

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Danielli Gonçalves Forgiarini**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS EM PACIENTES PORTADORES  
DE HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA SOB TRATAMENTO**

Porto Alegre  
novembro 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS EM PACIENTES PORTADORES  
DE HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA EM TRATAMENTO**

Trabalho de Diplomação apresentado ao Departamento de Análises da  
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como  
parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutica

**Danielli Gonçalves Forgiarini**

**Orientadora: Profa. Carmen Regla Vargas**

Porto Alegre  
novembro 2015

**Avaliação do perfil de aminoácidos em pacientes portadores de Homocistinúria Clássica em tratamento.**

DanielliGonçalves Forgiarini<sup>1</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup> Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brasil

**Autor correspondente:**

Prof. Dra. Carmen Regla Vargas

E-mail: [crvargas@hcpa.edu.br](mailto:crvargas@hcpa.edu.br)

Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Avenida Ipiranga, 2752, sala 503, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. CEP: 90.610-000

“Se andarmos apenas por caminhos já traçados,  
chegaremos apenas aonde os outros já chegaram.”

*Alexandre Gran Bell*

Este trabalho foi elaborado segundo as normas da revista “Clinical and Biomedical Research” (CBR), conforme Anexo I, na qualidade de “Artigo Original”.

## RESUMO

**Introdução:** Pacientes portadores de Homocistinúria Clássica (deficiência da cistationina- $\beta$ -sintase) apresentam elevados níveis plasmáticos de homocisteína. A terapia preconizada para este erro inato do metabolismo baseia-se na administração de vitaminas (B6, B12 e folato) juntamente com uma dieta hipoprotéica. O objetivo desse estudo foi investigar os níveis plasmáticos de homocisteína, metionina e demais aminoácidos em pacientes homocistinúricos submetidos à terapia.

**Métodos:** Para a realização do estudo foram selecionados 8 pacientes homocistinúricos do Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A dosagem de homocisteína no plasma foi realizada por Espectometria de Massas em Tandem (LC-MS/MS) e os demais aminoácidos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). Os resultados encontrados foram comparados com um grupo de indivíduos controles saudáveis previamente selecionado. Todas as análises estatísticas foram executadas usando o software SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”).

**Resultados:** Os valores encontrados para a dosagem de homocisteína ( $128,20 \pm 119,2$   $\mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão), metionina ( $183,4 \pm 154,4$   $\mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão), glutamato ( $27,15 \pm 13,69$   $\mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) e glutamina ( $576,3 \pm 131,8$   $\mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle.

**Conclusão:** Os resultados encontrados neste estudo permitiram sugerir uma provável baixa adesão ao tratamento proposto por parte dos pacientes homocistinúricos estudados, bem como possíveis alterações relacionadas a atividade da enzima glutaminase, responsável pela conversão de glutamina e glutamato. Esses achados demonstram a importância do presente trabalho, sugerindo dessa forma, estudos posteriores referentes a uma avaliação na concentração sanguínea dos agentes terapêuticos nos pacientes, bem como a investigação da atividade da enzima glutaminase na homocistinúria.

Palavras-chave: homocisteína; metionina; cistationina  $\beta$ -sintase; aminoácidos; vitamina B6; vitamina B12; folato.

## ABSTRACT

**Introduction:** Patients with Classic Homocystinuria (cystathionine- $\beta$ -synthase deficiency) have elevated plasma levels of homocysteine. The therapy recommended for this inborn error of metabolism is based on the administration of vitamins (B6, B12 and folate) together with a low protein diet. The aim of this study was to evaluate the amino acid profile of homocystinuria patients undergoing therapy, analyzing homocysteine, methionine and other amino acids, plasma levels.

**Methods:** Eight patients with Homocystinuria were selected from Genetic Medical Service (SGM) from Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA). Plasma homocysteine measurement was done by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and the remaining amino acids were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results were compared with a healthy control group of individuals previously selected. All statistical analyses were performed using SPSS software ("Statistical Package for Social Sciences").

**Results:** Homocysteine ( $128,20 \pm 119,2 \mu\text{mol/L}$ ; mean  $\pm$  standard deviation), methionine ( $183,4 \pm 154,4 \mu\text{mol/L}$ ; mean  $\pm$  standard deviation), glutamate ( $27,15 \pm 13,69 \mu\text{mol/L}$ ; mean  $\pm$  standard deviation) and glutamine ( $576,3 \pm 131,8 \mu\text{mol/L}$ ; mean  $\pm$  standard deviation) levels in patients showed a statistically significant difference when compared to the control group.

**Conclusion:** The results of this study allowed to suggest a likely poor adherence to treatment proposed by the homocystinuric patients studied and possible changes related to the activity of glutaminase enzyme responsible for the conversion of glutamine and glutamate. These findings demonstrate the importance of this study suggesting thereby further studies related to the evaluation of the blood concentration of therapeutic agents in patients, as well as the investigation of the enzyme glutaminase activity in Homocystinuria.

Keywords: homocysteine; methionine; cystathionine  $\beta$ -synthase; amino acids; vitamin B6; vitamin B12; folate.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – Alanina

AVC – Acidente Vascular Cerebral

CBS – Cistationina  $\beta$ - sintase

EIM – Erro Inato do Metabolismo

FAL – Fenilalanina

GLI – Glicina

GLN – Glutamina

GLU – Glutamato

HC – Homocistinúria Clássica

HCI – Homocisteína

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HH – Hiper – Homocisteinemia

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

ILEU – Isoleucina

LC-.MS/MS – Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas em Tandem

LEU – Leucina

LIS – Lisina

MET – Metionina

ORN – Ornitina

SER – Serina

TIR – Tirosina

TRP – Triptofano

VAL – Valina

## INTRODUÇÃO

Hiper-homocisteinemia (HH) caracteriza-se pela elevação plasmática do aminoácido Homocisteína (HCl), tendo como origem fatores patológicos, fisiológicos, mas principalmente fatores genéticos e nutricionais<sup>1</sup>. A Homocistinúria Clássica (HC) é definida como uma desordem metabólica, cuja principal causa se deve a deficiência da enzima cistationina-β-sintase(CBS), considerada a segunda principal aminoacidopatia tratável<sup>2</sup>. Outras alterações enzimáticas e funcionais podem estar relacionadas a diferentes formas de HH, dentre as quais: deficiência das enzimas metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e metionina sintase (MS), bem como defeitos no metabolismo intracelular de cobalamina<sup>3</sup>. Como consequência do bloqueio enzimático, portadores de deficiência de CBS apresentam um acúmulo de HCl, Metionina (MET) e uma variedade de outros metabólitos, os quais podem ser excretados através da urina<sup>3,4,5</sup>.

