

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

**HOMOCISTINÚRIA E METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA: TRATAMENTO
COM CREATINA E FENILCETONÚRIA COMO MODELOS**

Giovana Regina Weber Hoss

Porto Alegre
Maio de 2019

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

**HOMOCISTINÚRIA E METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA: TRATAMENTO
COM CREATINA E FENILCETONÚRIA COMO MODELOS**

Giovana Regina Weber Hoss

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

Orientadora: Profa Dra Ida Vanessa Doederlein Schwartz
Orientador no exterior: Prof. Dr. Henk J. Blom
Coorientadora: Dra. Fernanda Sperb Ludwig

Porto Alegre
Maio de 2019

Este trabalho foi desenvolvido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Serviço de Genética Médica e Laboratório BRAIN/Centro de Pesquisa Experimental) e na Universidade de Freiburg/Alemanha (Laboratory for Clinical Biochemistry and Metabolism, University Medical Center Freiburg).

Esta tese é resultado três projetos aprovados pela Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com base nos pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa e Serviço de Gestão em Pesquisa do HCPA. O projeto foi financiado com recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projetos 13-0525, 15-0536, 16-0140) e do PPGBM-UFRGS (tradução de artigos). Além disso, a aluna recebeu bolsa de doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). E bolsa de doutorado sanduíche da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES.

AGRADECIMENTOS

É muito bom ter a quem agradecer ao final deste trabalho, que não reflete apenas anos de estudo e pesquisa, mas sim uma formação e jornada ao aprimoramento acadêmico.

Primeiramente, agradeço a Deus que é Senhor, Luz e Direção em cada dia. Agradeço pela calma, força, tranquilidade e confiança de que tudo está correndo de acordo com o planejado. Agradeço pelas oportunidades que encontrei e experiências que tive e que hoje formam a profissional que sou.

Agradeço a meus pais Tarcisio e Cléris Weber, pelo apoio incondicional aos meus sonhos e anseios, além de orgulho que sempre demonstraram, e auxílio em cada pequena necessidade que tive.

Agradeço a minha orientadora Dra. Ida Schwartz, mentora que transmitiu muito de seu conhecimento teórico e prático. Ela que cuidou de detalhes, esperou por resultados e explicações, argumentos para fortalecer nossas teorias. Trabalhar com a Ida também abriu muitas portas para mim, tive várias ótimas oportunidades, sempre fui incentivada e assim acumulei diversas experiências em diferentes áreas. Da mesma forma, agradeço à minha co-orientador Dra. Fernanda Sperb-Ludwig por sua instrução, direcionamento, participação no trabalho prático e teórico.

Agradeço a meu orientador internacional Henk Blom, grande mentor, grande pesquisador, referência no estudo da homocisteína e homocistinúrias. Ele foi muito presente durante todo meu doutorado, participou ativamente em todos os projetos e artigos, e além disso, também sempre se mostrou interessado em meu bem estar, realização e satisfação no trabalho a ser feito. Obrigada por seu cuidado e encorajamento.

Agradeço aos meus professores, colegas no pós, no laboratório, amigos e companheiros no dia a dia. Em especial às colegas, Soraia Poloni, Taciane Borsatto, Suélen Basgallup, Karina Kolonetti e Franciéli Cabral, pela companhia diária, suporte nos experimentos, discussões e amizade construída.

Também ao meu querido marido, Cristiano, que sempre me ouviu e tentou ajudar na medida do possível, me aconselhando e incentivando em tudo que precisei. Muito obrigada Cris, é muito bom ter e certeza de que sempre posso contar contigo pra me apoiar e consolar.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela estrutura fornecida no Centro de Pesquisa Experimental, bem como a todos os seus funcionários pela competência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo constante aprendizado, toda estrutura disponível e auxílio dispensados nesta jornada.

Agradeço às instituições alemãs, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf e Universitätsklinikum Freiburg, que me receberam, permitiram o desenvolvimento de meus projetos, com a convivência e aprendizado com ótimos pesquisadores.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo aporte financeiro para que esse estudo fosse concluído.

LISTA DE ABREVIATURAS

AdoCbl: Adenosilcobalamina	HMG-CoA redutase: 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
AdoHcy: S-adenosil-homocisteína	IL: Interleucina
AdoMet: S-adenosilmetionina	LAT1: Aminoácido neutros do tipo L
AGAT: L-arginina:glicina amidinotransferase	LCR: Líquido ceforraquidiano
B12: Vitamina B12 (cobalamina)	LNAAs: Grandes aminoácidos neutros
B2: Riboflavina	MAT: Metionina adenosiltransferase
B6: Piridoxina	MCM: Metilmalonil-CoA mutase
B9: Ácido fólico	MeCbl: Metilcobalamina
BH4: tetra-hidrobiopterina	Met: Metionina
BHMT: betaína-homocisteína metiltransferase	MMA: Ácido metilmalônico
CAT: Catalase	MMACHC: Proteína da acidemia metilmalônica com homocistinúria tipo C
Cbl: Cobalamina	MTHFR: 5,10-metileno-THF redutase
cb1C: Acidemia metilmalônica com homocistinúria tipo C	MTR: Metionina sintase
cDNA: DNA complementar	MUT: Gene da Metilmalonil-CoA mutase
Cre: Creatina	O ₂ ·: Oxigênio molecular
CreaT: Transportador da creatina	OHCbl: Hidroxicobalamina
CβS: Cistationina beta-sintase	PAH: Fenilalanina hidroxilase
CγL: Cistationina gama-liase	Phe: Fenilalanina
DCFH: Ensaio oxidativo 2'7'Diclorofluorescente	PKU: Fenilcetonúria
DNA: Ácido desoxirribonucleico	RN: Recém-nascido
EIM: Erro inato do metabolismo	RNA: Ácido ribonucleico
GAA: Guanidinoacetato	SAHH: S-adenosil-L-homocisteína hidrolase
GAMT: Guanidilacetato metiltransferase	SH: Conteúdo total de sulfidrilas
gnomAD: Genome Aggregation Database	SHMT: serina-hidroximetiltransferase
GPx: Glutathione peroxidase	SNC: Sistema Nervoso Central
GSH: Glutathione	SOD: Enzima superóxido dismutase
H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio	TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre	tHcy: Homocisteína total
HCU: Homocistinúria clássica	THF: Tetra-hidrofolato
Hcy: Homocisteína	

