the transition from the precursor to the product ion ( $m/z$  136 to  $m/z$  90 and  $m/z$  140 to  $m/z$  94, respectively). The retention time of tHcy and Hcy- $\text{d}_4$  was 1.5 min in a 2.5-minutes analysis. The calibration was performed by a curve with 5 concentrations of Hcy. The results were expressed as  $\mu\text{mol/L}$ . In plasma, total homocysteine (tHcy) is the sum of free and protein-bound homocysteine, homocystine, and several others mixed disulfides.

### 2.8. Methionine (Met) measurement

The methionine levels in plasma were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC), using a reversed-phase column [22]. Initially, 50  $\mu\text{L}$  of plasma was deproteinized with 200  $\mu\text{L}$  of methanol. After centrifugation, 40  $\mu\text{L}$  of supernatant was added to 10  $\mu\text{L}$  of internal standard (1 mM homocysteic acid) and 50  $\mu\text{L}$  of 4% mercaptoethanol. The quantification was done by fluorescence after derivatization with *o*-phthalaldehyde. The retention time of internal standard and methionine was 8 and 39 min, respectively. The calibration was performed by a standard mixture of amino acids in water. The results were expressed as  $\mu\text{mol/L}$ . Methionine was expressed as natural logarithm of methionine (log methionine) aiming to make the normal distribution of data.

### 2.9. Protein measurement

Plasma protein concentrations were determined by the Biuret method using the commercial kit of Labtest (Labtest Diagnóstica, MG, Brazil), using bovine serum albumin as standard.

### 2.10. Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation or median and range. Comparisons between means were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the F value was significant or unpaired Student's *t*-test, as appropriate. Correlations between variables were calculated using the Pearson correlation coefficient. A P value lower than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## 3. Results

In this work we evaluated *in vivo* oxidative stress parameters in plasma of homocystinuric patients at diagnosis (group A) and under treatment (group B). The parameters of protein (carbonyl and sulfhydryl content) and lipid (MDA content) oxidative damage, as well as the quantity of tissue antioxidants were compared to those of controls with similar ages.

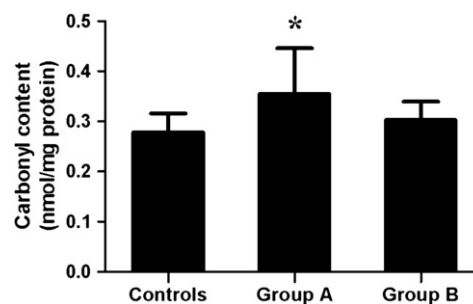
The carbonyl formation was significantly higher in group A when compared to controls [ $F(2.21) = 3.565$ ,  $p < 0.05$ ] (Fig. 1). It was verified a tendency to reduction (15.2%) in the carbonyl formation in group B when compared to group A, indicating that treatment partially prevented the protein oxidation.

Next, we determined the lipid peroxidation index on the basis of MDA levels (Fig. 2). We observed that plasma MDA levels in group A were significantly higher when compared to group B and controls, implying that patients from group B presented a significant decrease in MDA levels when compared with group A [ $F(2.23) = 19.991$ ,  $p < 0.001$ ]. The data indicate that treatment of homocystinuric patients with a protein restricted diet supplemented by pyridoxine, folate, betaine, and vitamin  $\text{B}_{12}$  prevented the lipid damage found in homocystinuric patients at diagnosis, but did not reach the levels found in controls.

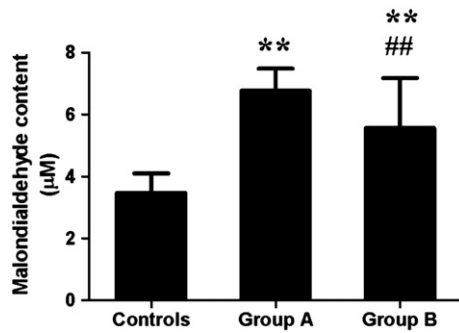
Furthermore, sulfhydryl content was significantly lower in groups A and B of homocystinuric patients when compared to healthy individuals [ $F(2.23) = 4.936$ ,  $p < 0.05$ ] (Fig. 3). Similarly, the total antioxidant status (TAS), reflecting the quantity of tissues antioxidants, was significantly lower in groups A and B of homocystinuric patients when compared to controls [ $F(2.28) = 12.644$ ,  $p < 0.001$ ] (Fig. 4). These findings suggest that treatment of homocystinuric patients was not able to prevent the decrease in the antioxidant defenses found in homocystinuric patients at diagnosis.

We next examined plasma homocysteine and methionine levels in both groups of homocystinuric patients. The average levels ( $\pm$  standard deviation) of homocysteine and log methionine in group A were  $266.5 \pm 66.7 \mu\text{mol/L}$  and  $2.6 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ , respectively. The average levels ( $\pm$  standard deviation) of homocysteine and log methionine in group B were  $140.3 \pm 99.3 \mu\text{mol/L}$  and  $2.0 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$ , respectively. We found that group B presented a significant decrease of both amino acids, homocysteine [ $t(18) = 3.250$ ,  $p < 0.01$ ] and methionine [ $t(18) = 2.720$ ,  $p < 0.05$ ] levels when compared to group A, demonstrating the efficacy of treatment, as expected.

In order to investigate whether homocysteine and methionine levels were associated to oxidative stress in homocystinuric patients, we correlated all parameters investigated with these two amino acids accumulated in homocystinuria (Fig. 5a and b). We verified a significant negative correlation between sulfhydryl group content and homocysteine levels ( $r = -0.540$ ,  $p < 0.05$ ) and a significant positive correlation between MDA levels and homocysteine levels ( $r = 0.561$ ,  $p < 0.05$ ). In contrast, we did not find any correlation



**Fig. 1.** Carbonyl content in plasma from patients with homocystinuria and controls. Groups A and B represent homocystinuric patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SD (controls:  $n = 9$ ; Group A:  $n = 7$ ; Group B:  $n = 8$ ). \* $p < 0.05$ , compared to controls (ANOVA, followed by the Duncan multiple range test).



**Fig. 2.** Malondialdehyde content in plasma from patients with homocystinuria and controls. Groups A and B represent homocystinuric patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SD (controls:  $n=9$ ; Group A:  $n=8$ ; Group B:  $n=9$ ). \*\* $p<0.001$ , compared to controls, ## compared to group A (ANOVA, followed by the Duncan multiple range test).

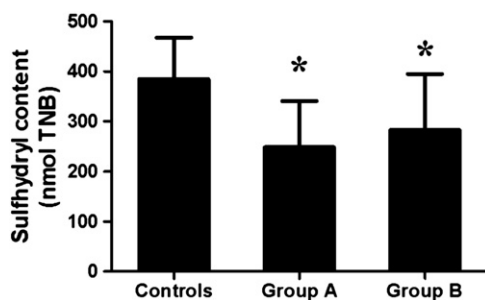
between plasma methionine levels and the oxidative stress parameters.

#### 4. Discussion

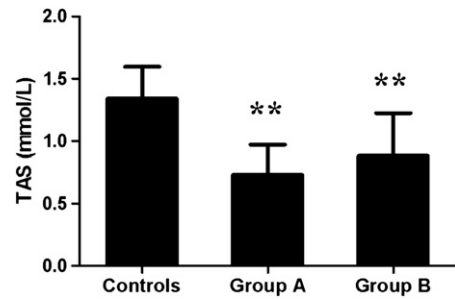
Although high tissue homocysteine concentrations seem to be involved in the pathogenesis of CBS deficiency, particularly through of the endothelial cellular damage that is suggested to be mediated by production of hydrogen peroxide [9], practically nothing has been published on the status of oxidative stress parameters in homocystinuric patients. In the present work we investigated some important parameters of oxidative damage and the antioxidant status in plasma from these patients at diagnosis and under treatment based on protein restriction with supplementation of pyridoxine, folate, betaine and vitamin B<sub>12</sub>. We also investigated possible associations between plasma Hcy and Met levels and the oxidative stress parameters tested.

We first observed that carbonyl content was increased in plasma of homocystinuric patients at diagnosis and that treatment partially reduced these levels. Carbonyl group generation is currently used as a marker of free radical-mediated protein oxidation, especially on amino acid side chain residues (Pro, Arg, Lys, and Thr). Protein carbonylation has been associated with important functional alterations in a variety of structural and enzymatic proteins [23].

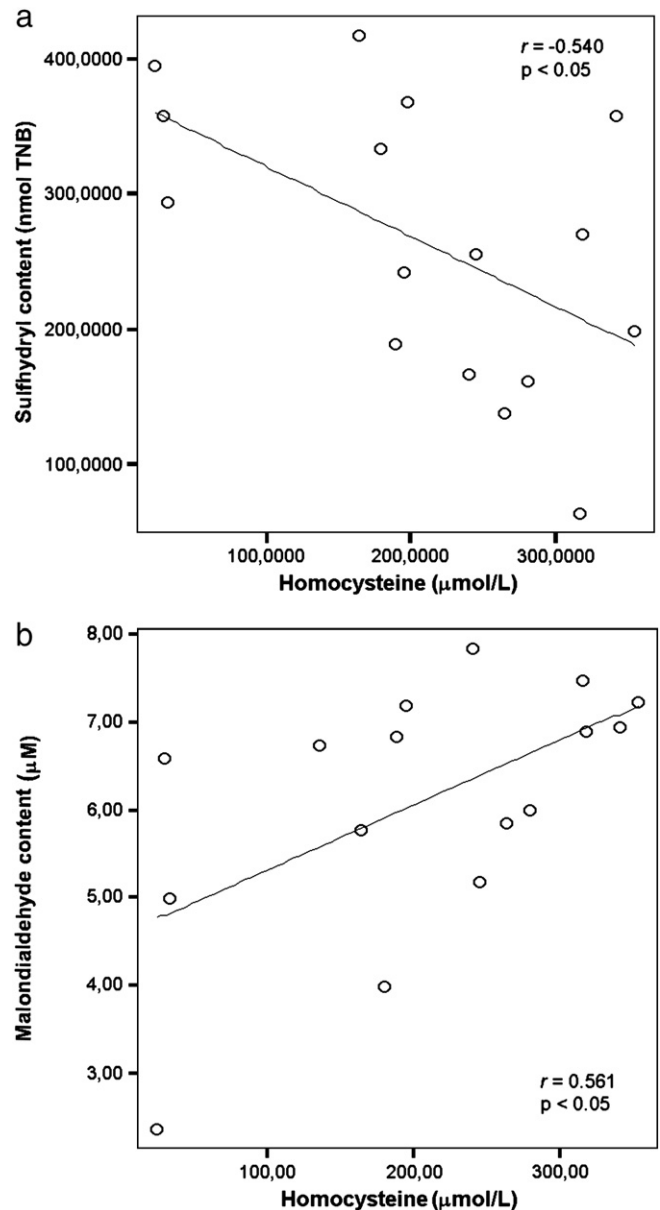
Similar results were obtained for plasma MDA levels, which were significantly increased in both group of patients. However, although plasma MDA concentrations in treated patients were significantly higher than in controls, they were lower than in group A. Since MDA is an end product of membrane fatty acid peroxidation [8], our present



**Fig. 3.** Sulfhydryl content in plasma from patients with homocystinuria and controls. Groups A and B represent homocystinuric patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SD (controls:  $n=9$ ; Group A:  $n=9$ ; Group B:  $n=8$ ). \* $p<0.05$ , compared to controls (ANOVA, followed by the Duncan multiple range test).