Essa desordem metabólica foi primeiramente descrita por Carson e Neill<sup>6</sup>(1962) e mais tarde por Gerritsen e colaboradores<sup>7</sup> (1962), que a definiram como um erro inato do metabolismo (EIM) de transmissão autossômica recessiva, e que apresenta incidência na deficiência homozigótica estimada em 1 para cada 335.000 nascimentos<sup>5,8</sup>. Indivíduos portadores dessa anormalidade bioquímica, ao nascimento, apresentam-se normais e, se não tratados, desenvolvem progressivamente os principais achados e sintomas fisiopatológicos, como: luxação das lentes oculares, retardo mental, transtornos psiquiátricos, crises convulsivas, anormalidades esqueléticas (altura e comprimento excessiva dos membros), osteoporose e tromboembolismo<sup>3,5,9</sup>. Devido ao aminoácido HCl apresentar efeito pró-aterogênico e pró-trombótico, o aumento do risco de acidente vascular cerebral (AVC) vem sendo relatado em diversos estudos, associado à crescente prevalência em indivíduos hiper homocistinúricos<sup>10</sup>. Segundo Neves *et al.*<sup>11</sup> mais de 40% dos pacientes com doença primária da artéria coronária, cerebrovascular ou vascular periférica apresentam HH.

Níveis plasmáticos de HCl podem variar com a idade, sexo, genética, estilo de vida e dieta alimentar. O valor de referência para indivíduos não portadores desse distúrbio metabólico encontra-se abaixo de 15 μmol/l (6- 12 μmol/l para mulheres e 8-14 μmol/l para homens) dosados usualmente a partir de uma amostra de plasma de indivíduos em jejum<sup>11</sup>. A HCl

plasmática livre é encontrada na forma oxidada, formando dissulfetos como a homocistina e na forma de dissulfetos mistos como homocisteína-cisteína. Dois a cinco por cento da HCl plasmática livre está presente em sua forma reduzida e 70%-80% circulam ligados a proteínas plasmáticas, principalmente albumina. Dessa forma, a HCl plasmática total abrange a soma de todas essas formas<sup>11</sup>. O teste de triagem para HC baseia-se na identificação de homocistinana urina, através da reação positiva com o cianeto-nitroprussiato, no entanto, por apresentar diversos interferentes, torna-se necessário a identificação de HCl e seus metabólitos no plasma ou soro do paciente<sup>5</sup>. Logo, o diagnóstico é confirmado por meio da combinação de sinais clínicos com avaliações bioquímicas e/ou moleculares, sendo fundamental a dosagem de HCl e MET no sangue<sup>5</sup>.

A síntese de HCl ocorre através da intersecção das vias de remetilização e transulfuração do metabolismo da MET proveniente da dieta<sup>2</sup>, tendo como principais cofatores envolvidos vitamina B6 (piridoxina), vitamina B12 (cianocobalamina) e o folato (ácido fólico). Na via de remetilização ocorre a conversão de HCl a MET, sendo a MS a principal enzima responsável por essa conversão, encontrada em todas as células, requerendo vitamina B12 e folato como cofator e co- substrato respectivamente<sup>15</sup>.

Já na via de transulfuração ocorre a condensação da HCl com a serina, por meio da enzima CBS, dependente de piridoxal fosfato (vitamina B6) formando cistationina. Portanto, a via de transulfuração é responsável por efetivamente catabolizar o excesso de HCl<sup>15</sup>. No entanto, como consequência da deficiência enzimática de CBS, uma elevada concentração sanguínea desse aminoácido estará presente em indivíduos portadores de HC, conforme demonstrado na Figura 1.

Por se tratar de uma doença capaz de trazer sequelas irreversíveis aos pacientes com comprometimento da saúde física e mental, além de riscos vasculares, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são fundamentais para prevenir complicações e melhorar a qualidade de vida do paciente. Dessa forma, na prática clínica, as principais estratégias terapêuticas adotadas atualmente para o tratamento da deficiência de CBS incluem vitamina B6 em combinação com o ácido fólico e/ou vitamina B12<sup>11</sup>, ou ainda suplementação com cisteína<sup>5</sup>. A utilização de betaína, a qual promove a conversão de HCl em MET, também tem sido relatada como um adjuvante no tratamento<sup>12</sup>.

Analisando os altos riscos associados a elevação da HCl plasmática e levando em consideração que os principais agentes terapêuticos utilizados para prevenir complicações e tentar controlar os níveis bioquímicos desse aminoácido baseia-se na administração de vitaminas, suplementação com cisteína, e também em uma dieta hipoprotéica, principalmente com restrição de MET tanto para indivíduos responsivos à B6, quanto não responsivos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar níveis de HCl e MET em pacientes submetidos a tratamento. Além disso, também foi avaliado o perfil de aminoácidos: Glutamato (GLU), Serina (SER), Histidina (HIS), Glicina (GLI), Alanina (ALA), Glutamina (GLN), Tirosina (TIR), Triptofano (TRP), Valina (VAL), Fenilalanina (FAL), Isoleucina (ILEU), Leucina (LEU), Ornitina (ORN) e Lisina (LIS) com o intuito de investigar uma possível alteração devido a dieta hipoprotéica a qual são submetidos.