SUMÁRIO

1. RESUMO	3
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUÇÃO	7
3.1 HOMOCISTEÍNA	7
3.1.1 Metabolismo da Homocisteína	8
3.1.2 Patogenicidade da Homocisteína	10
3.2 ÁCIDO METILMALÔNICO (MMA)	11
3.3 VITAMINA B12 e FOLATO	11
3.4 CREATINA	12
3.5 HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA (HCU)	14
3.5.1 Sintomas e Apresentação Clínica	15
3.5.2 Tratamento dos Pacientes com Homocistinúria Clássica	16
3.5.3 Incidência de Homocistinúria Clássica	17
3.6 DEFICIÊNCIA DE CblC	18
3.6.1 Sintomas e Apresentação Clínica	19
3.6.2 Tratamento dos Pacientes com deficiência de cblC	20
3.7 DEFICIÊNCIA DE METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)	20
3.7.1 Sintomas e Apresentação Clínica	21
3.7.2 Tratamento dos Pacientes com deficiência de MTHFR	22
3.8 FENILCETONÚRIA	23
3.8.1 Sintomas, Apresentação Clínica e Mecanismos Fisiopatológicos	24
4. JUSTIFICATIVA	26
5. OBJETIVOS	27
5. 1 OBJETIVOS GERAIS:	27
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
6. CAPÍTULOS	28
6.1 CAPÍTULO 1: “Three main causes of homocystinuria: CBS, cblC and MTHFR deficiency. What do they have in common?”	28
6.2 CAPÍTULO 2: “Diagnosis and Management of Classical Homocystinuria in Brazil: A Summary of 72 Late-Diagnosed Patients”	29

6.3 CAPÍTULO 3: “Classical homocystinuria: a common inborn error of metabolism?”	36
6.4 CAPÍTULO 4: “Creatine as a treatment for homocystinuria”	37
6.5 CAPÍTULO 5: “Homocysteine and vitamin B12 in PKU patients”	38
7. DISCUSSÃO	39
8. CONCLUSÕES	43
9. PERSPECTIVAS	46
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
11. APÊNDICES	54
Apêndice 1 - Artigo publicado no Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2018: “CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: A study based on the analysis of 35 Brazilian Classical Homocystinuria patients”	54
Apêndice 2 - Artigo publicado no Molecular Genetics and Metabolism Reports, 2018: “Cytokines levels in late-diagnosed Classical Homocystinuria patients”	65
ANEXOS – Cartas de Aprovação de Projetos pelo CEP	68

1. RESUMO

Introdução: Homocistinúria é um grupo de erros inatos do metabolismo (EIM) que resultam em aumento marcante dos níveis de homocisteína (Hcy). As causas mais comuns são homocistinúria clássica (HCU), com incidência estimada em ao menos 0.29 a 1 a cada 100,000 indivíduos, e as deficiências de cblC e MTHFR. Já o termo hiperhomocisteinemia refere-se ao aumento de Hcy total (tHcy) que pode ser de origem genética, ambiental, ou multifatorial. Uma importante porção da Hcy é formada em consequência da síntese endógena de creatina (Cre), que requer a incorporação de um grupo metil doado no processo de metabolismo de metionina (Met). Além disso, a Cre é descrita com potencial antioxidante. Pacientes com fenilcetonúria (PKU) tem seu tratamento baseado em restrição dietética de fenilalanina (Phe) e uso de fórmula metabólica. Com base na dieta pobre em proteínas esses pacientes estão em risco de desenvolver deficiência de Met e vitamina B12, aumentando consequentemente níveis de Hcy e ácido metilmalônico (MMA). **Objetivos:** 1) Caracterizar aspectos epidemiológicos, clínicos e bioquímicos de homocistinúrias; 2) Avaliar o papel da Cre como novo tratamento das homocistinúrias; 3) Avaliar o metabolismo da Hcy em PKU, de forma a propor novos mecanismos fisiopatológicos para a doença. **Métodos:** Etapa 1: revisão de literatura acerca das formas mais comuns de homocistinúria, comparando suas apresentações clínicas e bioquímicas. Etapa 2: análise de dados clínicos de 72 pacientes brasileiros (60 famílias) com HCU provenientes das cinco regiões do país. Etapa 3: estimativa da incidência mundial de HCU com base no número de heterozigotos, aplicando regras de equilíbrio de Hardy-Weinberg, para as 25 mutações mais comuns no gene *CBS*, presentes em bancos de dados genômicos. Etapa 4: análise de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em cultivo celular de células comerciais imortalizadas, controle (n=3) e células com defeito de remetilação (n=6) tratadas com Cre. Etapa 5: análise dos níveis de Phe, Hcy, MMA, vitamina B12, Met, tirosina, leucina, isoleucina e valina em soro de 25 pacientes com PKU. **Resultados:** Etapa 1: a manifestação bioquímica comum à HCU e às deficiências de cblC e MTHFR é o acúmulo de tHcy. Os outros aminoácidos sulfurados apresentam perfis diversos e até inversos. Alguns achados clínicos comuns dentre as homocistinúrias, são atraso no desenvolvimento e convulsões, bem como eventos tromboembólicos. No entanto, as complicações do sistema nervoso central (SNC) diferem em uma ampla variedade de apresentações e severidades e são aparentemente menos