**Fig. 4.** Total antioxidant status (TAS) in plasma from patients with homocystinuria and controls. Groups A and B represent homocystinuric patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SD (controls:  $n=11$ ; group A:  $n=9$ ; group B:  $n=11$ ). \*\* $p<0.001$ , compared to controls (ANOVA, followed by the Duncan multiple range test).



**Fig. 5.** Correlation between homocysteine levels and sulfhydryl content (a) and homocysteine levels and malondialdehyde content (b) in plasma from homocystinuric patients at diagnosis and under treatment.

findings indicate that lipid oxidative damage occurs in plasma of homocystinuric patients and that this lipid peroxidation can be reversed by appropriate treatment.

The total antioxidant defenses represented by TAS measurement and sulfhydryl content were found to be markedly reduced in plasma of homocystinuric patients and treatment did not modify these parameters. TAS is used to evaluate the non-enzymatic antioxidant capacity of a tissue to prevent the damage associated to free radical processes [8]. Furthermore, approximately two thirds of sulfhydryl groups are bound to proteins, whereas one third is a component of small molecules such as glutathione [24]. On the other hand, since protein-bound sulfhydryl groups (PBSG) can be reversibly oxidized by reactive species, it has been suggested that PBSG represent a potential active redox antioxidant pool in the cellular defense against oxidative stress [25,26]. So, reduction of sulfhydryl measurement may reflect protein oxidation, or otherwise a diminution of antioxidant defenses. Taken together, our present data indicate that non-enzymatic antioxidant defenses were reduced in homocystinuric patients and that treatment was not able to change the level of the antioxidant defenses in plasma of these patients [27,8]. The reduction of blood antioxidant defenses could be hypothetically attributed to dietary treatment, since the long-term administration of a protein restricted diet may result in deficiency of micronutrients with antioxidant properties, such as selenium, which are necessary for tissue antioxidant defenses [28]. In a previous study, we found that phenylketonuric patients presented a significant decrease of serum L-carnitine levels, as a consequence of low protein diet [29]. It is important to emphasize that patients included in this study were not supplemented by micronutrients. Alternatively, the low antioxidant defenses could be also attributed to the consumption of the major antioxidants and oxidation of bound and free sulfhydryl groups by the high production of reactive species. Our results showing a diminution of the total tissue non-enzymatic antioxidant capacity in humans are in accordance with previous experimental works using animal models of chemically-induced hyperhomocysteinemia in rodents [15].

We also found that plasma Hcy and Met levels were markedly increased in plasma of homocystinuric patients and that treatment significantly reduced these concentrations, as expected, although homocysteine and methionine levels still remained above the normal range (Hcy: 5–15  $\mu\text{mol/L}$ ; Met: children and adolescents: 7–47  $\mu\text{mol/L}$ ; adults: 13–37  $\mu\text{mol/L}$ ). Therefore, it is possible that these amino acids may mediate the increased oxidative damage and the reduction of the antioxidant defenses as here observed. Regarding methionine, no correlation was found between this amino acid and the oxidative stress parameters, which reinforces the assumption that methionine and its derivatives make little contribution to the pathophysiology of CBS deficiency [1]. In contrast, plasma Hcy concentrations were strongly and positively correlated to MDA levels and inversely with sulfhydryl content in the homocystinuric patients. These data, allied to the previous findings of the present study, suggest a potential mechanistic role for Hcy in the pathogenesis of homocystinuria.

In this context, it was shown that excess Hcy results in the formation of Hcy-thiolactone [30,31], which modify proteins by forming adducts in which homocysteine is N-linked to the  $\epsilon$ -amino group of protein lysine residues [30,32]. This modification affects the protein structure, impairs and potentially alters its physiological function, therefore causing cytotoxicity [33]. Furthermore, the kinetically favored formation of alpha-amino carbon-centered radicals by a hydrogen atom transfer reaction renders Hcy-N-protein capable of initiating carbonyl formation in plasma proteins under natural conditions [34]. Chwatko et al. [35] showed that hyperhomocysteinemia secondary to human genetic disorders in Hcy metabolism results in significant increases in plasma Hcy-thiolactone levels with a linear relationship between plasma tHcy/Met ratios and Hcy-thiolactone. Moreover, Jakubowski et al. [33] demonstrated that CBS- or MTHFR-deficiency in patients on Hcy-lowering treatment (vitamin B<sub>6</sub>) results in significant increase in plasma Hcy-N-protein levels with a linear

relation between plasma Hcy-N-protein and tHcy levels. Our results are close to earlier studies [33–35], since we found that protein damage occurs in patients with homocystinuria, as shown by increase of carbonyl content and decrease of sulfhydryl content.

Regarding to the increased lipid oxidative damage observed in homocystinuric patients, it is known that during oxidation of homocysteine, superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) are generated [9–11]. Since  $\text{H}_2\text{O}_2$  is liposoluble, it can diffuse through the membranes and combine with  $\text{Cu}^+$  to generate hydroxyl radical (OH), which can abstract a hydrogen atom from a hydrocarbon side chain of a polyunsaturated fatty acid residue in a membrane and initiate the lipid peroxidation process. In line with this assumption, Dudman and Wilcken [36] demonstrated that copper and ceruloplasmin levels are increased in homocystinuric patients. The overall effects of lipid peroxidation are to decrease membrane fluidity, make it easier for phospholipids to exchange between the two halves of the membrane bilayer, increase the leakiness of the membrane, and damage membrane proteins, inactivating receptors, enzymes, and ion channels [37].

On the other hand, it has been demonstrated that thioredoxins, polypeptides widely distributed in mammalian cells, have a central importance in the antioxidant defense and redox regulation in animals [8]. Furthermore, Tyagi et al. [38] demonstrated that microvascular endothelial cells treated with Hcy presented a time- and dose-dependent decrease in thioredoxin mRNA levels and a time- and dose-dependent increase in ROS levels, inducing oxidative stress in part by decreasing thioredoxin. We cannot therefore rule out the possibility that low thioredoxin activities may be found in homocystinuric patients, such it occurs in patients with hyperhomocysteinemia and coronary artery diseases, in which the low thioredoxin activity was inversely associated with homocysteine levels [39].

In summary, to our mind this is the first work showing that important parameters of oxidative damage and tissue antioxidant defenses are altered in plasma of homocystinuric patients. Furthermore, it was demonstrated that effective treatment was able to revert in parallel the increased amounts of Hcy and the lipid and protein oxidative damage detected in these patients and that this parameter was closely associated to Hcy levels. The data indicate that oxidative stress may represent an important underlying mechanism in the pathogenesis of homocystinuria, probably caused by increased tissue Hcy levels. New therapeutic approaches, including trials with antioxidants as an adjuvant tool seems to be valid to improve the therapy for this disorder.

#### Conflict of interest disclosure

The authors declare that there is no conflict of interest disclosure associated with this manuscript.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by grants from CNPq and FINEP/UNCPA – Brazil.

#### References

- [1] S.H. Mudd, H.L. Levy, J.P. Kraus, Disorders of transsulfuration, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 2007–2056.
- [2] T.N. Rao, K. Radhakrishna, T.S.M. Rao, P. Guruprasad, K. Ahmed, Homocystinuria due to cystathionine beta synthase deficiency, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 74 (2008) 375–378.
- [3] S.H. Mudd, F. Skovby, H.L. Levy, K.D. Pettigrew, B. Wilcken, R.E. Pyeritz, G. Andria, G.H. Boers, I.L. Bromberg, R. Cerone, B. Fowler, H. Gröbe, H. Schmidt, L. Schweitzer, The natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 37 (1985) 1–31.
- [4] A. Lawson-Yuen, H.L. Levy, The use of betaine in the treatment of elevated homocysteine, *Mol. Genet. Metab.* 88 (2006) 201–207.

- [5] D.E.L. Wilcken, B. Wilcken, The natural history of vascular disease in homocystinuria and effects of treatment, *J. Inher. Metab. Dis.* 20 (1997) 295–300.
- [6] S.R. Lentz, Mechanisms of thrombosis in hyperhomocysteinemia, *Curr. Opin. Hematol.* 5 (1998) 343–349.
- [7] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 231–255.
- [8] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death, in: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 2007, pp. 187–267.
- [9] G. Starkebaum, J.M. Harlan, Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine, *J. Clin. Invest.* 77 (1986) 1370–1376.
- [10] J. Loscalzo, The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 5–7.
- [11] F. Zhang, A. Slungaard, G.M. Vercellotti, C. Iadecola, Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) R1704–R1711.
- [12] F.M. Faraci, S.R. Lentz, Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction, *Stroke* 35 (2004) 345–347.
- [13] E.L. Streck, P.S. Vieira, C.M.D. Wannmacher, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, A.T.S. Wyse, In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus, *Metab. Brain Dis.* 18 (2003) 147–154.
- [14] K. Robert, J. Nehmé, E. Bourdon, G. Pivert, B. Friguet, C. Delcayre, J.M. Delabar, N. Janel, Cystathionine  $\beta$  synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver, *Gastroenterology* 128 (2005) 1405–1415.
- [15] C. Matté, V. Mackedanz, F.M. Stefanello, E.B.S. Scherer, A.C. Andreazza, C. Zanotto, A.M. Moro, S.C. Garcia, C.A. Gonçalves, B. Erdtmann, M. Salvador, A.T.S. Wyse, Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid, *Neurochem. Int.* 54 (2009) 7–13.
- [16] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [17] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145.
- [18] D. Grotto, L.D. Santa Maria, S. Boeira, J. Valentini, M.F. Charão, A.M. Moro, P.C. Nascimento, V.J. Pombum, S.C. Garcia, Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 619–624.
- [19] N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407–412.
- [20] T.W. Yu, C.N. Ong, Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application and limitation, *Anal. Biochem.* 275 (1999) 217–223.
- [21] M.J. Magera, J.M. Lacey, B. Casetta, P. Rinaldo, Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1517–1522.
- [22] M.H. Joseph, C.A. Marsden, Amino acids and small peptides, in: C.K. Lim (Ed.), *HPLC of Small Peptides*, IRL Press, Oxford, 1986, pp. 13–27.
- [23] I. Dalle-Donne, D. Giustarini, R. Colombo, R. Rossi, A. Milzani, Protein carbonylation in human diseases, *Trends Mol. Med.* 9 (2003) 169–176.
- [24] R. Requejo, T.R. Hurd, N.J. Costa, M.P. Murphy, Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage, *FEBS J.* 277 (2010) 1465–1480.
- [25] J.A. Thomas, B. Poland, R. Honzatko, Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation, *Arch. Biochem. Biophys.* 319 (1995) 1–9.
- [26] R.E. Hansen, D. Roth, J.R. Winther, Quantifying the global cellular thiol-disulfide status, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 422–427.
- [27] E. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, M.D. del Castillo, Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 153–158.
- [28] R. Longhi, A. Rottoli, A. Vittorelli, G. Zecchini, T. Bonabitacola, F. Bertassi, E. Riva, M. Giovannini, Trace elements nutrition in hyperphenylalaninemic patients: long-term follow up study, *Eur. J. Pediatr.* 146 (1987) 32–37.
- [29] A. Sitta, A.G. Barschak, M. Deon, J.F. de Mari, A.T. Barden, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, I.V.D. Schwartz, M. Wajner, C.R. Vargas, L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients, *Cell. Mol. Neurobiol.* 29 (2009) 211–218.
- [30] H. Jakubowski, Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 1935–1942.
- [31] H. Jakubowski, Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans, *J. Nutr.* 130 (2000) 3775–3815.
- [32] H. Jakubowski, Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels, *FASEB J.* 13 (1999) 2277–2283.
- [33] H. Jakubowski, G.H.J. Boers, K.A. Strauss, Mutations in cystathionine  $\beta$ -synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylation protein levels in humans, *FASEB J.* 22 (2008) 4071–4076.
- [34] M. Sibrian-Vazquez, J.O. Escobedo, S. Lim, G.K. Samoei, R.M. Strongin, Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins, *PNAS* 107 (2010) 551–554.
- [35] G. Chwatko, G.H.J. Boers, K.A. Strauss, D.M. Shih, H. Jakubowski, Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine  $\beta$ -synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice, *FASEB J.* 21 (2007) 1707–1713.
- [36] N.P.B. Dudman, D.E.L. Wilcken, Increased plasma copper in patients with homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency, *Clin. Chim. Acta* 127 (1983) 105–113.
- [37] B. Halliwell, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312–322.
- [38] N. Tyagi, K.C. Sedoris, M. Steed, A.V. Ovechkin, K.S. Moshal, S.C. Tyagi, Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289 (2005) H2649–H2656.
- [39] Y. Wu, L. Yang, L. Zhong, Decreased serum levels of thioredoxin patients with coronary artery disease plus hyperhomocysteinemia is strongly associated with the disease severity, *Atherosclerosis* 212 (2010) 351–355.