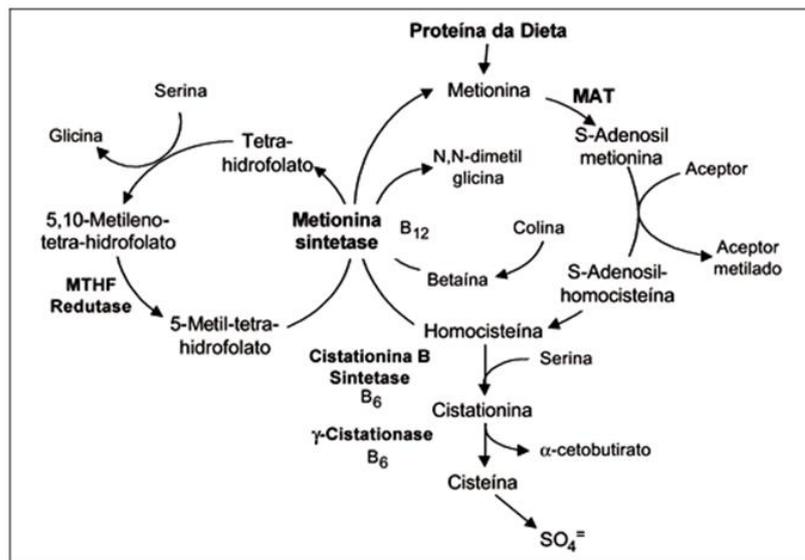


Figura 1– Esquema da via metabólica da homocisteína ( fonte:BYDLOWSKI et. al<sup>8</sup>, 1998)

## MÉTODOS

### **Pacientes e controles:**

A coleta de dados dos pacientes homocistinúricos por deficiência de CBS foi realizada no Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-(HCPA), RS, Brasil. Para as análises do presente estudo, foram selecionados 8 pacientes (idade média 28 anos; intervalo 18-39 anos) de ambos os sexos (Tabela 1) cadastrados no banco de dados do referido hospital. Os pacientes foram diagnosticados no SGM-HCPA com HCapós o período neonatal, através da detecção de concentrações plasmáticas elevadas de HCI total e MET, presença de sintomas clínicos e exames moleculares (dados não mostrados). As principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes foram luxação das lentes oculares, alongamento das extremidades ósseas, convulsões e atraso no desenvolvimento. Os pacientes seguiam um protocolo de tratamento baseado em uma dieta restrita em proteínas e suplementada com vitamina B6 (dose média: 500mg/dia, intervalo: 100-750mg/dia), ácido fólico (dose média: 5mg/dia; intervalo: 2-5mg/dia), betaína (dose média: 6g/dia; intervalo: 2-6g/dia) e vitamina B12 (dose média: 1mg/mês/IM). A duração média de tratamento foi de 10 anos(intervalo: 5-20 anos).

Para a composição do grupo controle, foram selecionados 19 indivíduos saudáveis e pareados por idade, com valores para HCI, MET e demais aminoácidos dentro dos valores de referência e sem diagnóstico de qualquer outro EIM. Desses indivíduos, dois grupos foram formados: um grupo para controle de HCI (n=10; idade média: 18 anos; intervalo: 1-49 anos) e outro grupo controle dos demais aminoácidos (n=9; idade média 12 anos; intervalo: 2-37 anos).

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil (10-0290). Todos os pacientes e indivíduos controle assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **Preparação das amostras biológicas**

Plasmas de pacientes portadores de HC e do grupo controle foram preparados a partir de sangue total coletados por punção venosa em tubos heparinizados. O sangue total foi centrifugado a 3000 rpm, e o plasma imediatamente removido por aspiração e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até as análises.

### **Dosagem dos aminoácidos**

O laboratório de Serviço de Genética Médica do HCPA dosa HCl através da espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). A dosagem dos demais aminoácidos é realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

### **Dosagem de HCl plasmática**

A dosagem de HCl foi realizada por cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) conforme descrito por Magera *et al.*<sup>13</sup>(1999). O método baseia-se na análise de 100  $\mu\text{L}$  de plasma adicionado a HCl d-8 (2nmol) utilizada como padrão interno. Primeiramente as amostras passam por um processo de redução através da adição de 20  $\mu\text{L}$  de solução redutora (ditiotreitól (DTT) 500nM) com posterior agitação em vórtex e repouso por 15 min à temperatura ambiente. Após ocorre sua desproteíntização com o uso de 200  $\mu\text{L}$  de solução desproteíntizante e posterior agitação em vórtex com centrifugação por 2 min a 13000rpm. Por fim, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante são transferidos para vial de injeção. A análise das amostras foi realizada no modo de monitorização de reação múltipla, onde são detectados níveis de HCl e HCl-d4 através da transição do íon precursor ( $m/z$  136- $m/z$  90 e  $m/z$  140- $m/z$  94, respectivamente). O tempo de retenção obtido para a HCl total e HCl d4 é de 1.5 e 2.5 min, respectivamente. Uma curva com 5 pontos (2,5  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ ) de concentração de HCl foi preparada para a realização da calibração, sendo o resultado expresso em  $\mu\text{mol/L}$ . A concentração plasmática de HCl é baseada na soma da HCl livre, ligada a proteínas e várias outras formas de dissulfeto.