pronunciadas na HCU. Etapa 2: nos pacientes brasileiros com HCU, manifestações oculares foram as mais precoces e prevalentes, bem como a principal suspeita diagnóstica. Observou-se maior prevalência de pacientes não responsivos à piridoxina, e uma pequena porção dos pacientes não responsivos manteve os níveis de Hcy indicados ($<100\mu\text{mol/L}$). Os tratamentos mais comuns foram respectivamente: piridoxina, ácido fólico, betaína, vitamina B12 e dieta restrita em Met associada ao uso de fórmula metabólica. Etapa 3: conforme a frequência de heterozigotos para *CBS* no banco de dados gnomAD, a incidência mundial de HCU foi calculada em aproximadamente 0,38:100.000 indivíduos. Etapa 4: observamos que o conteúdo intracelular de Cre aumentou nos grupos tratados, e no grupo de células saudáveis após o tratamento houve uma redução de CAT, SOD, SH e DCFH, mas não houve diferença estatística, provavelmente devido ao pequeno número amostral. Etapa 5: o tratamento de pacientes PKU com fórmula metabólica reduz os níveis de tHcy. Nenhum dos pacientes com PKU apresentou valores de tHcy acima da faixa normal, indicando que não há deficiências evidentes de folato ou vitamina B12 entre os pacientes em tratamento, provavelmente devido ao enriquecimento das fórmulas metabólicas com estes compostos. Nas pacientes grávidas, os níveis de Phe e Hcy foram menores durante a gestação indicando melhor aderência ao tratamento. **Conclusões:** Há pouca sobreposição nas apresentações bioquímicas e clínicas das três formas mais comuns de homocistinúria, o que nos faz questionar se a própria Hcy é o principal metabólito patogênico. Apresentamos o panorama clínico mais abrangente da HCU já realizado no Brasil. Observa-se que a maioria dos pacientes apresenta fenótipo grave, o que sugere subdiagnóstico das formas de HCU atenuadas/responsivas à piridoxina. O grande número de indivíduos analisados e a cobertura populacional do banco de dados utilizado nos dão grande precisão na estimativa de incidência da HCU, que é um distúrbio tratável. Nossos resultados apoiam a implementação da triagem neonatal na Europa ($\sim 0,72:100.000$) e na América Latina ($\sim 0,45:100.000$). A Cre tem o potencial de reduzir marcadores de estresse oxidativo. Em pacientes com PKU o acompanhamento clínico e adesão ao tratamento dietético são muito importantes. O acompanhamento dos pacientes deve abordar a adequação da ingestão de proteínas, além de monitorar os níveis de Phe e os aminoácidos plasmáticos, Hcy e MMA, que devem ser avaliados para detectar a deficiência de vitamina B12, especialmente antes da concepção, para minimizar os riscos para o feto.

2. ABSTRACT

Introduction: Homocystinuria is a group of inborn errors of metabolism (EIM) that result in marked increase in homocysteine (Hcy) levels. The most common causes are classical homocystinuria (HCU), with an estimated incidence of to be between 0.29 and 1:100,000 individuals, and deficiencies of *cb1C* and MTHFR. The term hyperhomocysteinemia refers to the increase in total Hcy (tHcy) levels that may be due to genetic, environmental, or multifactorial. An important portion of Hcy is formed as a consequence of endogenous creatine (Cre) synthesis, which requires methyl groups donated in the methionine (Met) metabolism process. In addition, Cre is described with antioxidant potential. Patients with phenylketonuria (PKU) have their treatment based on dietary restriction of phenylalanine (Phe) and use of metabolic formula. Because of the low protein diet these patients are at risk of developing Met and vitamin B12 deficiency, thereby increasing levels of Hcy and methylmalonic acid (MMA).

Objectives: 1) To characterize epidemiological, clinical and biochemical aspects of homocystinuria; 2) To evaluate the role of Cre as a new treatment for homocystinuria; 3) To evaluate the metabolism of Hcy in PKU, in order to propose new pathophysiological mechanisms for the disease.

Methods: Phase 1: literature review on the most common forms of homocystinuria, comparing its clinical and biochemical presentations. Phase 2: clinical data analysis of 72 Brazilian patients (60 families) with HCU from the five regions of the country. Phase 3: estimation of the worldwide incidence of HCU based on the number of heterozygotes, applying Hardy-Weinberg equilibrium rules, for the 25 most common mutations in the *CBS* gene, present in genomic databases. Phase 4: analysis of inflammatory and oxidative stress markers in cell culture of immortalized commercial cells, control (n = 3) and cells with remethylation defect (n = 6) treated with Cre. Phase 5: analysis of Phe, tHcy, MMA, vitamin B12, Met, tyrosine, leucine, isoleucine and valine levels in plasma of 25 PKU patients.

Results: Phase 1: the common biochemical manifestation to HCU and deficiencies of *cb1C* and MTHFR is the accumulation of tHcy. The other sulfur amino acids have different and even inverse profiles. Some common clinical findings among homocystinurias are development delay and seizures, as well as thromboembolic events. However, central nervous system complications differ in a wide variety of presentations and severities, and

are apparently less pronounced in HCU. Phase 2: In Brazilian HCU patients, ocular manifestations were the earliest and most prevalent, as well as the main diagnostic suspicion. A higher prevalence of patients non responsive to pyridoxine was observed, and a small portion of nonresponsive patients maintained the indicated tHcy levels (<100umol/L). The most common treatments were: pyridoxine, folic acid, betaine, vitamin B12 and restricted diet in Met associated with the use of metabolic formula. Phase 3: according to the frequency of heterozygotes for *CBS* in the gnomAD database, the worldwide incidence of HCU was estimated at approximately 0.38:100,000 individuals. Phase 4: we observed that the intracellular content of Cre increased in the treated groups, and in the group of healthy cells after the treatment there was a reduction of CAT, SOD, SH and DCFH, but there was no statistical difference, probably due to the small sample. Phase 5: Treatment of PKU patients with metabolic formula reduces tHcy levels. None of the patients with PKU presented tHcy values above the normal range, indicating that there are no evident deficiencies of folate or vitamin B12 among the patients under treatment, probably due to the enrichment of metabolic formulas. In pregnant patients, Phe and tHcy levels were lower during gestation indicating better adherence to the treatment.

Conclusions: There is little overlap in the biochemical and clinical presentations of the three most common forms of homocystinuria, which makes us question whether Hcy itself is the main pathological metabolite. We present the most extensive clinical picture of the HCU already performed in Brazil. It is observed that the majority of the patients present severe phenotype, which suggests underdiagnosis of HCU forms attenuated / responsive to pyridoxine. The large number of individuals analyzed and the population coverage of the database used give us great accuracy in estimating the incidence of HCU, which is a treatable disorder. Our results support the implementation of neonatal screening in Europe (~0.72:100,000) and in Latin America (~0.45:100,000). Cre has the potential to reduce oxidative stress markers. In patients with PKU, clinical follow-up and adherence to dietary treatment are very important. Patient follow-up should address adequacy of protein intake, as well as monitoring Phe levels and plasma amino acids, Hcy and MMA, which should be evaluated for vitamin B12 deficiency, especially prior to conception, to minimize risks to the fetus.