## 3.2 Capítulo II – Artigo 02

Evidence that DNA damage is induced in peripheral leukocytes from homocystinuric patients probably secondary to hyperhomocysteinemia.

Vanzin, C.S.; Manfredini, V.; Marinho, A.E.; Biancini, G.B.; Mescka, C.P.; Ribas, G.S.; Rodrigues, D.G.B.; Deon, M.; Souza, C.F.M.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M.; Vargas, C.R.

Periódico: Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.

Status: Submetido



**Evidence that DNA damage is induced in peripheral leukocytes from homocystinuric patients probably secondary to hyperhomocysteinemia.**

Camila Simioni Vanzin<sup>a,b,\*</sup>, Vanusa Manfredini<sup>d</sup>, Ana Eveline Marinho<sup>d</sup>, Giovana Brondani Biancini<sup>a,b</sup>, Caroline Paula Mescka<sup>a,b</sup>, Graziela Schmitt Ribas<sup>b,c</sup>, Daiane Grigolo Bardemaker Rodrigues<sup>b</sup>, Marion Deon<sup>b</sup>, Carolina Fischinger Moura De Souza<sup>b</sup>, Angela Terezinha de Souza Wyse<sup>a</sup>, Moacir Wajner<sup>a,b</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>a,b,c,\*</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Ramiro Barcelos 2700, Porto Alegre, RS, 90035-000, Brazil.

<sup>b</sup> Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil.

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - BR 472, Km 585, Uruguaiana, RS, 97500-970, Brazil.

\*Corresponding authors:

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Bairro: Bom Fim

Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-003 – Tel/Fax: (55-51) 3359 8309

E-mail: [cami\\_vanzin@hotmail.com](mailto:cami_vanzin@hotmail.com) (Camila Simioni Vanzin)

[crvargas@hcpa.ufrgs.br](mailto:crvargas@hcpa.ufrgs.br) (Carmen Regla Vargas)

## **Abstract**

High blood levels of homocysteine (Hcy) are found in patients affected by homocystinuria, a genetic disorder caused by deficiency of cystathionine  $\beta$ -synthase activity, as well as in nutritional deficiencies (vitamin B<sub>12</sub> or folate) and in abnormal renal function. We previously demonstrated that lipid and protein oxidative damage is increased and the antioxidant defenses diminished in plasma of homocystinuric patients, indicating that oxidative stress is involved in the pathophysiology of this disease. In the present work, we extended these investigations by evaluating DNA damage through the comet assay in peripheral leukocytes from homocystinuric patients, as well as by analyzing of the *in vitro* effect of Hcy on DNA damage in white blood cells. We verified that DNA damage was significantly higher in the homocystinuric patients under treatment based on a protein-restricted diet and pyridoxine, folic acid, betaine and vitamin B<sub>12</sub> supplementation, when compared to controls. Furthermore, the *in vitro* study showed a concentration-dependent effect of Hcy inducing DNA damage. Taken together, the present data indicate that DNA damage occurs in treated homocystinuric patients, possibly due to high Hcy levels. It is proposed that appropriate treatment in order to maintain low Hcy levels should be followed correctly in homocystinuric patients to avoid the harmful effects of hyperhomocysteinemia. It is also proposed the use of antioxidants as an adjuvant therapy in patients with this disorder.

**Keywords:** homocysteine; homocystinuria; DNA damage; comet assay.

**Abbreviations:** CBS: cystathionine  $\beta$ -synthase; Hcy: homocysteine; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase; ROS: reactive oxygen species; DI: damage index.

## 1. Introduction

Homocystinuria is an inherited error of metabolism caused by deficiency of cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) activity. The primary metabolic consequence of this deficiency is tissue accumulation of homocysteine (Hcy), resulting in hyperhomocysteinemia and hypermethioninemia. Dislocation of the optic lens, osteoporosis, mental retardation, and thromboembolism are the most common clinical features of homocystinuria [1]. Management of CBS-deficient patients includes a protein-restricted diet and the administration of pyridoxine (for those responsive to this vitamin), folic acid, betaine and vitamin B<sub>12</sub> [1,2].

It is important to emphasize that not only deficient activity of CBS, but also other genetic defects may lead to abnormal accumulation of Hcy in the plasma, such as mutations that inactivate the activity of the enzymes methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase [1]. In addition to genetic disorders, other factors may lead to hyperhomocysteinemia, such as nutritional deficiencies of vitamin B<sub>12</sub> or folate and abnormal renal function [3]. Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for cardiovascular disease and is associated with Alzheimer's disease and vascular dementia [4,5,6].

Although the underlying mechanisms by which Hcy exerts its deleterious effects remains unexplained, some studies have demonstrated that DNA damage, which may occur by induction of DNA hypomethylation and generation of reactive oxygen species (ROS), seems to be induced by high levels of Hcy [7,8,9]. Furthermore, it has been suggested that oxidative stress, which is defined as a serious imbalance between the production of reactive species and the tissue antioxidant defenses [10,11], plays an important role in the pathophysiology of homocystinuria [5,12]. In agreement with this hypothesis, data obtained from animal models of hyperhomocysteinemia have shown an association between Hcy and oxidative stress [13,14,15]. Moreover, we recently demonstrated that lipid and protein oxidative damage is increased and the antioxidant defenses diminished in plasma of homocystinuric patients, probably due to increase of reactive species generation induced by Hcy [16].

In the present work, we extended these investigations analyzing DNA damage in white blood cells from treated homocystinuric patients using the comet assay. We also evaluated the *in vitro* effect of different concentrations of Hcy on DNA damage in white blood cells.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 *In vivo* study

Subjects with homocystinuria due CBS deficiency and aged-matched controls were recruited from the Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Venous blood specimens obtained under sterile conditions in heparinized vials from homocystinuric patients and controls were frozen at -80°C until analysis.

Blood samples from 9 patients with homocystinuria under treatment (mean age:  $21.44 \pm 7.07$  years) and from 9 healthy individuals (mean age:  $26.44 \pm 3.71$  years) were used in the experiments. The treatment of the patients consisted of a protein-restricted diet supplemented by pyridoxine (mean dose:  $425.0 \pm 236.1$  mg/day), folic acid (mean dose:  $4.40 \pm 1.34$  mg/day), betaine (mean dose: 6 g/day) and vitamin B<sub>12</sub> (mean dose: 1mg intramuscularly/month). The average duration of treatment was  $12.33 \pm 7.66$  years. Hcy mean levels in plasma of treated homocystinuric patients measured according to Magera et al. [17] were  $166.5 \pm 117.1$  μM.

The present study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. Informed consent was obtained according to the guidelines of the committee.

### 2.2 *In vitro* study

Leukocytes isolated from normal whole blood were incubated with various concentrations of Hcy (10, 50, 100, 200 or 300 μM) at 37°C for 6 h [18,19]. This range of Hcy concentrations were based on the normal plasma Hcy levels (10 μM) and the concentrations found in blood from treated and not treated homocystinuric patients (50, 100, 200 or 300 μM).

### 2.3 Single cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [20] in accordance with general guidelines for use of the comet assay [18,19]. Isolated human leukocytes were suspended in agarose and spread into a glass microscope slide pre-coated with agarose. Agarose was allowed to set at 4°C for 5min. Slides were incubated in ice-cold lysis solution to remove cell proteins. Slides were placed on a horizontal electrophoresis unit, covered with a fresh buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH>13) for 20 min at 4°C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile-sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25V; 300mA; 0.9V/cm). Slides were

then neutralized, washed in bi-distilled water and stained using a silver staining protocol [21]. After drying at room temperature overnight, gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and receive scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to tail intensity. Therefore, the damage index (DI) for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

## 2.4 Statistical Analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Comparisons between means were analyzed by unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Tukey test when the F value was significant, as appropriate. A *p* value lower than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## 3. Results

In this work we first evaluated the DNA damage in white blood cells from patients with homocystinuria under treatment and from healthy individuals (controls). We also investigated the *in vitro* effect of different concentrations of Hcy on DNA damage in white blood cells.

Tables 1 and 2 show the individual DI values and the number of cells found in each damage class for the treated homocystinuric patients and controls, respectively. We observed that homocystinuric patients presented a higher number of cells with damage class 2 and 3 than control group. Figure 1 shows that DNA migration, and then, DNA damage, was significantly higher in the homocystinuric patients group when compared to control group [ $t(16)=27.902, p<0.001$ ].

Figure 2 shows the *in vitro* effect of Hcy on DNA damage in white blood cells. We verified a concentration-dependent effect of Hcy on DNA damage [ $F(4,10) = 906.436, p<0.001$ ].

#### 4. Discussion

Many studies have evidenced the role of oxidative stress in pathophysiology of the inborn errors of metabolism [22, 23, 24, 25, 26]. Furthermore, it has been shown in animal models of hyperhomocysteinemia that high plasma Hcy levels are associated with oxidation of lipids and proteins in various tissues [13,14,15]. Moreover, recently we showed that lipid and protein oxidative damage occurs in plasma from homocystinuric patients [16]. Considering that the DNA damage may occur through ROS generation [7,8], our goal in this work was to evaluate the DNA damage in treated homocystinuric patients, as well as to evaluate the *in vitro* effect of Hcy on DNA damage in white blood cells.

We demonstrated that treated homocystinuric patients have significantly greater levels of DNA damage, when compared to controls. When comparing the distribution of damage class in homocystinuric patients and controls, it is observed that the differences were primarily caused by an increased number of cells in damage class 2 in homocystinuric patients. Furthermore, a significant number of cells presented damage class 3 in homocystinuric patients, which did not occur in the control group.

Only few studies have evaluated the role of DNA damage in homocystinuria. Considering that Hcy undergoes autoxidation, generating ROS [27, 28], an increased production of ROS may potentially be involved in Hcy-mediated DNA damage. Furthermore, since lipid and protein oxidative damage has been previously shown in plasma from treated homocystinuric patients [16], it may be hypothesized that the present results of DNA damage may have occurred due to an excessive production of free radicals from Hcy autoxidation, generating oxidative DNA damage. Indeed, Huang et al. [29] showed that Hcy induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Other studies reinforce this finding. Lin et al. [8] demonstrated the synergic actions of Hcy and S-adenosylhomocysteine (SAH) on DNA damage through of a mechanism involving ROS, which was completely inhibited by the addition of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) or iron chelator desferal. Picerno et al. [9] showed that Hcy-treated human peripheral blood lymphocytes in culture presented increase in DNA damage and in micronucleus frequency, altering the immune function. Taken together these observations, we presume that the DNA damage found in homocystinuric patients in the present work may be tentatively related to oxidative damage induced by Hcy levels. The biochemical control achieved by treatment in homocystinuric patients does not result in normal levels of circulating Hcy

in most patients; levels usually remain moderately elevated [30]. It is important to emphasize that only one of the patients included in this study achieved normal Hcy levels after treatment. The Hcy average level of treated homocystinuric patients was  $166.5 \pm 117.1 \mu\text{M}$ , remaining above of ideal levels (reference values: 5 to 15  $\mu\text{M}$ ).