### **Determinação nos níveis plasmáticos dos demais aminoácidos**

A dosagem de Glutamato (GLU), Serina (SER), Histidina (HIS), Glicina (GLI), Alanina (ALA), Tirosina (TIR), Triptofano (TRP), Metionina (MET), Valina (VAL), Fenilalanina (FAL), Isoleucina (ILEU), Leucina (LEU), Ornitina (ORN) e Lisina (LIS) foi realizada por HPLC, segundo o método de Joseph e Marsden<sup>14</sup> (1986). O procedimento consiste primeiramente na centrifugação das amostras de sangue total/heparinizado por 5 minutos a 3000 rpm com a posterior remoção do plasma. Quando a análise não é realizada imediatamente, os plasmas são armazenados em freezer (-20°C) e descongelados em banho-maria (37°C). A desproteinização das amostras é realizada através da adição de 200µL de metanola 50µl de plasma, com agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugação a 3000rpm por 10 minutos com subsequente remoção do sobrenadante. Pipetar em 40µL do sobrenadante, 50µL de mercaptoetanol (MCE (4%), 10µL de padrão interno (18,3mg de ácido homocistéico em 100 ml de água) e 200µL de ortoftaldialdeído (OPA) - (1 ml de OPA estoque e 10 µL de mercaptoetanol puro), após 2 min em repouso, introduzir 50 µL dessa solução no looping do HPLC para análise e quantificação dos aminoácidos. O OPA estoque é composto de 50mg ortoftaldialdeído, 1ml de metanol e 9 ml de borato de sódio (pH 9.5). Para a separação e detecção dos aminoácidos avaliados utiliza-se coluna de fase reversa C18 e detector de fluorescência, respectivamente. Para a fase móvel uma mistura de metanol/tampão fosfato (80% e 20% de metanol em pH 4,5) foi previamente preparada, sendo utilizado gradiente de fluxo. Os valores encontrados para a análise foram obtidos através da relação da área do pico do aminoácido da amostra com a área do pico do padrão interno, após calibração com padrão de aminoácidos de concentração conhecida.

### **Análise estatística**

Foi utilizado teste *t* de Student para dados não pareados para comparação entre os resultados de indivíduos controles e pacientes. Um valor de *p* menor que 0,05 foi considerado significativo. Todas as análises foram executadas usando o software SPSS (“StatisticalPackage for the Social Sciences”) em um computador compatível.

## RESULTADOS

Nesse trabalho foi avaliado e comparado o perfil de aminoácidos em plasma de pacientes portadores de HC em terapia com os valores encontrados para o grupo controle de indivíduos saudáveis.

O presente estudo encontrou um aumento significativo nos níveis de HCl ( $128,20 \pm 119,2 \mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle ( $6,94 \pm 2,69 \mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) [ $t(18) = 0,0051, p < 0,05$ ]. (Figura 2).

Em relação aos valores encontrados na dosagem de MET, houve uma elevação significativa no grupo de pacientes ( $183,4 \pm 154,4 \mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) em comparação ao grupo controle ( $17,89 \pm 6,36 \mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) [ $t(17) = 0,0056, p < 0,05$ ], conforme Figura 3.

Os valores encontrados de HCl e MET para cada paciente encontram-se descritos na Tabela 2.

Quanto ao perfil dos demais aminoácidos analisados, encontrou-se diferença significativa apenas na dosagem de GLU e GLN. Concentrações significativamente diminuídas de GLU ( $27,15 \pm 13,69 \mu\text{mol/L}$ ; média  $\pm$  desvio padrão) foram encontradas em relação ao grupo controle ( $64,42 \mu\text{mol/L} \pm 29,56$ ; média  $\pm$  desvio padrão) [ $t(17) = 0,0053, p < 0,05$ ], ilustrado na Figura 4.

Para os níveis de GLN, foram encontrados valores significativamente maiores para os pacientes ( $576,3 \pm 131,8$ ; média  $\pm$  desvio padrão) quando comparados ao grupo controle ( $422,0 \pm 105,8$ ; média  $\pm$  desvio padrão) [ $t(17) = 0,0177, p < 0,05$ ], demonstrado na Figura 5.

Os demais aminoácidos avaliados não apresentaram diferença significativa entre ambos os grupos, conforme descritos na Tabela 3.

## DISCUSSÃO

Os primeiros estudos relacionados a HCl datam de 1932, quando Vicent Du Vigneaud estudou a importância bioquímica e nutricional desse aminoácido<sup>1</sup>. Diversos estudos posteriores destacaram e revelaram seu papel fisiológico e riscos associados a elevados níveis plasmáticos.

Dentre os fatores de risco para fenômenos ateroscleróticos e tromboembólicos, a HH enquadra-se como o mais relevante na atualidade, demonstrando uma elevada associação com doença vascular prematura em adultos<sup>15</sup>. Segundo Picker *et al.*<sup>9</sup>, tromboembolismo é a principal causa de morbimortalidade em pacientes portadores de deficiência de CBS. Apesar de inúmeras quantidades de dados epidemiológicos que correlacionam HH e aumento do risco vascular, os mecanismos associados à patogenia são apenas parcialmente compreendidos, destacando-se a lesão da célula endotelial, crescimento da musculatura lisa vascular, maior adesividade plaquetária e ativação direta da cascata da coagulação<sup>11</sup>. Além disso, estudos vêm apontando o estresse oxidativo como um possível mecanismo através do qual a HCl exerce seus efeitos tromboembólicos<sup>3</sup>.

Como descrito anteriormente, a formação de HCl se deve a intersecção de duas vias (transulfuração e remetilização) do metabolismo da MET.

Pacientes portadores de HC devido ao bloqueio enzimático de CBS apresentam um acúmulo tecidual e sanguíneo de HCl. No entanto, quando submetidos a tratamento e seguindo a linha de terapia proposta espera-se encontrar níveis diminuídos ou até normalizados deste aminoácido. Surpreendentemente, os pacientes estudados no presente trabalho, apresentaram valores elevados de HCl mesmo em tratamento por longo período.

Em relação a dosagem de MET nos pacientes, os valores encontram-se em conformidade com os encontrados para HCl, pois o excesso de HCl leva a um consequente aumento na taxa de síntese de MET, portanto, ambas as vias do metabolismo da HCl estarão afetadas, resultando em uma HH severa<sup>3</sup>. Além disso, pode-se observar que possivelmente a restrição dietética de proteínas não está sendo seguida pelos pacientes.