3. INTRODUÇÃO

3.1 HOMOCISTEÍNA

A Hcy é um aminoácido não essencial, contém enxofre, não participa das sínteses de proteínas, é formado exclusivamente a partir da desmetilação da Met, e é considerado tóxico em níveis aumentados. Hcy é um metabólito chave nos processos de a) metilação e ressíntese de S-adenosil-homocisteína (AdoHcy) através da atividade reversa da S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (SAHH; EC:3.3.1.1); b) remetilação para Met por duas vias, dependente de folato e vitamina B12 ou ainda pela via dependente de betaína e c) via da transulfuração para cistationina (Figura 1) (Škovierová *et al.*, 2016).

Hiper-homocisteinemia refere-se ao aumento de tHcy no plasma ou soro que pode ser de origem genética, ambiental, ou multifatorial (Mudd *et al.*, 2000). Em indivíduos adultos saudáveis, os níveis plasmáticos de Hcy mantêm-se abaixo de 15 µmol/L, com variações de acordo com idade e gênero. A hiperhomocisteinemia pode ser classificada como leve (15–30 µmol/L), moderada (31–100 µmol/L) ou grave (>100 µmol/L), embora não haja consenso na literatura sobre os pontos de corte desta classificação (Mudd *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2002; Brustolin *et al.*, 2010).

A hiperhomocisteinemia grave resulta em homocistinúria, um grupo de EIM dos aminoácidos sulfurados, que apresentam aumento marcante dos níveis de Hcy no plasma ou soro, e foi assim denominada devido à eliminação excessiva de homocistina (homocisteína dissulfeto) na urina observada nos pacientes com a doença. Os principais tipos de homocistinúria serão descritos em mais detalhes a seguir. Os principais aminoácidos sulfurados em humanos são a Met, cisteína (Cys), Hcy e taurina. Eles desempenham papel essencial em diversas rotas metabólicas, como a síntese de glutatona, síntese proteica e metilação de DNA, RNA, proteínas e lipídeos (Blom & Smulders, 2011; Castro *et al.*, 2006). O metabolismo dos aminoácidos sulfurados é resumido na Figura 1.

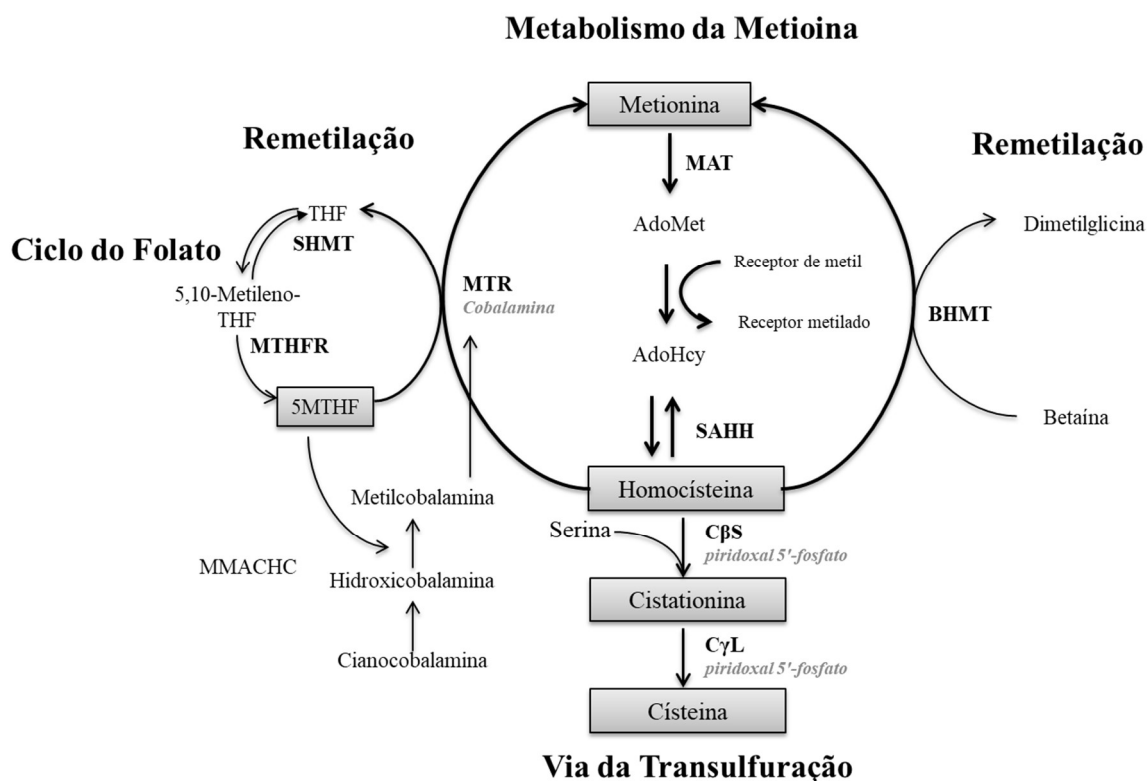


Figura 1. Visão geral do metabolismo dos aminoácidos sulfurados. Homocisteína (Hcy) é formado a partir da desmetilação da metionina por metionina adenosiltransferase (MAT), com intermediários S-adenosilmetionina (AdoMet) e S-adenosilhomocisteína (AdoHcy). Hcy pode ser degradada pela via de transulfuração, em que se transforma em cistationina através da ação da enzima cistationina beta-sintase (CBS) e em seguida cisteína pela ação da enzima cistationina gama-liase (C γ L). Hcy pode voltar a AdoHcy pela ação de S-Adenosil-homocisteína hidrolase (SAHH). Hcy também pode ser remetilada à Met por metionina sintase (MTR), uma enzima dependente de vitamina B12 e folato, ou ainda, pela rota da homocisteína metiltransferase (BHMT) que usa betaina, formada pelo catabolismo da colina, como doador do grupo metil. THF: tetrahydrofolato; MTHFR: 5,10-metileno-THF redutase; SHMT: serina-hidroximetiltransferase; MMACHC: proteína da acidemia metilmalônica com homocistinúria tipo C. Enzimas estão representados em letras maiúsculas e seus cofatores em itálico. **Fonte:** autor.