Considering that the DNA damage in homocystinuric patients could be caused by the high Hcy levels presented by these patients, we investigate the *in vitro* effect of Hcy on DNA damage in white blood cells. We tested various concentrations of Hcy, beginning with the normal plasma levels (10  $\mu\text{M}$ ) up to high levels (50, 100, 200 or 300  $\mu\text{M}$ ) of this amino acid for the *in vitro* studies. We observed a concentration-dependent effect of Hcy on DNA damage. Interestingly, the DI of homocystinuric patients ( $\text{DI} = 68.4 \pm 1.56$ ), which presented Hcy average level of 166.5  $\mu\text{M}$ , were closer to the DI obtained with the concentrations 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{DI} = 65.67 \pm 1.16$ ) and 200  $\mu\text{M}$  ( $\text{DI} = 70.0 \pm 2.65$ ) in the *in vitro* study. Likewise, the DI of controls ( $\text{DI} = 18.9 \pm 0.86$ ), which presented normal levels of Hcy (5 – 15  $\mu\text{M}$ ), were closer to the DI obtained with the concentration 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{DI} = 19.67 \pm 1.16$ ) in the *in vitro* study. These findings reinforce the hypothesis that the Hcy could be, at least in part, responsible for the elevated DNA damage found in the homocystinuric patients.

Furthermore, in this work we verified that 50  $\mu\text{M}$  Hcy produces a significant increase on DNA damage when compared to normal levels (10  $\mu\text{M}$  Hcy). This is interesting in view that moderately increased plasma total homocysteine (tHcy) levels is related to both venous and arterial occlusive disease and the relationship between tHcy and cardiovascular disease was shown to be dose dependent and independent of others risk factors for vascular diseases [31, 32]. It should be also stressed that moderate increased levels of Hcy (20 – 100  $\mu\text{M}$ ) are frequently found in treated homocystinuric patients, as well as in nutritional deficiencies (vitamin B<sub>12</sub> and folate deficiencies), in renal failure and in other genetic disorders, as the homozygosis for the MTHFR 677C→T polymorphism [3].

Considering that even under treatment, homocystinuric patients present significantly increased DNA damage possibly caused by Hcy-induced oxidative stress, we propose that the use of antioxidants should be tested as an adjuvant therapy for homocystinuria. L-carnitine could be one of these antioxidants since previous studies have reported antioxidant and antiperoxidative properties for this compound [33,34]. In addition, Garcia et al. [35] showed that L-carnitine can reduce oxidative damage to DNA induced by oxygen radicals. It is also important to emphasize that homocystinuric

patients submitted to restricted protein diet could be deficient in L-carnitine and this should be tested.

In conclusion, the present work provides experimental evidence that DNA damage occurs in homocystinuric patients and that this effect may possibly be associated with the high plasma Hcy levels found in these patients. It is presumed that a better metabolic control for homocystinuric patients should be followed strictly in homocystinuric patients in order to normalize Hcy levels and to avoid the harmful effects of hyperhomocysteinemia, and that antioxidants may be useful to treat these patients.

### **Acknowledgments**

This work was supported in part by grants from CNPq and FIPE/HCPA-Brazil.

### **Conflict of Interest statement**

The authors declare that there is no conflict of interest disclosure associated with this manuscript.

### **5. References**

- [1] S.H. Mudd, H.L. Levy, J.P. Kraus, Disorders of transsulfuration, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp.2007-2056.
  
- [2] T.N. Rao, K. Radhakrishna, T.S.M. Rao, P. Guruprasad, K. Ahmed, Homocystinuria due to cystathionine beta synthase deficiency, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 74 (2008) 375-378.
  
- [3] B. Fowler, Homocysteine, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine, in: N. Blau, M. Duran, K.M. Gibson (Eds), *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 2008, pp.112-135.



- [4] S. Seshadri, A. Beiser, J. Selhub, P.F. Jacques, I.H. Rosenberg, R.B. D'Agostino, P.W.F. Wilson, P.A. Wolf, Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's Disease, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 476-483.
- [5] F.M. Faraci, S.R. Lentz, Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction, *Stroke.* 35 (2004) 345-347.
- [6] C. Sánchez-Moreno, A. Jiménez-Escrig, A. Martín, Stroke: roles of B vitamins, homocysteine and antioxidants, *Nutr. Res. Rev.* 22 (2009) 49-67.
- [7] S. Oikawa, K. Murakami, S. Kawanishi, Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis, *Oncogene.* 22 (2003) 3530–3538.
- [8] P.Y. Lin, T.H. Yang, H.G. Lin, M.L. Hu, Synergistic effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage in a murine microglial cell line, *Clin. Chim. Acta.* 379 (2007) 139–144.
- [9] I. Picerno, C. Chirico, S. Condello, G. Visalli, N. Ferlazzo, G. Gorgone, D. Caccamo, R. Ientile, Homocysteine induces DNA damage and alterations in proliferative capacity of T-lymphocytes: a model for immunosenescence? *Biogerontology.* 8 (2007) 111–119.
- [10] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 231–255.
- [11] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed., Oxford University Press, Oxford, 2007.
- [12] A.F. Perna, D. Ingrosso, N.G. De Santo, Homocysteine and oxidative stress, *Amino Acids.* 25 (2003) 409-417.

- [13] K. Robert, J. Nehmé, E. Bourdon, G. Pivert, B. Friguet, C. Delcayre, J.M. Delabar, N. Janel, Cystathionine  $\beta$  synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver, *Gastroenterology*. 128 (2005) 1405–1415.
- [14] C. Matté, F.M. Stefanello, V. Mackedanz, C.D. Pederzoli, M.L. Lamers, C.S. Dutra-Filho, M.F. dos Santos, A.T.S. Wyse, Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats, *Int. J. Devl. Neuroscience*. 27 (2009) 337–344.
- [15] A.A. da Cunha, A.G.K. Ferreira, M.J. da Cunha, C.D. Pederzoli, D.L. Becker, J.G. Coelho, C.S. Dutra-Filho, A.T.S. Wyse, Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung, *Mol. Cell. Biochem*. 358 (2011) 153-160.
- [16] C.S. Vanzin, G.B. Biancini, A. Sitta, C.A.Y. Wayhs, I.N. Pereira, F. Rockenbach, S.C. Garcia, A.T.S. Wyse, I.V.D. Schwartz, M. Wajner, C.R. Vargas, Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: A possible role for homocysteine, *Mol. Genet. Metab*. 104 (2011) 112-117.
- [17] M.J. Magera, J.M. Lacey, B. Casetta, P. Rinaldo, Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry, *Clin. Chem*. 45 (1999) 1517–1522.
- [18] R.R. Tice, D. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen*. 35 (2000) 206–221.
- [19] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, G. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 45–51.
- [20] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 175 (1988) 184–191.

- [21] S. Nadin, L. Vargas-Roig, D. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183–1186.
- [22] C.R. Vargas, M. Wajner, L.R. Sirtori, L. Goulart, M. Chiochetta, D.M. Coelho, A. Latini, S. Llesuy, A. Bello-Klein, R. Giugliani, M. Deon, C.F. Mello, Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodistrophy, *Biochim. Biophys. Acta.* 1688 (2004) 26-32.
- [23] M. Deon, M. Wajner, L.R. Sirtori, D. Fitarelli, D. Coelho, A. Sitta, A.G. Barschak, G.C. Ferreira, A. Haeser, R. Giugliani, C.R. Vargas, The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodistrophy, *J. Neurol. Sci.* 247 (2006) 157-164.
- [24] A.G.; Barschak, A. Sitta, M. Deon, M.H. Oliveira, A. Haeser, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients whit maple syrup urine disease, *Metab. Brain Dis.* 21 (2006) 279-286.
- [25] A. Sitta, A.G. Barschak, M. Deon, T. Terroso, R. Pires, R. Giugliani, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients, *Metab. Brain Dis.* 21 (2006) 287-296.
- [26] G.S. Ribas, V. Manfredini, J.F. de Mari, C.Y. Wayhs, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, A.Sitta, M.Deon, M.Wajner, C.R. Vargas, Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation, *Int. J. Devl. Neuroscience* 28 (2010) 127–132.
- [27] G. Starkebaum, JM. Harlan, Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.* 77 (1986) 1370-1376.
- [28] J. Loscalzo, The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 5-7.
- [29] R.F.S. Huang, S.M. Huang, B.S. Lin, J.S. Wei, T.Z. Liu, Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells, *Life Sci.* 68 (2001) 2799–2811.

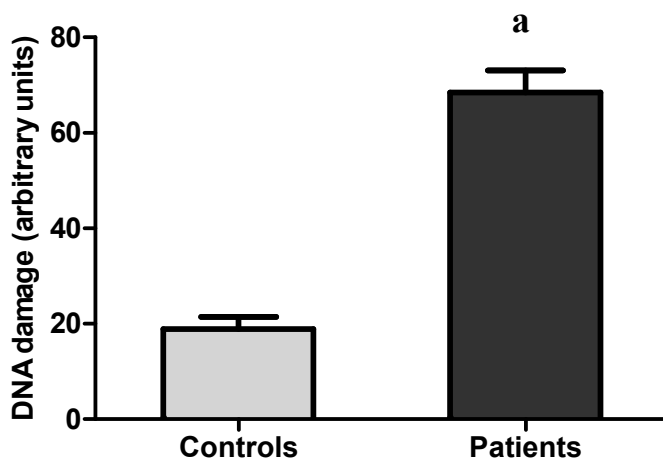
- [30] S. Yap, G.H.J. Boers, B. Wilcken, D.E.L. Wilcken, D.P. Brenton, P.J. Lee, J.H. Walter, P.M. Howard, E.R. Naughten, Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency treated chronically: A multicenter observational study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 2080-2085.
- [31] H. Refsum, P.M. Ueland, O. Nygård, S.E. Vollset, Homocysteine and cardiovascular disease, *Annu. Rev. Med.* 49 (1998) 31–62.
- [32] Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 288 (2002) 2015–2022.
- [33] N. Derin, V.N. Izgut-Uysal, A. Agac, Y. Aliciguzel, N. Demir, L-Carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation, *J. Physiol. Pharmacol.* 55 (2004) 595-606.
- [34] I. Gülçin, Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, *Life Sci.* 78 (2006) 803 – 811.
- [35] C.L. Garcia, S. Filippi, P. Mosesso, M. Calvani, R. Nicolai, L. Mosconi, F. Palitti, The protective effect of l-carnitine in peripheral blood human lymphocytes exposed to oxidative agents, *Mutagenesis* 21 (2006) 21–27.

**Figure legends:**

**Figure 1.** DNA damage (comet assay) of peripheral blood leukocytes from homocystinuric patients (n=9) and controls (n=9). Data represent the mean  $\pm$  SD. (a)  $p < 0.001$ , compared to controls (unpaired Student's *t*-test).

**Figure 2.** *In vitro* effect of homocysteine on DNA damage (comet assay) in leukocytes. Data represent the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments. (a)  $p < 0.001$ , compared to the Hcy 10  $\mu\text{mol/L}$  group; (b)  $p < 0.001$ , compared to the Hcy 50  $\mu\text{mol/L}$  group; (c)  $p < 0.05$ , compared to the Hcy 100  $\mu\text{mol/L}$  group; (d)  $p < 0.001$ , compared to the Hcy 200  $\mu\text{mol/L}$  group (One-way ANOVA, followed by Tukey test).