Considerando a importância do tratamento com o objetivo de controlar e, se possível, normalizar níveis bioquímicos de HCl em pacientes CBS deficientes, diversos estudos vêm mostrando a importância de alguns agentes terapêuticos empregados nessa patologia. Segundo Vanzinet *al.*<sup>3</sup> piridoxina (vitamina B6) na dose aproximada de 200mg/dia deve ser administrada a indivíduos responsivos a essa vitamina. Enquanto que, para indivíduos não responsivos o tratamento baseia-se somente na restrição proteica, com frequente monitoramento metabólico. A piridoxina como cofator da CBS estimula a atividade enzimática e conseqüentemente diminui os níveis de HCl<sup>5</sup>. Vitamina B12 (hidroxicobalamina) e folato (ácido fólico) otimizam a conversão da HCl em MET, através da MS, ajudando na diminuição plasmática de HCl, com administração mensal de 1mg intramuscular e 5mg/dia, respectivamente. O ácido fólico é convertido a 5-metiltetraidrofolato, atuando como doador de grupo metil na conversão de HCl a MET<sup>5-15</sup>. Matté *et al.*<sup>16</sup> destacou a importância do ácido fólico na terapia, apontando uma diminuição significativa no nível de HCl, possivelmente relacionada a um aumento na via de remetilação da HCl. Em adição a isso, uma meta-análise realizada por Clarke *et al.*<sup>17</sup> indicou que, dentre as vitaminas estudadas (B6, B12 e ácido fólico), o ácido fólico promoveu uma redução de até 25% na HCl sanguínea quando suplementado de 50 a 500 mg diariamente. A betaína, utilizada muitas vezes como adjuvante ao tratamento, fornece um caminho alternativo de remetilação do excesso de HCl à MET, com dose usual de 6-9 g/dia

Analisando os altos valores de HCl e MET encontrados no plasma dos pacientes com HC do presente estudo e, tendo em vista que o tratamento prescrito para os pacientes incluía dieta restrita em proteínas, suplementada com piridoxina (vitamina B6), betaína, vitamina B12 e ácido fólico, duas hipóteses podem ser elaboradas para explicar esses achados: uma relacionada à baixa adesão ao tratamento com dieta hipoprotéica e/ou outra uma baixa adesão ao tratamento vitamínico.

Os níveis dos demais aminoácidos dos pacientes estudados que estavam sob dieta hipoprotéica, na qual alimentos ricos em proteínas, como carnes, aves, feijão, leites e derivados deveriam ser evitados, não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos indivíduos do grupo controle, exceto os níveis de GLU e GLN. Levando-se em consideração que a digestão das proteínas alimentares no intestino e a sua degradação intracelular fornecem um suprimento constante de aminoácidos para a célula,<sup>18</sup> indivíduos com uma ingestão hipoprotéica poderiam sofrer alguma alteração a níveis dos aminoácidos. Os

resultados encontrados nos pacientes estudados parecem sugerir uma baixa adesão à dieta hipoprotéica.

A GLN é considerada o aminoácido mais abundante na circulação. A proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, o balanço ácido-básico, o transporte da amônia entre os tecidos, entre outros, são algumas das funções em que a GLN está envolvida<sup>19</sup>, sendo, ainda, precursora na síntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos nucléicos, açúcares, proteínas, dentre outras. Do ponto de vista estritamente metabólico, a GLN e o GLU são intercambiáveis, através da atividade de duas enzimas: glutamina sintetase e a glutaminase. Em mamíferos, a glutaminase pode ser encontrada sob duas isoformas, uma (menos abundante) no fígado e outra nos demais tecidos, tais como rins, cérebro, leucócitos e trato gastrintestinal, com envolvimento em diversos processos metabólicos<sup>19</sup>. Observando-se os valores encontrados no presente trabalho para os aminoácidos em questão, uma possível alteração/danos na atividade da enzima (glutaminase) convertora de GLU à GLN surge como hipótese para justificar esses achados<sup>19</sup>. Desta forma, uma investigação sobre a atividade da enzima glutaminase em modelos animais e/ou em pacientes deficientes em CBS se torna necessário.

Através da análise do ciclo da gama glutamiltranspeptidase, observa-se que a Cisteína (CIS) contribui para síntese e também faz parte da composição da molécula da Glutathione (GSH), a qual produz Oxoprolina e finalmente sintetiza GLU<sup>18</sup>. Embora o presente trabalho não tenha avaliado os níveis de CIS, nem mesmo GSH nos pacientes, pode-se esperar encontrar uma diminuição nos níveis plasmáticos de CIS, por conta da deficiência de CBS com conseqüente déficit na sua síntese. Dessa forma, os níveis plasmáticos de GLU podem estar baixos nos pacientes devido a danos relacionados a sua síntese. Até o presente estudo não foram encontrados dados na literatura que correlacionem alterações nos níveis desses aminoácidos em pacientes portadores de HC.

Em conclusão, considerando os resultados desse estudo, principalmente em relação aos níveis aumentados de HCI e MET encontrados, sugere-se uma possível baixa adesão ao tratamento proposto por parte dos pacientes homocistinúricos estudados. Para confirmação de algumas hipóteses propostas no presente trabalho, estudos posteriores, visando uma avaliação das concentrações sanguíneas dos agentes terapêuticos nos pacientes homocistinúricos, bem como uma investigação na atividade da glutaminase nesta doença, se fazem necessários. Além

disso, o monitoramento das concentrações séricas de B6, B12 e folato permitirão ajustes terapêuticos que culminem na diminuição dos níveis dos aminoácidos danosos acumulados nestes pacientes, melhorando assim o seu prognóstico.

**Conflito de interesse:**

Nada a declarar.