3.1.1 Metabolismo da Homocisteína

Depois de formada, a Hcy pode seguir duas rotas metabólicas: a transulfuração, onde é degradada; ou a remetilação, onde é reconvertida a Met. Pela via de transulfuração, a Hcy se transforma em cistationina através da ação da enzima cistationina beta sintase (CBS; EC 4.2.1.23), que utiliza como cofator o piridoxal fosfato, forma ativa da vitamina B6. A cistationina é então convertida à Cys, molécula precursora da glutatona e da taurina (Pico & Bermudez, 2006). A Hcy também pode ser remetilada à Met por duas rotas alternativas. A mais importante é catalisada pela metionina sintase (MTR; EC 1.16.1.8), uma enzima dependente de vitamina B12 e folato, ou ainda, pela rota da homocisteína

metiltransferase (BHMT; EC 2.1.1.5) que também pode catalisar a remetilação da Hcy, usando betaína, formada pelo catabolismo da colina, como doador do grupo metil (Fowler, 1997).

De forma detalhada, a Hcy é formada como um produto de reações de transferência de metil no metabolismo da Met. Neste processo, a Met é ativada por ATP em S-adenosilmetionina (AdoMet), que é o doador universal de grupos metil, resultando na formação de AdoHcy. A AdoHcy é convertida em Hcy e adenosina através de SAHH. O equilíbrio da reação favorece a formação da AdoHcy. Como consequência, o aumento da Hcy deve resultar em um acúmulo pronunciado de AdoHcy, que é um potente inibidor de muitas reações da metiltransferase. Como a metilação é essencial para funções celulares em todos os órgãos, a Hcy é formada em todos os tecidos.

Já a eliminação de Hcy via CBS está confinada ao fígado e rins. Assim, em todos os outros tecidos, como o sistema vascular e o cérebro, as únicas formas disponíveis para eliminar a Hcy são a remetilação pela MTR ou a exportação para fora da célula (Hannibal & Blom, 2017).

No processo de remetilação, a Hcy recebe um grupo metil do 5-metiltetrahydrofolato (5MTHF), que é formado a partir de 5,10-metilenotetrahydrofolato pela metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR; EC 1.5.1.20) (Figura 1). Notavelmente, 5MTHF é a forma circulante de folato no sangue e líquido. O fígado e o rim contêm também metiltransferase de betaína-homocisteína (BHMT; EC 2.1.1.5), que é uma via alternativa de remetilação de Hcy (Figura 1).

A vitamina B12, na forma de metilcobalamina (MeCbl), está envolvida como cofator da MTR, que catalisa a remetilação da Hcy em Met no citosol. Já a adenosilcobalamina (AdoCbl) é o cofator da metilmalonil-CoA mutase (MCM; EC:5.4.99.2), que converte metilmalonil-CoA em succinil-CoA na mitocôndria. Assim, a deficiência de vitamina B12 leva ao aumento dos níveis de Hcy e MMA.

Os níveis de AdoMet regulam se a Hcy será degradada via CBS ou remetilada de volta para Met. No fígado, o excesso de Met aumenta os níveis de AdoMet, que ativa CBS e inibe MTHFR, fazendo com que a Hcy seja primária e irreversivelmente convertida em cistationina (Castro *et al.*, 2006; Blom & Smulders, 2011). Se os níveis de Met estiverem baixos, CBS não é ativado e MTHFR não é inibido por AdoMet, fazendo com que a Hcy seja principalmente remetilada (Thomas & Rosenblatt, 2005; Burda *et al.*, 2015).

3.1.2 Patogenicidade da Homocisteína

O significado e o impacto patológico dos altos níveis de Hcy tem sido assunto de intenso debate entre pesquisadores e médicos durante as últimas décadas. Há três ramos principais de discussão quanto à toxicidade da Hcy: a) modificações na estrutura proteica conhecida como homocisteinilação; b) indução de estresse oxidativo; e c) excitotoxicidade. Seja a Hcy causa, mediador, biomarcador ou apenas espectador, a compreensão da homeostase da Hcy continua a ser uma matéria de pesquisa ativa em todo o mundo.

Homocisteinilação é consequência da ligação covalente de Hcy a proteínas, levando à modificação de suas funções, e é considerada uma modificação pós-traducional de proteínas. O grau de homocisteinilação de proteínas é proporcional ao aumento do nível plasmático de Hcy (Perla-Kaján *et al.*, 2007). Vários estudos indicaram uma associação entre níveis elevados de Hcy e a formação de espécies reativas de oxigênio, formadas em reações redox envolvendo o grupo tiol da Hcy, especialmente o ânion superóxido (O_2^-) e H_2O_2 (Huang *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2002; Weiss, 2005).

O efeito tóxico da Hcy no tecido cerebral pode ser influenciado pela ausência das duas principais rotas para a eliminação de Hcy: remetilação de Hcy para Met mediada por betaina e transulfuração de Hcy para Cys (Škovierová *et al.*, 2016). A relação entre Hcy e problemas neurológicos, como depressão, mal de Parkinson e Alzheimer são amplamente descritas (Soni *et al.*, 2019). Suplementação com vitaminas B2, B6, B9 e B12 diminuem de forma eficaz os níveis plasmáticos de Hcy e também reduzem sintomas depressivos (Gariballa, 2011).

A Hcy também foi descrita como patogênica à atividade de osteoclastos. Estudo *in vitro* de células da medula óssea com meios enriquecidos com Hcy mostrou que ela regula positivamente a formação de osteoclastos e suprime a apoptose nessas células devido à maior produção de espécies reativas de oxigênio. Assim, em pacientes com hiperhomocisteinemia, a atividade elevada de osteoclastos levará a um aumento na reabsorção óssea seguido por maior risco de fraturas e diminuição da densidade mineral óssea (Schalinske & Smazal, 2012). Hiperhomocisteinemia também já foi descrita em uma variedade de doenças gastrintestinais, incluindo constipação, doença de Crohn, doença inflamatória intestinal e câncer colorretal (Givvimani *et al.*, 2012; Casella *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018).

De modo mais marcante, a Hcy tem sido reconhecida como um fator de risco independente para doenças cardiovasculares; primeiramente descrita por McCully (1969) em dois pacientes com HCU e outro pacientes com um defeito no metabolismo da vitamina B12. Em seguida, inúmeros estudos mostraram que hiperhomocisteinemia associa-se a risco aumentado para várias formas de doença vascular (Lühmann *et al.*, 2007; McCully, 2015). No entanto uma recente metanálise mostrou que a redução dos níveis de tHcy por folato e vitamina B12 não reduziu o risco de eventos vasculares (Martí-Carvajal *et al.*, 2017).