**Figure 1**



**Figure 2**

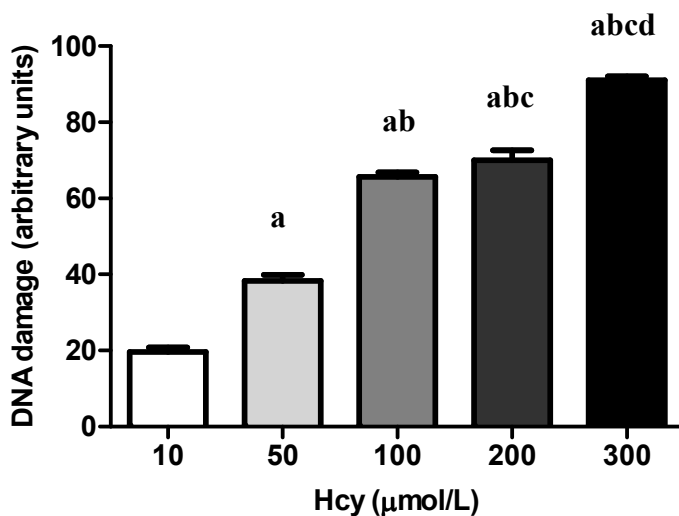


Table 1.

Age, individual DI values and number of cells found in each damage class in the homocystinuric patients group.

Patient	Age(years)	DI	Damage class				
			0	1	2	3	4
1	27	66	55	26	17	2	0
2	10	65	56	24	19	1	0
3	19	67	56	22	21	1	0
4	21	74	53	21	25	1	0
5	17	75	53	21	24	2	0
6	29	72	54	21	24	1	0
7	15	71	54	22	23	1	0
8	32	64	48	40	12	0	0
9	23	64	48	42	8	2	0
$\Sigma$			477	239	173	11	0

Table 2.

Age, individual DI values and number of cells found in each damage class in the control group.

Control	Age(years)	DI	Damage class				
			0	1	2	3	4
1	27	18	82	18	0	0	0
2	30	20	80	20	0	0	0
3	23	20	80	20	0	0	0
4	25	19	81	19	0	0	0
5	24	17	83	17	0	0	0
6	22	15	85	15	0	0	0
7	34	24	77	22	1	0	0
8	27	17	83	17	0	0	0
9	26	20	80	20	0	0	0
$\Sigma$			731	168	1	0	0

## 4. DISCUSSÃO

A homocistinúria devido à deficiência da enzima CBS (homocistinúria clássica) é o mais comum EIM da metionina (Mudd et al., 2001). A doença foi descoberta em 1962, quando níveis elevados de aminoácidos foram identificados na urina de indivíduos mentalmente retardados. Um acúmulo de Hcy nos tecidos levando à formação e excreção urinária de homocistina foi observado (Gerritsen et al., 1962), e subsequentemente, a deficiência de CBS foi demonstrada como a causa da doença (Mudd et al., 1964). A homocistinúria clássica é acompanhada por uma variedade de anormalidades clínicas e patológicas afetando principalmente os olhos, o ossos, o sistema cardiovascular e o sistema nervoso central. A principal causa de morbidade e a mais frequente causa de morte é o tromboembolismo (Mudd et al., 2001). O tratamento com vitamina B<sub>6</sub> em combinação com folato ou betaína diminui os níveis plasmáticos de Hcy e melhora os achados vasculares em pacientes com deficiência de CBS (Yap et al., 2001), o que sugere que a Hcy desempenha um papel causal na aterotrombose (Jakubowski et al., 2008). Entre os mecanismos responsáveis pelos efeitos tromboembólicos causados pela Hcy, dois deles vêm recebendo atenção: inibição das reações de transmetilação e estresse oxidativo (Mudd et al., 2001).

Nesse contexto, estudos em modelos animais têm sido realizados no intuito de investigar se o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da homocistinúria. Streck et al. (2003) demonstraram, em estudo *in vitro*, que a Hcy nas concentrações de 100 e 500 µmol/L aumenta a lipoperoxidação (medida através do método TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) e diminui a capacidade antioxidante (avaliada pelo método TRAP - potencial antioxidante reativo total) em homogeneizado de hipocampo de ratos. Essa alteração induzida pela ação *in vitro* da Hcy é fortemente indicativa de estresse oxidativo, uma vez que este processo é definido como um

desequilíbrio entre a produção de radicais livres (levando à lipoperoxidação) e a capacidade de defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 2007). Em outro estudo, Robert et al. (2005) analisaram o dano a proteínas e aos lipídios em fígado de ratos deficientes da enzima CBS e em ratos que possuíam a atividade normal da enzima em questão. O estudo revelou que os ratos deficientes de CBS apresentaram um aumento nos níveis de proteínas oxidativamente modificadas (medido através do método de carbonil), bem como um aumento dos níveis de subprodutos da lipoperoxidação, tais como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE). Mais recentemente, Matté et al. (2009) investigaram o efeito do ácido fólico sobre as defesas antioxidantes e sobre o dano ao DNA em ratos submetidos à hiper-homocisteinemia crônica. Nesse trabalho, foi demonstrado que a administração subcutânea de Hcy, em concentrações comparáveis às dos pacientes homocistinúricos, provocou diminuição da capacidade antioxidante (avaliada pelo método TRAP) no córtex parietal e no sangue de ratos. O dano ao DNA, avaliado pelo ensaio cometa, também estava aumentado nos ratos submetidos à hiper-homocisteinemia. Esses efeitos não foram observados em ratos que receberam a administração subcutânea concomitante de Hcy e ácido fólico, demonstrando, assim, que o ácido fólico pode prevenir a alteração nas defesas antioxidantes e o dano ao DNA provocados pela hiper-homocisteinemia crônica.

Levando em consideração que vários trabalhos em modelos animais sugerem uma possível relação entre Hcy e estresse oxidativo e principalmente que poucos trabalhos existem avaliando o estresse oxidativo em pacientes portadores de homocistinúria, o objetivo do presente trabalho foi avaliar parâmetros de estresse oxidativo no sangue de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico e em pacientes homocistinúricos submetidos ao tratamento preconizado. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre,



cujo parecer encontra-se em anexo. Os pacientes ou seus responsáveis legais assinaram um Termo de Consentimento livre e esclarecido para participar do estudo.

No primeiro momento, foram analisadas amostras de plasma de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico, de pacientes homocistinúricos em tratamento e de indivíduos saudáveis com idade e sexo comparáveis aos dos pacientes (controles). Foram avaliados parâmetros de dano a proteínas (carbonilas e sulfidrilas), dano a lipídeos (malondialdeído - MDA) e a quantidade de antioxidantes não enzimáticos (status antioxidante total - TAS). Com o objetivo de verificar associações entre o possível estresse oxidativo presente e os aminoácidos acumulados na doença, foram correlacionados os níveis de Hcy e metionina com todos os parâmetros de estresse oxidativo estudados.

Foi verificado um aumento significativo dos níveis de grupamentos carbonilas nos pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico. Além disso, houve uma tendência (15,2%) à diminuição dos níveis de grupamentos carbonilas nos pacientes em tratamento. Similarmente, os níveis de MDA foram significativamente maiores nos pacientes no momento do diagnóstico. Os pacientes em tratamento tiveram uma redução significativa dos níveis de MDA em relação aos pacientes no diagnóstico, mas não alcançaram os níveis encontrados nos controles. Em relação à capacidade antioxidante não enzimática, essa foi avaliada por dois parâmetros, TAS e sulfidrilas (que também representa um parâmetro de dano a proteínas). Foi demonstrado que tanto pacientes no momento do diagnóstico quanto pacientes em tratamento apresentam uma diminuição significativa de TAS e de grupamentos sulfidrilas em comparação com os controles. Esses resultados em conjunto indicam que existe um aumento no dano oxidativo às proteínas e lipídeos e uma diminuição nas defesas antioxidantes não enzimáticas em pacientes homocistinúricos, indicando um possível papel do estresse oxidativo na

patogênese da doença. Adicionalmente, foi encontrada uma correlação significativa positiva entre os níveis de Hcy e os níveis de MDA, bem como uma correlação significativa negativa entre os níveis de Hcy e os níveis de grupamentos sulfidrilas. Esses resultados indicam um possível papel da Hcy na indução do estresse oxidativo observado.

Nesse sentido, em continuidade foi avaliado o efeito *in vivo* e *in vitro* da Hcy sobre o dano ao DNA, analisado pelo ensaio cometa em leucócitos. Foi observado que pacientes homocistinúricos tratados apresentam um aumento significativo do dano ao DNA quando comparados aos controles. Além disso, o estudo *in vitro* demonstrou um efeito concentração dependente da Hcy sobre o dano ao DNA, sendo que a menor concentração de Hcy apresentou o menor dano, e a maior concentração apresentou o maior dano. Interessantemente, o índice de dano (ID) ao DNA dos pacientes homocistinúricos (ID =  $68,4 \pm 1,56$ ), os quais apresentaram níveis médios de Hcy plasmática de  $166,5 \mu\text{M}$ , foi próximo aos índices de dano obtidos com as concentrações  $100 \mu\text{M}$  (ID =  $65,67 \pm 1,16$ ) e  $200 \mu\text{M}$  (ID =  $70,0 \pm 2,65$ ) no estudo *in vitro*. Da mesma forma, o ID dos controles (ID =  $18,9 \pm 0,86$ ), os quais apresentaram níveis normais de Hcy plasmática ( $5 - 15 \mu\text{M}$ ), foi próximo ao obtido com a concentração  $10 \mu\text{M}$  (ID =  $19,67 \pm 1,16$ ) no estudo *in vitro*. Esses achados reforçam a hipótese de que a Hcy provavelmente seja responsável, pelo menos em parte, pelo dano ao DNA observado em pacientes homocistinúricos tratados.

Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado os efeitos nocivos da Hcy, principalmente no que diz respeito ao dano endotelial. Sabe-se que a hiperhomocisteinemia produz mudanças complexas na parede dos vasos sanguíneos. Na circulação periférica, essas mudanças incluem estresse oxidativo, disfunção endotelial e efeitos pró-inflamatórios, tais como a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF-

$\alpha$ ) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). O estresse oxidativo induzido pela hiper-homocisteinemia pode ocorrer como resultado da diminuição da expressão e/ou da atividade de enzimas antioxidantes, bem como pela geração aumentada de  $O_2^{\cdot-}$  (Faraci e Lentz, 2004).