## REFERÊNCIAS

1. Amorim FG, Rezende LCD, Coitinho LB, Freitas JV, Scher JA, Dettogni RS. Bioquímica clínica da aterosclerose provocada por hiperhomocisteinemia. *RevEletr Farm.* 2011; 8(1):36 – 59.
2. Yap S. Classical homocystinuria: vascular risk and its prevention. *J InheritMetabDis.*2003; 26(2-3): 259-65.
3. Vanzin CS. Investigação de estresse oxidativo em pacientes portadores de homocistinúria antes e durante o tratamento [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
4. Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* McGrawHill, New York, 2007–2056.
5. Cunha AA. Avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em modelo experimental de hiperhomocisteinemiasevera[dissertação].Porto Alegre:Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
6. Carson NAJ, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child.*1962; 37(195): 505-13.
7. Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA. The identification of homocystine in the urine. *BiochemBiophys Res Commun.*1962; 9: 493-6.
8. Bydlowski SP, Magnanelli AC, Chamone DAF. Hiper-homocisteinemia e doenças vasculares. *ArqBrasCardiol.* 71( 1 ): 69-76.
9. Picker JD, Levy HL. Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2004.*
10. Sachdev P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. *RevBrasPsiquiatr.*2004; 26(1): 50-56.

11. Neves LB, Macedo DM, Lopes ACHomocisteína. J Bras Patol Med. Lab. 2004; 40( 5): 311-320.
12. Wilcken DEL, Dudman NPB, Tyrrell PA. Homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency: the effects of betaine treatment in pyridoxine-responsive patients. *Metabolism*. 1985; 34: 1115-1121.
13. Magera MJ, Lacey JM, CasTeta B, Rinaldo P. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 1999; 45:1517-1522
14. Joseph MH, Marsden CA. Aminoacids all small peptides. Em: Lim, C. K , editor. HPLC of small molecules. 1ª ed. Oxford, pp 13-28, 1986.
15. Venâncio LS, Burini RC, Yoshida WB. Tratamento dietético da hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. *J Vasc Bras*. 2010;9( 1 ): 28-41.
16. Matté C. Efeito do ácido fólico sobre as alterações nas atividades na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e da butirilcolinesterase e sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo causados pela homocisteína em ratos [ dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
17. Clarke R. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. *BMJ*. 1998; 316 (7135): p.894-8.
- 18 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Bioquímica. 7ª ed. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro; 2014.
- 19 Cruzat VF, Petry ER, Tirapegui J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. *Rev Bras Med Esporte*. 2009;15(5): 392-397.

**Tabela 1.**

Características dos pacientes homocistinúricos.

PACIENTE	IDADE (anos)	SEXO
1	36	M
2	18	F
3	26	F
4	24	M
5	39	M
6	30	F
7	32	F
8	21	M
<b>MÉDIA</b>	<b>28,25</b>	

**Tabela 2.****Níveis de HCl e MET no plasma dos pacientes homocistinúricos.**

Paciente	HCl total ( $\mu\text{mol/L}$ )	MET ( $\mu\text{mol/L}$ )
1	31,03	16,10
2	98,26	275,60
3	98,40	226,20
4	114,78	407,00
5	310,43	358,10
6	315,44	107,30
7	28,90	49,00
8	28,40	28,20
<b>Média <math>\pm</math>SD</b>	<b>128,20 <math>\pm</math> 119,20</b>	<b>183,43 <math>\pm</math> 154,40</b>

Tabela 3.

Perfil plasmático de aminoácidos ( $\mu\text{mol/L}$ ) em pacientes homocistinúricos e controles.

Aminoácido	Paciente (n= 8) (média $\pm$ sd)	Controle (n= 9) (média $\pm$ sd)
ALA	395,20 $\pm$ 92,03	349,0 $\pm$ 91,85
FAL	47,91 $\pm$ 14,25	54,98 $\pm$ 15,32
GLU	27,15 $\pm$ 13,69**	64,42 $\pm$ 29,56
GLI	463,4 $\pm$ 143,80	360,8 $\pm$ 97,45
GLN	576,30 $\pm$ 131,80**	422,70 $\pm$ 105,80
HIS	96,76 $\pm$ 31,39	86,58 $\pm$ 19,74
ILEU	1,58 $\pm$ 0,14	1,65 $\pm$ 0,16
LEU	83,06 $\pm$ 27,32	102,8 $\pm$ 46,87
LIS	2,13 $\pm$ 0,12	2,11 $\pm$ 0,16
MET	183,40 $\pm$ 154,40**	17,89 $\pm$ 6,36
ORN	68,56 $\pm$ 28,31	71,88 $\pm$ 28,54
SER	88,06 $\pm$ 24,11	97,16 $\pm$ 18,59
TIR	53,58 $\pm$ 14,46	47,02 $\pm$ 9,86
TRP	57,18 $\pm$ 17,13	46,94 $\pm$ 19,10
VAL	157,8 $\pm$ 50,87	190,0 $\pm$ 60,69

\*\*  $p < 0.05$ . Estatisticamente diferente do grupo controle (teste  $t$  de Student não pareado)

## Legendas

**Fig. 1.** Esquema da via metabólica da homocisteína.

**Fig. 2.** Dosagem plasmática de HCl nos pacientes (n= 8) e no grupo controle (n= 10). Os dados representam média $\pm$  desvio padrão. \*\*  $p < 0.05$ . (Teste  $t$  de Student não pareado) comparado com o grupo controle.

**Fig. 3.** Dosagem plasmática de MET nos pacientes (n= 8) e no grupo controle (n= 9). Os dados representam média $\pm$  desvio padrão. \*\*  $p < 0.05$ . (Teste  $t$  de Student não pareado) comparado com o grupo controle.

**Fig. 4.** Dosagem plasmática de GLU nos pacientes (n= 8) e no grupo controle (n= 9). Os dados representam média $\pm$  desvio padrão. \*\*  $p < 0.05$ . (Teste  $t$  de Student não pareado) comparado com o grupo controle.

**Fig. 5.** Dosagem plasmática de GLN nos pacientes (n= 8) e no grupo controle (n= 9). Os dados representam média $\pm$  desvio padrão. \*\*  $p < 0.05$ . (Teste  $t$  de Student não pareado) comparado com o grupo controle.