3.2 ÁCIDO METILMALÔNICO

As acidurias metilmalônicas são um grupo de EIM que são bioquimicamente caracterizados por aumento de MMA. Elas são causadas por uma deficiência hereditária de MCM ou por defeitos na síntese da desoxiadenosilcobalamina, o cofator da MCM. O MMA é uma molécula de quatro carbonos relacionada ao catabolismo da valina, isoleucina e ácido propiônico. As concentrações de MMA geralmente aumentam nos estágios iniciais da deficiência de vitamina B12 antes mesmo de reduções mensuráveis na vitamina B12 sérica (Klee, 2000). O MMA já foi descrito como metabólito neurotóxico, *in vitro* e *in vivo* em estudos com animais, uma vez que compromete o metabolismo energético cerebral (Brusque *et al.*, 2002; Pettenuzzo *et al.*, 2006; Mirandola *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que MMA provoca danos ao DNA em leucócitos de sangue periférico humano (Ribas *et al.*, 2010). Andrade *et al.* (2014) relatam que o MMA aumentou os danos ao DNA de córtex cerebral e rim de ratos.

3.3 VITAMINA B12 e FOLATO

O termo vitamina B12 refere-se a uma família de substâncias compostas por anéis tetrapirrólicos em torno de um átomo central de cobalto com cadeias laterais de nucleotídeos ligadas ao cobalto. O nome geral do grupo é cobalamina, com cada um dos diferentes ligantes axiais superiores ligados ao cobalto conferindo um nome diferente: metil (metilcobalamina/MeCbl), hidroxila (hidroxicobalamina/OhCbl), adenosil

(adenosilcobalamina/AdoCbl), água (aquacobalamina) e cianeto (cianocobalamina). Quimicamente, o termo vitamina B12 refere-se à hidroxocobalamina ou cianocobalamina, embora em uso geral este termo se aplique a todas as formas de cobalamina. A forma predominante no soro é a MeCbl e a forma predominante no citosol é a AdoCbl (Klee, 2000).

A vitamina B12 é hidrossolúvel, sintetizada exclusivamente por microrganismos, encontrada em praticamente todos os tecidos animais e estocada primariamente no fígado na forma de AdoCbl (Paniz *et al.*, 2005). A fonte natural de vitamina B12 na dieta humana restringe-se a alimentos de origem animal, especialmente leite, carne e ovos (Herrmann *et al.*, 2003; Vugteveen *et al.*, 2011).

A vitamina B12 e o folato (B9) são duas vitaminas que têm papéis interdependentes na síntese de ácidos nucleicos. Na ausência de vitamina B12, o folato é “preso” e não pode ser reciclado de volta para o pool de folato. Eventualmente, isso leva a uma redução na síntese de timidina monofosfato que leva à anemia megaloblástica. O consumo inadequado de folato durante o início da gravidez pode causar defeitos do tubo neural no feto em desenvolvimento. Além disso, a deficiência de folato e vitamina B12 e o consequente aumento de Hcy são considerados um fator de risco significativo para doenças cardiovasculares.

Tanto a deficiência de vitamina B12 como a de folato estão associadas a distúrbios neuropsiquiátricos. Os mecanismos destas perturbações não são conhecidos. Essas deficiências podem causar depressão, demência, neuropatia desmielinizante, autismo e esquizofrenia (Bottiglieri, 1996; Coşar *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Outros estudos sugeriram que pacientes idosos com alterações cognitivas e depressivas podem se beneficiar da suplementação com folato (Abalan, 1999). Os índices hematológicos para muitos desses pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos estão dentro dos valores de referência, portanto, não se deve descartar a possibilidade de deficiência de vitamina B12 com base apenas em testes hematológicos normais (Brett & Roberts, 1994).

3.4 CREATINA

A Cre desempenha um papel energético fundamental na célula, particularmente nos tecidos muscular e cerebral (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). A deficiência de Cre está

associada a manifestações neurológicas que podem estar relacionadas a possíveis efeitos antioxidantes (Lawler *et al.*, 2002; Schulze, 2003; Kolling *et al.*, 2014) ou a um possível papel da Cre como um neuromodulador (Almeida *et al.*, 2006).

A síntese de Cre requer três aminoácidos glicina, arginina e Met - bem como a ação de duas enzimas. A primeira enzima, a L-arginina:glicina amidinotransferase (AGAT; EC:2.1.4.1) catalisa a formação de guanidinoacetato e ornitina a partir de arginina e glicina, ativa principalmente no rim e pâncreas. A segunda enzima, ativa no fígado, guanidilacetato metiltransferase (GAMT; EC:2.1.1.2) utiliza AdoMet para metilação de guanidinoacetato, produzindo Cre e AdoHcy (Figura 2) (Brosnan *et al.*, 2007). Cre tanto de origem alimentar ou sintetizada endogenamente, é retirada do plasma através de um transportador específico (CreaT). O CreaT é encontrado em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético, rim, coração, cérebro, cerebelo e fígado (Snow & Murphy, 2001).

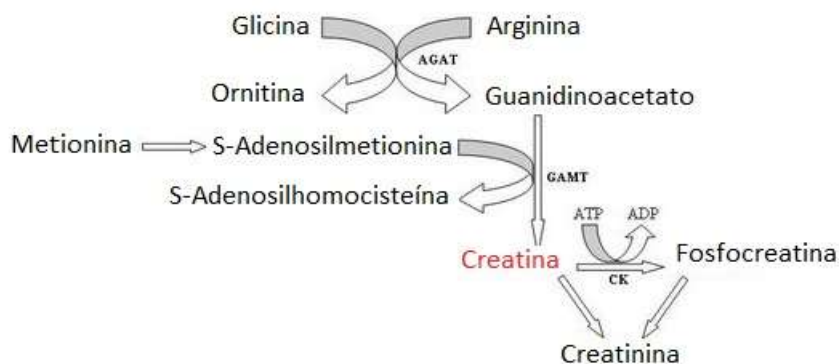


Figura 2. Síntese de creatina. AGAT: L-arginina:glicina amidinotransferase; GAMT: guanidilacetato metiltransferase.