Foi demonstrado que a Hcy sofre auto-oxidação no plasma, gerando homocistina (dissulfeto Hcy-Hcy) e dissulfetos mistos da Hcy. Durante a oxidação do grupo sulfidríla, as espécies reativas  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  e  $H_2O_2$  são geradas, e acredita-se que essas espécies derivadas do oxigênio possam mediar a citotoxicidade endotelial da Hcy. Essas ERO geradas durante a auto-oxidação da Hcy iniciam a peroxidação lipídica, um efeito que ocorre na superfície das células endoteliais, bem como nas lipoproteínas plasmáticas (Starkebaum e Harlan, 1986; Loscalzo, 1996). Os resultados encontrados no presente trabalho estão próximos ao que é descrito na literatura em relação à lipoperoxidação, já que encontramos níveis de MDA (subproduto de lipoperoxidação) significativamente elevados nos pacientes homocistinúricos e uma correlação significativa positiva entre os níveis de MDA e as concentrações plasmáticas de Hcy. Assim, a lipoperoxidação aumentada nos pacientes homocistinúricos provavelmente seja consequência das altas concentrações de Hcy, já que esse aminoácido pode gerar níveis exacerbados de ERO, as quais iniciam reações em cadeia que levam ao dano oxidativo aos lipídeos. Os efeitos gerais da lipoperoxidação são diminuição da fluidez da membrana, aumento da facilidade de troca de fosfolipídeos entre as duas metades da bicamada, aumento da permeabilidade da membrana e dano às proteínas de membrana, inativando receptores, enzimas e canais iônicos. Os íons ferro e o cobre aceleram a lipoperoxidação por dois mecanismos. Primeiro, eles convertem  $H_2O_2$  em  $OH^{\cdot}$  pela reação de Fenton. Em uma reação análoga, eles podem partir hidroperóxidos lipídicos gerando os radicais alcoxil ( $LO^{\cdot}$ ) e peroxil ( $LOO^{\cdot}$ ), e assim, desencadeando uma reação

em cadeia (Halliwell, 2006). É importante enfatizar que os níveis plasmáticos de cobre estão aumentados cerca de 1,4 vezes em indivíduos com homocistinúria, com correspondente aumento nas concentrações de ceruloplasmina (Dudman e Wilcken, 1983). Isso poderia ser um fator adicional desencadeador da lipoperoxidação em pacientes homocistinúricos. Além do dano oxidativo aos lipídeos, as ERO geradas pela auto-oxidação da Hcy podem também estar envolvidas com os níveis significativamente elevados de índices de dano ao DNA demonstrados nesse trabalho em leucócitos de pacientes homocistinúricos tratados. Paralelo ao estudo em pacientes, nós realizamos um estudo *in vitro* com concentração de Hcy considerada normal (10 $\mu$ M), concentrações de Hcy encontradas na hiper-homocisteinemia moderada (50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) e concentrações de Hcy encontradas na hiper-homocisteinemia severa (200 $\mu$ M e 300 $\mu$ M). Níveis moderados são geralmente encontrados na hiper-homocisteinemia por deficiência nutricional e em pacientes com homocistinúria em tratamento. Níveis severos são geralmente encontrados em pacientes com homocistinúria no momento do diagnóstico e em pacientes homocistinúricos com fraca resposta ao tratamento. Foi verificado pelo estudo *in vitro* que a Hcy causa dano ao DNA de maneira concentração dependente. Estudos demonstram que a Hcy pode causar dano ao DNA, o qual é mediado pela produção de ERO (Huang et al., 2001; Lin et al., 2007). Oikawa et al. (2003) propõem um mecanismo para o dano ao DNA induzido pela Hcy, através do qual altas concentrações de Hcy sofrem auto-oxidação, gerando o radical homocisteinil, que por reações subsequentes gera ERO como oxigênio *singlet* e OH $\cdot$ , as quais são capazes de atacar constituintes do DNA, gerando dano. Tem sido sugerido que mutações no DNA celular desempenham um papel na etiologia da formação da placa aterosclerótica e na tumorigênese. As placas contêm, entre outros componentes,

linfócitos e é possível que esses linfócitos possam estar envolvidos na iniciação da formação da lesão aterosclerótica (Cooke et al., 2006).

Outro possível aspecto do metabolismo da Hcy que pode contribuir para os efeitos danosos da hiper-homocisteinemia é a conversão de Hcy em Hcy tiolactona. A Hcy tiolactona é quimicamente reativa e pode facilmente acilar grupos amino livres, tais como em resíduos de lisina presentes em cadeias laterais de proteínas. A homocisteinilação de proteínas em soro humano ocorre em concentrações de Hcy tiolactona tão baixas quanto 10 nM e aumenta diretamente em proporção ao aumento na concentração de Hcy tiolactona, até a faixa de milimolar. Se condições favorecendo a síntese de Hcy tiolactona, tais como elevadas concentrações de Hcy, são mantidas, haverá um concomitante aumento no grau de homocisteinilação de proteínas, o que pode levar ao dano protéico. As proteínas homocisteiniladas sofrem mudanças estruturais que levam à sua desnaturação (Jakubowsky, 1999). Em adição à perda de função, a homocisteinilação de proteínas pode gerar proteínas modificadas que são fisiologicamente prejudiciais. Ferguson et al. (1998) demonstraram que a molécula de LDL homocisteinilada pode provocar resposta imune em coelhos. No presente trabalho foi verificado que pacientes homocistinúricos apresentam um aumento no dano oxidativo às proteínas, evidenciado por níveis aumentados de grupamentos carbonilas no momento do diagnóstico e níveis diminuídos de grupamentos sulfidrilas em pacientes não tratados e tratados. Além disso, nós verificamos uma correlação significativa negativa entre os níveis de grupamentos sulfidrilas e as concentrações de Hcy. O mecanismo exato através do qual esse dano é gerado é desconhecido, mas pode estar envolvido com a formação de proteínas homocisteiniladas. Sibrian-Vazquez et al. (2010) demonstraram uma relação causal entre as proteínas homocisteiniladas e o dano oxidativo às proteínas, já que foi encontrado um aumento de grupamentos carbonilas na

albumina sérica humana como consequência da reação dessa proteína com Hcy tiolactona. Radicais  $^{\circ}\text{C}$ , precursores bem conhecidos de grupamentos carbonilas, são formados via um processo de transferência de átomo de hidrogênio envolvendo proteínas homocisteiniladas derivadas da tiolactona.

Além de refletir dano às proteínas, a diminuição de grupamentos sulfidrilas encontrada em ambos os grupos de pacientes homocistinúricos estudados no presente trabalho, pode também refletir a diminuição da defesa antioxidante não-enzimática. Paralelo a esse resultado, nós também demonstramos que o status antioxidante total estava reduzido no plasma de pacientes homocistinúricos dos grupos diagnóstico e tratamento. Essa diminuição das defesas antioxidantes poderia ser consequência do alto consumo de antioxidantes que estaria ocorrendo como resposta aos níveis elevados de ERO geradas pela auto-oxidação da Hcy. O fato de o tratamento não conseguir reverter essa diminuição das defesas antioxidantes pode ser atribuído à dieta. A dieta preconizada para o tratamento da homocistinúria é restrita em proteína animal. Assim, micronutrientes e possíveis antioxidantes obtidos através da ingestão de proteínas podem estar deficientes nos pacientes homocistinúricos. Um exemplo seria a L-carnitina, a qual é fundamentalmente obtida pela dieta, principalmente através de produtos de origem animal, podendo, estar deficiente em pacientes com erros inatos submetidos à dieta pobre em proteínas (Schulpis et al. 1990; Vilaseca et al. 1993). Propriedades antioxidantes e antiperoxidativas têm sido demonstradas para a L-carnitina (Derin et al., 2004; Gülçin, 2006). É importante ressaltar que os pacientes em tratamento incluídos nesse estudo não são suplementados com micronutrientes. Sendo assim, uma abordagem terapêutica com antioxidantes poderia ser benéfica para pacientes homocistinúricos. Novos estudos são necessários para poder sugerir um antioxidante, bem como uma dose ideal a ser consumida. Uma alternativa seria levar em

consideração as possíveis deficiências nutricionais que os pacientes apresentam em decorrência da dieta.

Na homocistinúria, assim como em outras doenças metabólicas, as anormalidades bioquímicas características da doença são responsáveis pelas complicações clínicas. Sendo assim, o tratamento ótimo para a homocistinúria deve objetivar minimizar essas anormalidades bioquímicas. Sempre que possível, a terapia para alcançar o controle bioquímico deve iniciar antes das complicações clínicas ocorrerem, já que muitas dessas complicações são irreversíveis. Mesmo antes de os efeitos clínicos serem reconhecidos, o dano tecidual pode já ter ocorrido. Então, o benefício máximo a partir da terapia pode ser possível somente quando a doença é detectada no período neonatal, como resultado de conhecimento prévio da doença na família ou por triagem neonatal. A homocistinúria por deficiência da CBS tem sido detectada com uma frequência entre 1:200.00 a 1:335.00 nascidos vivos. No entanto, evidências indicam que essas frequências muito provavelmente são uma subestimação da verdadeira taxa de ocorrência da deficiência de CBS (Mudd et al., 2001). Apesar da presença de sinais clínicos e complicações características, o diagnóstico da deficiência de CBS é frequentemente perdido (Yap et al., 2001). Cruysberg et al. (1996) relataram um atraso médio de 11 anos entre o primeiro sinal da condição (em idade média de 13 anos) e o diagnóstico definitivo da deficiência de CBS. Triagem neonatal, instituição precoce do tratamento, boa aderência à dieta e manutenção dos níveis de homocistina livre em níveis menores que  $11\mu\text{mol/L}$  parecem proteger contra as reconhecidas complicações da homocistinúria não tratada (Yap e Naughten, 1998). O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para manter baixos níveis de Hcy, o que provavelmente promove a prevenção do processo de estresse oxidativo na homocistinúria por deficiência de CBS.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho permitem concluir que:

a) O conteúdo de grupamentos carbonilas, um parâmetro de dano oxidativo às proteínas, está significativamente aumentado no plasma de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico. Pacientes em tratamento apresentam uma tendência a redução (15,2%) no conteúdo de grupamentos carbonilas em relação aos pacientes no momento do diagnóstico.

b) O conteúdo de malondialdeído (MDA), um parâmetro de lipoperoxidação, está significativamente aumentado no plasma de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico. Pacientes em tratamento apresentam uma redução significativa no conteúdo de malondialdeído em relação aos pacientes no momento do diagnóstico.

c) O conteúdo de sulfidrilas, um parâmetro que representa tanto dano oxidativo às proteínas quanto defesa antioxidante não-enzimática, está significativamente reduzido no plasma de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico. Pacientes em tratamento não apresentam diferenças no conteúdo de sulfidrilas em relação aos pacientes no momento do diagnóstico.

d) O status antioxidante total (TAS), um parâmetro que representa a quantidade de antioxidantes não-enzimáticos, está significativamente reduzido no plasma de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico. Pacientes em tratamento não apresentam diferenças no status antioxidante total em relação aos pacientes no momento do diagnóstico.

e) O conteúdo de sulfidrilas possui uma correlação significativa negativa com os níveis de Hcy em pacientes homocistinúricos.



f) O conteúdo de malondialdeído possui uma correlação significativa positiva com os níveis de Hcy em pacientes homocistinúricos.

g) Não foi observado correlação entre os níveis de metionina e os parâmetros de estresse oxidativo avaliados.

h) O índice de dano ao DNA, avaliado pelo ensaio cometa, está significativamente aumentado no sangue de pacientes homocistinúricos tratados em relação aos controles.

i) Em estudo *in vitro*, foi demonstrado um efeito concentração dependente da Hcy sobre o dano ao DNA, sendo que a menor concentração de Hcy apresentou o menor índice de dano e a maior concentração de Hcy apresentou o maior índice de dano.

Podemos concluir que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da homocistinúria, que esse processo pode estar relacionado com os altos níveis circulantes de Hcy e que novas abordagens devem ser utilizadas para melhorar a terapêutica nessa desordem.

## 6. PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade a esse trabalho, expandindo nossos resultados.

Dessa forma, são perspectivas:

a) Medir a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em eritrócitos de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico e durante o tratamento.

b) Medir os níveis de glutathione reduzida em eritrócitos de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico e durante o tratamento.

c) Avaliar os níveis de L-carnitina em pacientes homocistinúricos tratados e correlacionar com parâmetros de estresse oxidativo. Se necessário, avaliar a possibilidade de suplementação de L-carnitina para os pacientes e seu efeito sobre o estresse oxidativo.

d) Avaliar os níveis dos marcadores inflamatórios proteína C reativa e alfa-1 glicoproteína ácida no plasma de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico e durante o tratamento.

e) Avaliar o perfil renal, bem como parâmetros de estresse oxidativo em urina de pacientes homocistinúricos no momento do diagnóstico e durante o tratamento.

f) Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em outras formas de hiperhomocisteinemia.