Figura 2

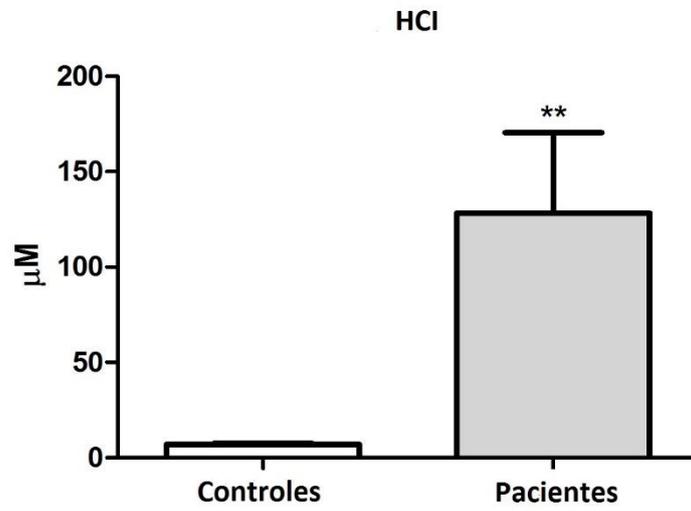


Figura 3

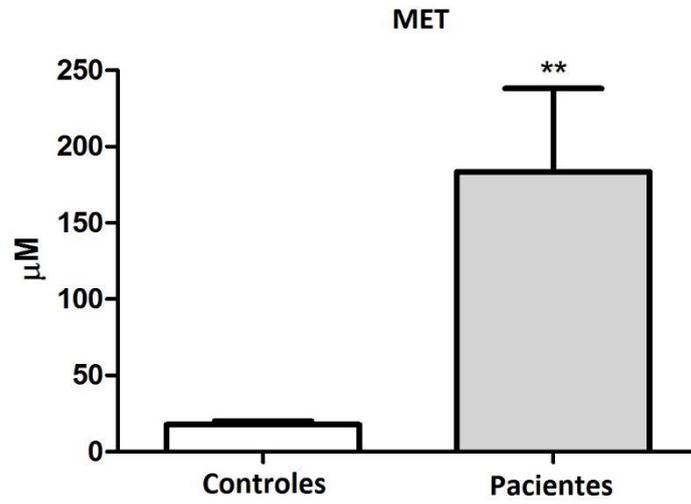


Figura 4

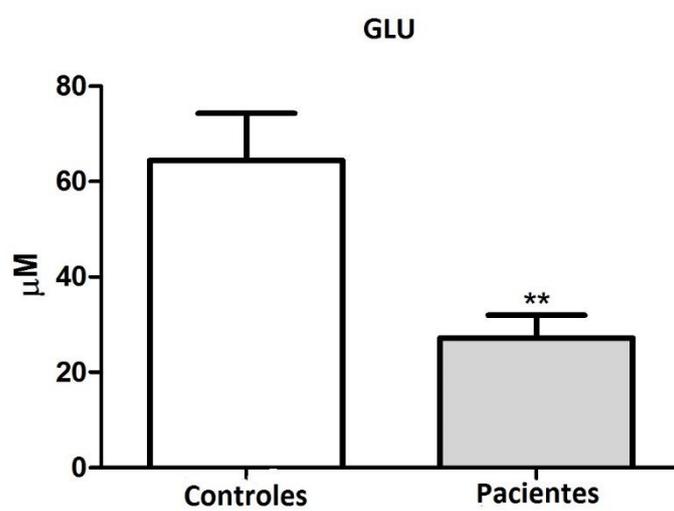
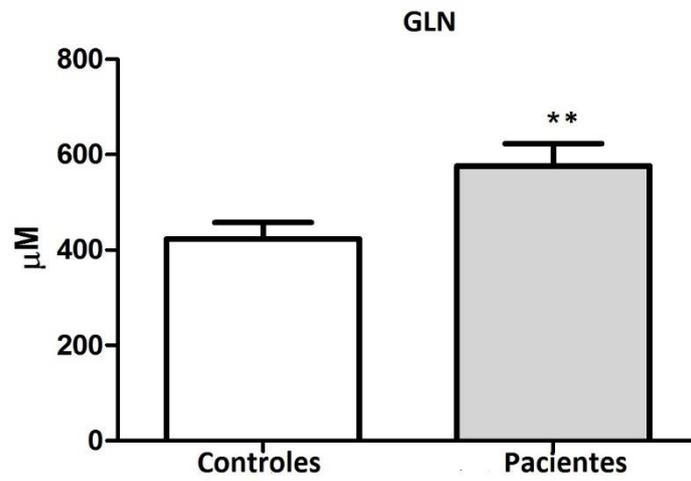


Figura 5



## Anexo I

### Instructions for authors Clin Biomed Res 2015

**SCOPE AND POLICY** Clinical and Biomedical Research (CBR), formerly “Revista HCPA”, is a scientific publication from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). It is a free access scientific periodic that aims to publish papers from all relevant areas in the Health Sciences, including clinic and basic research. The selection criteria for publication include: originality, relevance of the theme, methodological quality, and adequacy to the journals’ editorial norms. CBR supports the policies for the registration of clinical trials of the World Health Organization (WHO) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [<http://www.icmje.org/>]. Therefore, CBR will only accept clinical research articles that have received an identification number from the Brazilian Clinical Trials Registry (Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC) [<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>] or other official database dedicated to the registry of clinical trials. All published articles are reviewed by peers in a double-blind fashion. Once the article is accepted for publication, its copyrights are automatically transferred to the journal. The content of manuscripts submitted for publication to CBR implies that it has not been published previously and that it has not been submitted to another journal. To be published elsewhere, even in part, articles published in CBR require written approval of the editors. The concepts and declarations contained in the papers are the authors’ full responsibility. The articles may be written in Portuguese, English, or Spanish. The submissions in English are strongly encouraged by the editors. The manuscript should fit into one of the different categories of articles published by the journal, as follows:

### FORM AND PREPARATION OF ARTICLES

#### **The following categories of contributions will be considered for publication**

**Original Articles** Articles with unpublished research results, including full-length studies that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. Its formal structure should present the following topics:

Introduction, Methods, Results and Discussion. The conclusions should be in the last paragraph of the Discussion, not requiring a specific section. Clinical implications and limitations of the study should be mentioned. For original articles, a structured abstract should be presented (Introduction, Methods, Results, and Conclusions) in Portuguese and English, in cases where the article is not written entirely in English. The Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 250 words. Articles submitted in this category should not exceed 3,000 words. Tables should be included together in the same manuscript file (after references) and figures should be submitted as an additional document in individual files.