A regulação da síntese de Cre ocorre principalmente através de mudanças nos níveis de guanidinoacetato (GAA). A atividade renal de AGAT é regulada positivamente pelo hormônio do crescimento e negativamente pela Cre da dieta (Guthmiller *et al.*, 1994). A síntese de Cre também pode ser regulada pela disponibilidade de substrato, particularmente arginina (Edison *et al.*, 2007).

Teoricamente, a Met pode ser poupada e o acúmulo de Hcy evitado se menos grupos metil forem doados por reações que utilizam AdoMet como substrato para metiltransferase (Finkelstein, 2006). Em particular, a síntese de Cre e fosfatidilcolina consomem muitos grupos metil. Aproximadamente 40% dos grupos metil fornecidos por AdoMet são

consumidos na síntese de Cre, portanto ela é responsável por 40% da produção corporal de Hcy (Stead *et al.*, 2006). Como consequência, a administração oral de Cre poderia levar a uma formação reduzida de Hcy e assim reduzir seu acúmulo em homocistinúrias (Schiff & Blom, 2012).

Vários estudos tem investigado o potencial da Cre em diminuir níveis de Hcy. Petr *et al.* (2013), por exemplo, mostraram diminuição de 50% nos níveis séricos de Hcy em paciente homozigoto para mutação c.677C>T no gene da *metileno tetrahidrofolato redutase* (*MTHFR*) após 30 dias com suplemento diário de 5g de Cre monohidratada. Já Moraes *et al.* (2014) não observaram alteração sérica de Hcy ao avaliar 40 homens jovens e saudáveis submetidos, durante sete dias, à suplementação de Cre monohidratada na dose de 20g/dia. Já em cultivo celular de cardiomiócitos utilizando suplementação de 5mM de Cre, observou-se uma diminuição de citotoxicidade, apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio, pelas células quando expostas a tratamento quimioterápico (Santacruz *et al.*, 2015).

3.5 HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA

A HCU (OMIM # 236200) é um EIM associado à deficiência da CBS, responsável pela degradação da Hcy, que resulta em aumento nos níveis plasmáticos de Hcy, Met e AdoHcy, bem como diminuição dos níveis de Cys, conforme rota do metabolismo da Hcy e Met (Figura 1) (Mudd. *et al.*, 2001; Wilcken, 2006).

O primeiro relato de HCU foi descrito na Irlanda, em 1963, por Nina Carson e Desmond Neill. Enquanto realizavam testes em urina de indivíduos com retardo mental a fim de detectar distúrbios metabólicos, eles verificaram que duas irmãs excretavam grande quantidade de homocistina. Além do retardo mental, as irmãs apresentavam alterações clínicas como luxação de cristalino, deformidades esqueléticas e alterações na pele e cabelos. Os pesquisadores denominaram este novo distúrbio metabólico de homocistinúria (Carson *et al.*, 1963). Dois anos depois, descobriu-se que a doença era causada por um defeito na enzima CBS (Mudd *et al.*, 1964).

O diagnóstico da HCU é dado através da combinação de sinais clínicos e das avaliações bioquímica e molecular. O teste de triagem para HCU mensura a concentração de homocistina na urina do paciente (Pico & Bermudez, 2006). Como esse teste não é

conclusivo, também são mensuradas as concentrações plasmáticas de Met, Hcy e seus metabólitos. A hipermetioninemia é um achado importante, já que outras homocistinúrias, como deficiência de MTHFR e defeitos de cobalamina, apresentam concentrações normais ou baixas de Met (Picker & Levy, 2014). A confirmação do diagnóstico de HCU é dada, através do padrão-ouro, com ensaios diretos da atividade da enzima CBS. Ela pode ser avaliada em cultura de fibroblastos, biópsias hepáticas ou linfócitos estimulados por fitohemaglutinina (Yap, 2005). A atividade enzimática em indivíduos com HCU varia de 0 a 1,8 U/mg de proteína, enquanto que em controles fica na faixa de 3,7-60 U/mg de proteína. A enzima CBS utiliza como cofator o piridoxal fosfato, forma ativa da vitamina B6, assim após a confirmação do diagnóstico de HCU é importante determinar a responsividade do paciente ao tratamento com piridoxina (Walter *et al.*, 1998; Mudd. *et al.*, 2001; Picker & Levy, 2014).

3.5.1 Sintomas e Apresentação Clínica

Bioquimicamente, a HCU é caracterizada pela elevação do nível plasmático de Hcy, acompanhado pela elevação de seu precursor, o aminoácido essencial Met, bem como a redução dos produtos da via de transulfuração da Hcy, cistationina e Cys. Também ocorre a eliminação de homocistina, metabólito formado por duas moléculas de Hcy ligadas por uma ponte dissulfeto na urina, característica que resultou na denominação da doença. As concentrações plasmáticas normais de Hcy variam de 5-15 $\mu\text{mol/L}$, podendo atingir 500 $\mu\text{mol/L}$ em pacientes homocistinúricos não tratados (Mudd. *et al.*, 2001).

A HCU é uma doença multissistêmica, de início lento e caráter progressivo e expressividade variável dentre os pacientes. Os sinais clínicos da doença envolvem principalmente quatro sistemas: ocular, vascular, nervoso central e ósseo (Mudd *et al.*, 1985). Dentre os sinais e sintomas mais frequentes estão: luxação do cristalino (*ectopia lentis*), retardo mental, distúrbios psiquiátricos, crises convulsivas, aterosclerose, tromboembolismo, miopia, osteoporose, tromboembolismo pulmonar e uma variedade de deformações ósseas (Mudd. *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2005; Picker & Levy, 2014).

3.5.2 Tratamento dos Pacientes com Homocistinúria Clássica

O principal objetivo do tratamento da HCU é a redução nos níveis de Hcy. Quando uma boa adesão terapêutica e um bom controle metabólico são mantidos ao longo da vida, e o tratamento iniciado no período neonatal, é possível prevenir todas as complicações da HCU (Mudd *et al.*, 1985; Yap & Naughten, 1998). No Brasil, ainda não há pesquisa de HCU pelo teste do pezinho oferecido pelo SUS, portanto o diagnóstico geralmente é tardio e a adesão ao tratamento, principalmente à dieta que é muito restrita, é de difícil aceitação pelos pacientes.