## 7. REFERÊNCIAS

Andria, G.; Fowler, B.; Sebastio, G. (2006) Disorders of Sulfur Amino Acid Metabolism. In: Fernandes, J.; Saudubray, J.M.; Van Den Berghe, G. Walter, J.H. (Eds) Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment. 4<sup>th</sup> ed. Würzburg: Springer Medizin Verlag, p. 273-282.

Barschak, A.G.; Sitta, A.; Deon, M.; Oliveira, M.H.; Haeser, A.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Vargas, C.R. (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients whit maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 21:279-286.

Barschak, A.G.; Sitta, A.; Deon, M.; Barden, A.T.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Vargas, C.R. (2008) Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab. Brain Dis.* 23:71-80.

Bridi, R.; Braun, C.A.; Zorzi, G.K.; Wannmacher C.M.; Wajner, M.; Lissi, E.G.; Dutra-Filho, C.S. (2005)  $\alpha$ -keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metab. Brain Dis.* 20:155-167.

Carson, N.A.; Neill, D.W. (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch. Dis. Child.* 37:505-513.

Childs, B.; Valle, D.; Jimenez-Sanchez, G. (2001) The Inborn Error and Biochemical Individuality. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (Eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p.155-166.

Cooke, M.S.; Olinski, R.; Evans, M.D. (2006) Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin. Chim. Acta* 365:30 – 49.

Cruysberg, J.R.M.; Boers, G.H.J.; Trijbels, J.M.; Deutman, A.F. (1996) Delay in diagnosis of homocystinuria: retrospective study of consecutive patients. *BMJ* 313:1037-1040.

Da Cunha, A.A.; Ferreira, A.G.K.; Da Cunha, M.J.; Pederzoli, C.D.; Becker, D.L.; Coelho, J.G.; Dutra-Filho, C.S.; Wyse, A.T.S. (2011) Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. *Mol. Cell Biochem.* 358:153-160.

Deon, M.; Wajner, M.; Sirtori, L.R.; Fitarelli, D.; Coelho, D.; Sitta, A.; Barschak, A.G.; Ferreira, G.C.; Haeser, A.; Giugliani, R.; Vargas, C.R. (2006) The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Neurol. Sci.* 247:157-164.

Deon, M.; Sitta, A.; Barschak, A.G.; Coelho, D.M.; Pigatto, M.; Schmitt, G.O.; Jardim, L.; Giugliani, R.; Wajner, M.; Vargas, C.R. (2007) Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25:441-444.

Derin, N.; Izgut-Uysal, V.N.; Agac, A.; Aliciguzel, Y.; Demir, N. (2004) L-Carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J. Physiol. Pharmacol.* 55:595-606.

Dudman, N.P.B.; Wilcken, D.E.L. (1983) Increased plasma copper in patients with homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Clin. Chim. Acta* 127: 105–113.

Faraci, F.M.; Lentz, S.R. (2004) Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 35:345–347.

Ferguson, E.; Parthasarathy, S.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. (1998) Generation and initial characterization of a novel polyclonal antibody directed against homocysteine thiolactone-modified low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 39:925-933.

Filippon, L.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Pereira, I.N.; Manfredini, V.; Sitta, A.; Peralba, M.C.R.; Schwartz, I.V.D.; Giugliani, R.; Vargas, C.R. (2011a) Oxidative

stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. *Mol. Genet. Metab.* 103:121-127.

Filippon, L.; Wayhs, C.A.; Atik, D.M.; Manfredini, V.; Herber, S.; Carvalho, C.G.; Schwartz, I.V.D.; Giugliani, R.; Vargas, C.R. (2011b) DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. *Mutat. Res.* 721:206-210.

Fontella, F.U.; Pulronik, V.; Gasse, E.; Wanmacher, C.M.D.; Klein, A.B.; Wajner, M. Dutra-Filho, C.S. (2000) Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport.* 11:541-544.

Fowler, B. (2008) Homocysteine, S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine. In: Blau, N.; Duran, M.; Gibson, K.M. (Eds), *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.112-135.

Gerritsen, T.; Vaughn, J.G.; Waisman, H.A. (1962) The identification of homocystine in the urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9:493-496.

Gülçin, I. (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 78:803 – 811.

Halliwell, B. (2006) *Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life.* *Plant Physiol.* 141:312-322.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Oxford University Press.

Huang, R.F.S.; Huang, S.M.; Lin, B.S.; Wei, J.S.; Liu, T.Z. (2001) Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci.* 68:2799–2811.

Jakubowski, H. (1999) Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J.* 13:2277–2283.

Jakubowski, H.; Boers, G.H.J.; Strauss, K.A. (2008) Mutations in cystathionine  $\beta$ -synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase *N*-homocysteinylation protein levels in humans. *FASEB J.* 22:4071–4076.

Jimenez-Sanchez, G.; Childs, B.; Valle, D. (2001) The Effect of Mendelian Disease on Human Health. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (Eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p.167-174.

Lawson-Yuen, A.; Levy, H.L. (2006) The use of betaine in the treatment of elevated homocysteine. *Mol. Genet. Metab.* 88:201-207.

Lin, P.Y.; Yang, T.H.; Lin, H.G.; Hu, M.L. (2007) Synergistic effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage in a murine microglial cell line *Clin. Chim. Acta.* 379:139–144.

Loscalzo, J. (1996) The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest.* 98:5-7.

Matté, C.; Mackedanz, V.; Stefanello, F.M.; Scherer, E.B.S.; Andreatza, A.C.; Zanutto, C.; Moro, A.M.; Garcia, S.C.; Gonçalves, C.A.; Erdtmann, B.; Salvador, M.; Wyse, A.T.S. (2009) Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: Protective effect of folic acid. *Neurochem. Int.* 54:7-13.

Mescka, C.; Moraes, T.; Rosa, A.; Mazzola, P.; Piccoli, B.; Jacques, C.; Dalazen, G.; Coelho, J.; Cortes, M.; Terra, M.; Vargas, C.R.; Dutra-Filho, C.S. (2011) *In vivo* neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 26:21-28.

Mudd, S.H.; Finkelstein, J.D.; Irreverre, F.; Laster, L. (1964) Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science*. 143:1443-1445.

Mudd, S.H.; Skovby, F.; Levy, H.L.; Pettigrew, K.D.; Wilcken, B.; Pyeritz, R.E.; Andria, G.; Boers, G.H.; Bromberg, I.L.; Cerone, R.; Fowler, B.; Gröbe, H.; Schmidt, H.; Schweitzer, L. (1985) The natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 37:1-31.

Mudd, S.H.; Levy, H.L.; Kraus, J.P. (2001) Disorders of transsulfuration, In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (Eds.) *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p. 2007–2056.

Oikawa, S.; Murakami, K.; Kawanishi, S. (2003) Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis *Oncogene*. 22:3530–3538.

Rao, T.N.; Radhakrishna, K.; Rao, T.S.M.; Guruprasad, P.; Ahmed, K. (2008) Homocystinuria due to cystathionine beta synthase deficiency. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 74:375-378.

Refsum, H.; Fredriksen, A.; Meyer, K.; Ueland, P.M.; Kase, B.F. (2004) Birth prevalence of homocystinuria. *J. Pediatr.* 144:830-832.

Ribas, G.S.; Manfredini, V.; de Mari, J.F.; Wayhs, C.Y.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B., Sitta, A.; Deon, M.; Wajner, M.; Vargas, C.R. (2010a) Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int. J. Devl. Neurosci.* 28:127–132.

Ribas, G.S.; Manfredini, V.; de Marco, M.G.; Vieira, R.B.; Wayhs, C.Y.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B., Wajner, M.; Vargas, C.R. (2010b) Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat. Res.* 702:123–128.

Robert, K.; Nehmé, J.; Bourdon, E.; Pivert, G.; Friguet, B.; Delcayre, C.; Delabar, J.M.; Janel, N. (2005) Cystathionine  $\beta$  synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology*. 128:1405-1415.

Rosenblatt, D.S.; Fenton, W.A. (2001) Inherited Disorders of Folate and Cobalamin Transport and Metabolism. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (Eds.) *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p.3897–3933.

Saudubray, J.M.; Desguerre, I.; Sedel, F.; Charpentier, C. (2006) A Clinical Approach to Inherited Metabolic Diseases. In: Fernandes, J.; Saudubray, J.M.; Van Den Berghe, G.; Walter, J.H. (Eds) *Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment*. 4<sup>th</sup> ed. Würzburg: Springer Medizin Verlag, p.4-48.

Schulpis, K.H.; Nounopoulos, C.; Scarpalezou, A.; Bouloukos, A.; Missiou-Tsagarakis, S. (1990) Serum carnitine level in phenylketonuric children under dietary control in Greece. *Acta Paediatr. Scand*. 79:930–934.

Schwahn, B.C.; Hafner, D.; Hohlfeld, T.; Balkenhol, N.; Laryea, M.D.; Wendel, U. (2003) Pharmacokinetics of oral betaine in healthy subjects and patients with homocystinuria. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 55:6-13.

Schwartz, I.V.; De Souza, C.F.; Giugliani R. (2008) Treatment of inborn errors of metabolism. *J. Pediatr*. 84:S8-S19.

Selhub, J. (1999) Homocysteine metabolism. *Annu. Rev. Nutr*. 19:217–246.

Sibrian-Vazquez, M.; Escobedo, J.O.; Lim, S.; Samoei, G.K.; Strongin, R.M. (2010) Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. *PNAS* 107:551–554.

Sierra, C.; Vilaseca, M.A.; Moyano, D.; Brandi, N.; Campistol, J.; Lambruschini, N.; Cambra, F.J.; Deulofeu, R.; Mira, A. (1998) Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin. Chim. Acta* 276:1–9.



Sirtori, L.R.; Dutra-Filho, C.S.; Fitarelli, D.; Sitta, A.; Haeser, A.; Barschak, A.G.; Wajner, M.; Coelho, D.M.; Llesuy, S.; Belló-Klein, A.; Giugliani, R.; Deon, M.; Vargas, C.R. (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim. Biophys. Acta* 1740:68–73.

Sitta, A.; Barschak, A.G.; Deon, M.; Terroso, T.; Pires, R.; Giugliani, R.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Vargas, C.R. (2006) Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab. Brain Dis.* 21:287-296.

Sitta, A.; Barschak, A.G.; Deon, M.; de Mari, J.F.; Barden, A.T.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Schwartz, I.V.D.; Wajner, M.; Vargas, C.R. (2009) L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol. Neurobiol.* 29:211–218.

Sitta, A.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Manfredini, V.; de Oliveira, A.B.; Wayhs, C.A.Y.; Ribas, G.O.S.; Giugliani, R.; Schwartz, I.V.D.; Bohrer, D.; Garcia, S.C.; Wajner, M.; Vargas, C.R. (2011) Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol. Neurobiol.* 31:429–436.

Skovby, F. (2003) Disorders of Transsulfuration. In: Blau, N.; Duran, M.; Blaskovics, M.E.; Gibson, K.M. (Eds) *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.243-260.

Smith, C.M.; Marks, A.D.; Lieberman, M.A. (2005) *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Starkebaum, G.; Harlan, JM. (1986) Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.* 77:1370-1376.