### **CONFLICTS OF INTEREST**

Conflicts of interest arise when the author has financial or personal relationships that could inappropriately influence their professional judgment. These relationships may create favorable or unfavorable tendencies towards a paper and impair the objectivity of the analysis. Authors must disclose possible conflicts of interest. This extends to editorials and review articles, and should be done at the time of submission of the manuscript. It is at the editor's discretion to decide whether this information should be published or not and whether to use it for editorial decisions. A common form of conflict of interest is the funding of research by third parties who may be companies, government agencies, or others. This obligation to the funding entity may lead the researcher to obtain tendentious results, inappropriately influencing (bias) their work. Authors should describe the interference of the funding entity at any stage of the research, as well as the form of funding, and the type of relationship established between the sponsor and the author. The authors may choose to inform the peer reviewers' names for which their article should not be sent, justifying themselves.

### **PRIVACY AND CONFIDENTIALITY**

Information and pictures of patients that allow their identification should only be published with formal written authorization of the patient, and only when necessary for the purpose of the study. For formal authorization, the patient must know the content of the article and be aware that this article may be made available on the Internet. If in doubt about the possibility of identifying a patient, such as in the case of photos with stripes over the eyes, a formal authorization should be obtained. In the case of distortion of data to prevent identification,

authors and editors should ensure that such distortions do not compromise the results of the study.

## **EXPERIENCES WITH HUMANS AND ANIMALS**

All content related to research with humans and animals must have previous approval by the Research Ethics Committee or the Animal Ethics Committee, respectively. The works should be in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki (current or updated), the CNS Resolution n. 196/96 and its complementary regulations, as well as the Law n. 11.794/2008 for studies in animals. It is important to indicate the number of the project's registration in the respective Committee or Ethics Committee, as well as in the National Committee for Research Ethics, if applicable

## **PREPARATION OF THE ARTICLE**

The registration on the system and subsequent access or login are mandatory to submit and verify the status of submissions.

**Identification:** must include: a) Title of the article, which should be clear and concise. Do not use abbreviations. There should be a version of the reduced title to appear in the header as well as a title in the English language; b) authors' full names; c) institution and the sector or unit of the institution to which each author is affiliated (personal titles and positions held should not be mentioned); d) name of the institution where the study was performed; e) indication of the corresponding author, accompanied by the electronic address; and f) if it has been presented at a scientific meeting, the name of the event, the place, and the date of completion should be indicated.

## **ALL NAMES OF ALL AUTHORS INCLUDED IN THE MANUSCRIPT SHOULD BE REGISTERED IN THE SYSTEM**

**Abstract and Keywords:** The articles should have an abstract in Portuguese and English. Check the structure and the number of words described for each specific type of article (see above). The structured abstracts, required only for original articles, should present the name of the subdivisions that make up the formal structure of the article at the beginning of each paragraph (Introduction, Methods, Results and Conclusions). The keywords - expressions that represent the subject of the paper - should be in number from 3 to 10, provided by the author,

based on the DeCS (Health Sciences Descriptors) published by Bireme, which is a translation from the MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine, available

in the following electronic address: <http://decs.bvs.br>. The keywords should be presented in Portuguese and English.

**Manuscript:** it must conform to the structure required for each category of article. Text citations and references cited in the legends of tables and figures should be numbered consecutively in the order they appear in the text, with Arabic numerals. References should be cited in the text as in the example: Reference 1 .

**Tables:** they should be numbered consecutively, with Arabic numerals, in the order they were cited in the text, and headed by a suitable title. They should be cited in the text, but duplicated information should be avoided. The tables, with titles and footnotes, should be self-explanatory. The abbreviations should be specified as footnotes without numerical indication. The remaining footnotes should be numbered in Arabic numerals and written in superscript

**Figures and charts:** Illustrations (photographs, charts, drawings, etc.) should be sent in separate articles, in JPG format (at a high resolution – at least, 300 dpi). They should be numbered consecutively with Arabic numerals, in the order they are cited in the text and should be clear enough for reproduction and in the same language as the text. Photocopies will not be accepted. If there are figures extracted from other previously published studies, the authors should provide a written permission for their reproduction. This authorization shall accompany the manuscripts submitted for publication. The figures must have a title and subtitle (if necessary), which should both precede the figure itself.

**Abbreviations:** abbreviations must be explained at first mention. On the rest of the article, it is not necessary to repeat the full name. Name of medications: the generic name should be used. In case of citing appliances/equipment: all appliances/equipment cited should include model, manufacturer's name, state, and country of manufacture.

**Acknowledgements:** should include the collaboration of people, groups, or institutions that have contributed to the study, but whose contributions do not justify their inclusion as authors; this item should also include the acknowledgements for financial support, technical assistance, etc. This item should come before the references.

**Conflicts of interest:** If there is any conflict of interest (see above), it should be declared. In case there is not, place in this section: “The authors declare no conflicts of interest” or “None to declare.”

**References:** should be numbered consecutively, in the order in which they are mentioned in the text, and identified with Arabic numerals. The presentation must be based on a format called “Vancouver Style”, as the examples below, and the titles of journals should be abbreviated according to the style presented by the List of Journal Indexed in Index Medicus, from the National Library of Medicine, available at: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. The authors should ensure that the cited references in the text appear in the reference list with exact dates and authors’ names correctly spelt. The accuracy of references is the authors’ responsibility. Personal communications, unpublished or unfinished articles could be cited when absolutely necessary, but should not be included in the reference list and only cited in the text. The submission of the unpublished works mentioned in the manuscript may be requested at the discretion of the editor.