Streck, E.L.; Vieira, P.S.; Wannmacher, C.M.D.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2003) In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab. Brain Dis.* 18:147-154.

Sweetman, L. (1996) Newborn screening by tandem mass spectrometry (MS/MS). *Clin. Chem.* 42:345-346.

Treacy, E.P.; Valle, D.; Scriver, C.R. (2001) Treatment of Genetic Disease. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (Eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p.175-191.

Vargas, C.R.; Wajner, M.; Sirtori, L.R.; Goulart, L.; Chiochetta, M.; Coelho, D.M.; Latini, A.; Llesuy, S.; Bello-Klein, A. Giugliani, R.; Deon, M.; Mello, C.F. (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1688:26-32.

Vilaseca, M.A.; Briones, P.; Ferrer, I.; Campistol, J.; Riverola, A.; Castillo, P.; Ramon, F. (1993) Controlled diet in phenylketonuria may cause serum L-carnitine deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 16:101-104.

Yap, S.; Naughten, E. (1998) 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. *J. Inherit. Metab. Dis.* 21:738-747.

Yap, S.; Boers, G.H.J.; Wilcken, B.; Wilcken, D.E.L.; Brenton, D.P.; Lee, P.J.; Walter, J.H.; Howard, P.M.; Naughten, E.R. (2001) Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency treated chronically: A multicenter observational study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:2080-2085.

## **ANEXO 1**

### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Metabolismo da homocisteína e metionina. Desordens das vias de transulfuração e remetilação.

## ANEXO 2



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

#### COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 100290

**Versão do Projeto:** 23/08/2010

**Versão do TCLE:** 23/08/2010

**Pesquisadores:**

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ  
CAROLINA FISCHINGER MOURA DE SOUZA  
CRISTINA BRINCKMANN OLIVEIRA NETTO  
DAIANE GRIGOLO BARDEMAKER RODRIGUES  
MOACIR WAJNER  
CAMILA SIMIONI VANZIN  
IZABELA NETTO PEREIRA  
ANGELA SITTA  
CARMEN REGLA VARGAS

**Título:** Investigação de estresse oxidativo em pacientes portadores de Homocistinúria antes e durante o tratamento.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 26 de agosto de 2010.

  
Prof. Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

## **ANEXO 3**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes com Homocistinúria**

**Projeto:** Investigação de estresse oxidativo em pacientes portadores de homocistinúria antes e durante o tratamento.

#### **Pesquisadoras Responsáveis:**

Profa. Dra. Carmen Regla Vargas. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS. Telefone: 51 33598011

Mestranda Camila Simioni Vanzin. 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 se acumula no sangue. Níveis altos desse aminoácido são tóxicos para o organismo, podendo causar complicações como problemas nos ossos e nos olhos, trombose (formação de coágulos nos vasos sanguíneos) e retardo mental.

O tratamento é essencial para prevenir ou impedir o avanço de tais complicações, além de promover o crescimento e desenvolvimento adequados. As principais formas de tratamento incluem o uso de medicamentos específicos que diminuem a homocisteína e, em alguns casos, a adoção de uma dieta especial com pouca proteína, que previne o aumento de homocisteína.

Pouco se sabe sobre como a homocisteína provoca as complicações observadas nos pacientes, mas uma das hipóteses é que ela prejudique o organismo por um mecanismo chamado estresse oxidativo. O estresse oxidativo provoca aumento de substâncias que danificam ou matam as células. Diversos estudos mostram que o estresse oxidativo está ligado a doenças como câncer, diabetes e a aterosclerose (entupimento das artérias). Na homocistinúria, o aumento da homocisteína pode gerar estresse oxidativo.

O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com homocistinúria.

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com os pacientes, bem como através da medida da concentração no sangue dos aminoácidos metionina e homocisteína e da medida da ação dos radicais livres em sangue. Esses dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras dos pacientes, não sendo necessário o comparecimento dos pacientes em consultas extras.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e o acesso do indivíduo às mesmas.

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, não havendo qualquer tipo de prejuízo no seu atendimento normal.

Eu, ....., declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado pela pesquisadora Camila Simioni Vanzin dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, preservação da privacidade, concordando ainda em participar da pesquisa.

Data:

Paciente:

Responsável legal:

Eu expliquei a ..... os objetivos e procedimentos para esta pesquisa.

Data:

Nome:

## **ANEXO 4**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Indivíduos Saudáveis (Controles)**

**Projeto:** Investigação de estresse oxidativo em pacientes portadores de homocistinúria antes e durante o tratamento.

#### **Pesquisadoras Responsáveis:**

Profa. Dra. Carmen Regla Vargas. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS. Telefone: 51 33598011  
Mestranda Camila Simioni Vanzin. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS. Telefone: 51 33598011

Prezado controle ou responsável,

A homocistinúria é uma doença hereditária na qual um aminoácido chamado homocisteína se acumula no sangue. Níveis altos desse aminoácido são tóxicos para o organismo, podendo causar complicações como problemas nos ossos e nos olhos, trombose (formação de coágulos nos vasos sanguíneos) e retardo mental.

O tratamento é essencial para prevenir ou impedir o avanço de tais complicações, além de promover o crescimento e desenvolvimento adequados. As principais formas de tratamento incluem o uso de medicamentos específicos que diminuem a homocisteína e, em alguns casos, a adoção de uma dieta especial com pouca proteína, que previne o aumento de homocisteína.

Pouco se sabe sobre como a homocisteína provoca as complicações observadas nos pacientes, mas uma das hipóteses é que ela prejudique o organismo por um mecanismo chamado estresse oxidativo. O estresse oxidativo provoca aumento de substâncias que danificam ou matam as células. Diversos estudos mostram que o estresse oxidativo está ligado a doenças como câncer, diabetes e a aterosclerose (entupimento das artérias). Na homocistinúria, o aumento da homocisteína pode gerar estresse oxidativo.

O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com homocistinúria. Além disso, indivíduos saudáveis também

serão convidados a participar do estudo, a fim de que seja possível comparar o estresse oxidativo destes indivíduos com aquele presente em indivíduos com homocistinúria.

Sua participação neste estudo consiste na coleta de 10 mL de sangue para análise do estresse oxidativo.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue para o estudo são semelhantes aos 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.

O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e o acesso do indivíduo às mesmas.

Sua participação é voluntária.

Eu, ....., declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado pela pesquisadora Camila Simioni Vanzin dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, preservação da privacidade, concordando ainda em participar da pesquisa.

Data:

Paciente:

Responsável legal:

Eu expliquei a ..... os objetivos e procedimentos para esta pesquisa.

Data:

Nome:



## ANEXO 5

### Instruções do periódico Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.

#### GUIDE FOR AUTHORS

---

##### INTRODUCTION

Molecular and Fundamental Mechanisms broadly encompasses all aspects of research that address the detection of mutations, the mechanisms by which mutations in genes and chromosomes arise, and the modulation of mutagenesis by mutation avoidance pathways such as DNA repair, cell cycle control and apoptosis. It includes the role of genetic variation in the genesis and manifestation of mutations, ranging from the variable manner in which xenobiotics are metabolized to variations in the capacity of cells to replicate and repair damaged DNA. It also includes the contributions of these mechanisms, when perturbed, to animal disease models and to human disease, with particular emphasis on carcinogenic mechanisms. Chromosome stability is paramount for maintaining cellular homeostasis. Therefore, the Journal will publish articles on the genesis of aneuploidy and isodisomy, including the roles played by cell cycle checkpoints, spindle microtubules, centrosomes and kinetochore proteins, and agents that might disrupt them. Since isodisomy can occur as a consequence of recombination, all aspects of homologous recombination and non-homologous end joining are appropriate. Submission of appropriate epidemiological studies as well as consequences, including methods for high throughput SNP detection, DNA microarrays and proteomic approaches, are welcome. The broader scope of the journal is a reflection of the rapid advances in the field of mutation research and the recognition that cellular responses to DNA damage, including cell cycle checkpoint arrest and apoptosis, cannot be dissociated from the immediate mechanisms by which DNA is damaged and repaired.

##### Types of Paper

*Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* publishes the following types of article: (I) Research papers - papers reporting results of original, fundamental research. (II) Short communications of up to 5 printed pages. (III) Rapids - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) Current issues are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited Mini-reviews of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old.

Please note that Full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the Reviews section are invited papers in the series Reflections in Mutation Research, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. Special issues, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of Mutation Research by topic or article type.

##### Page charges

This journal has no page charges.

##### BEFORE YOU BEGIN

##### Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

##### Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

*Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* requires full disclosure of all potential conflicts of interest. At the end of the manuscript text (and in the cover letter of the manuscript), under a subheading "Conflict of Interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest." Signed copies of the *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded here. In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit

your manuscript. The corresponding author is responsible for sharing this document with all co-authors. Each and every co-author must sign an individual disclosure form. The corresponding author is responsible for uploading their form and those of their co-authors.

#### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

#### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.

#### Special Subject Repositories

Certain repositories such as PubMed Central ( PMC ) are authorized under special arrangement with Elsevier to process and post certain articles such as those funded by the National Institutes of Health under its Public Access policy (see [elsevier.com](http://elsevier.com) for more detail on our policy). Articles accepted for publication in an Elsevier journal from authors who have indicated that the underlying research reported in their articles was supported by an NIH grant will be sent by Elsevier to PMC for public access posting 12 months after final publication. The version of the article provided by Elsevier will include peer-review comments incorporated by the author into the article. Because the NIH Public Access policy is voluntary, authors may elect not to deposit such articles in PMC. If you wish to opt out and not deposit to PMC, you may indicate this by sending an e-mail to: [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com)

#### Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

#### Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

#### Referees

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 4 potential referees.

### PREPARATION

#### Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

#### Article structure

##### Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Your abstract should not exceed **300** words.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide 3-6 keywords or short phrases, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **MINT**: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

### Accession Numbers

Accession numbers are unique identifiers in bioinformatics allocated to nucleotide and protein sequences to allow tracking of different versions of that sequence record and the associated sequence in a data repository [e.g., databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine ('GenBank') and the Worldwide Protein Data Bank]. There are different types of accession numbers in use based on the type of sequence cited, each of which uses a different coding. Authors should explicitly mention the *type of accession number together with the actual number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: accession number type ID: xxxx (e.g., MMDB ID: 12345; PDB ID: 1TUP). Note that in the final version of the *electronic copy*, accession numbers will be linked to the appropriate database, enabling readers to go directly to that source from the article.

### Minimum Information About a Microarray Experiment - MIAME

Nucleic acid and protein sequences (sequences that have not been previously published), macromolecular structures determined by X-ray crystallography (along with structure factors), and microarray data must be deposited in the appropriate public database (<http://www.cell.com/misc/page?page=misc5>) and must be accessible without restriction from the date of publication. An entry name or accession number must be included as the last paragraph of the Experimental Procedures section in the final version of the manuscript. Microarray data should be MIAME compliant (for guidelines see <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>).

#### Gene accession numbers

In the electronic version of a published manuscript, gene accession numbers will be linked directly to the gene's description in NCBI's Nucleotide sequence database. The accession number should be formatted as follows:

Accession no. AJ315850 and in the text e.g. ". . . at the amino acid sequence level to the human IDN3 gene (Accession No. AJ315850)."

The production department will then link this reference when they find it in the text. Authors should DOUBLE-CHECK the number they use to make absolutely sure that it is correct before referring to it in their paper. Accession numbers in proofs should also always be checked for correctness. The number is an essential part of the link.

#### Artwork

##### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

##### Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

##### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

##### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

##### *Reference style*

**Text:** Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

**List:** Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

##### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video

file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

##### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

#### **AFTER ACCEPTANCE**

##### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

##### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with



PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

#### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

#### **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>