Atualmente, o plano de ação terapêutica está focado em manter os níveis de tHcy <50 µmol/L para pacientes responsivos ao tratamento com piridoxina e <100 µmol/L para pacientes não responsivos, e a Cys em níveis normais e assim, garantir o crescimento e desenvolvimento adequados (Morris *et al.*, 2017). Para isto, três estratégias podem ser utilizadas: a estimulação da atividade residual da CBS (com uso de piridoxina), a redução da sobrecarga de Met, inclusive com dieta restrita, e o aumento da remetilação de Hcy à Met (com uso de betaína). Entretanto, ainda assim, vários pacientes não alcançam os níveis almejados dos metabólitos.

A piridoxina atua aumentando a atividade residual da enzima, o que ocasiona redução da concentração de Hcy e Met e aumento de Cys (Mudd *et al.*, 1970). Aproximadamente 50% dos pacientes com HCU apresentam algum nível de responsividade à piridoxina (Mudd *et al.*, 2001). Em geral, pacientes não responsivos desenvolvem a forma mais grave da doença, apresentando complicações mais precocemente e maior mortalidade (Mudd *et al.*, 1985).

Recomenda-se que o ácido fólico e a vitamina B12 sejam adicionados ao tratamento, a fim de otimizar a conversão de Hcy em Met, porque a resposta à piridoxina é influenciada pela depleção de folato, que pode ocorrer pela própria administração da piridoxina (Pico & Bermudez, 2006). Além disso, acredita-se que os requerimentos de folato sejam maiores nos pacientes com deficiência de CBS devido a um aumento do fluxo pela rota de remetilação.

A betaína fornece um caminho alternativo de remetilação atuando como doador de grupos metil para converter o excesso de Hcy em Met através da enzima BHMT, podendo assim ajudar a prevenir as complicações, principalmente a trombose (Lawson-Yuen & Levy, 2006). A ingestão de 6-9g de betaína ao dia pode reduzir em mais de 70% os níveis de Hcy,

e é acompanhada por um aumento importante da concentração de Met (Walter *et al.*, 1998; Wilcken, 2006). Em alguns casos também se indica uma dieta restrita em Met, através da limitação do aporte de proteínas naturais. No entanto, para atingir as necessidades proteicas diárias utiliza-se um suplemento (fórmula metabólica) de aminoácidos isento de Met e suplementado com Cys, vitaminas, minerais e elementos-traço (Frangipani *et al.*, 2006).

3.5.3 Incidência de Homocistinúria Clássica

A incidência de HCU varia dramaticamente entre as regiões, de 416:100.000 indivíduos entre uma tribo Tao em uma ilha em Taiwan, para menos de um em um milhão na população Han de Taiwan (Lu *et al.*, 2012). A prevalência mundial é estimada em 0,29 a 1 a cada 100.000 indivíduos (Mudd. *et al.*, 2001; Moorthie *et al.*, 2014). O país com maior incidência de HCU no mundo é o Catar. Provavelmente a alta incidência da doença seja influenciada por um efeito fundador, uma vez que a doença é mais comum em três tribos da população, que também tem uma alta incidência de casamento consanguíneo. Após a implementação da triagem neonatal medindo tHcy e Met, combinada à triagem genética, a incidência estimada de HCU no Catar chega a 55:100.000 recém-nascidos (RN) (Ganschreier *et al.*, 2010).

Baseado em dados de triagem neonatal (ainda disponível em poucos países), com mensuração de Met, Naughten *et al.* (1998) relataram uma incidência de HCU na Alemanha de 0,77:100.000 RN, na Inglaterra 0,8:100.000 RN, nos EUA 0,34:100.000 RN e mais frequentes como 1,5:100.000 RN na Irlanda e 1,8:100.000 RN na Itália. A triagem bioquímica neonatal de mais de 800 mil indivíduos na Austrália por volta da década de 1960, revelou 14 casos de HCU, resultando em uma incidência de 1,7:100.000 RN (Wilcken & Turner, 1978). Uma incidência de HCU muito menor é observada na Ásia. No Japão, por exemplo, uma incidência extremamente baixa de 0,1:100.000 RN foi observada apesar de um programa de triagem bioquímica eficaz (Naughten *et al.*, 1998). Em Taiwan, 5 milhões de indivíduos foram incluídos na triagem bioquímica neonatal para HCU e apenas 3 foram diagnosticados (Lu *et al.*, 2012). No Brasil o número de pacientes em acompanhamento estimado pela Associação Brasileira de Homocistinúria é de 80-100 pacientes (relato verbal).

Outra estratégia para calcular a incidência de HCU é determinar a frequência de heterozigotos para mutações em *CBS* e assim, através da equação de equilíbrio Hardy-Weinberg, estimar o número de pacientes com HCU. Os primeiros a utilizar essa abordagem foram Gaustadnes *et al.* (1999), esse grupo selecionou 500 RNs dinamarqueses consecutivos e avaliaram a mutação c.833 T>C, estimando uma incidência de HCU de ao menos 4,8:100.000. Na Noruega, Refsum *et al.* (2004) determinaram a prevalência de seis mutações do gene *CBS* em 1.133 amostras selecionadas aleatoriamente dentre ~12.000 amostras de screening neonatal e calcularam uma prevalência de HCU de ~15,6:100.000 RN.

3.6 DEFICIÊNCIA DE CblC

A acidemia metilmalônica com homocistinúria é uma doença hereditária do metabolismo da vitamina B12 (cobalamina/cbl) caracterizada por anemia megaloblástica, letargia, atraso de crescimento, atraso no desenvolvimento, déficit intelectual e convulsões. Existem três defeitos da cobalamina - cblC, cblD e cblF - que são responsáveis pela acidemia metilmalônica associada à homocistinúria. A acidúria metilmalônica e homocistinúria tipo cblC (OMIM # 277400) é o EIM mais comum do metabolismo da cobalamina (Lerner-Ellis *et al.*, 2009). CblC é causada por mutações no gene *MMACHC* (GenBank ID: 25974). O diagnóstico e tratamento precoces são importantes, os primeiros sintomas podem surgir entre a primeira infância e/ou a idade adulta. Os doentes que se tornam sintomáticos depois da infância apresentam melhor prognóstico, mas podem apresentar ataxia, demência ou psicose (Carrillo-Carrasco *et al.*, 2012).

Em 1969, o primeiro caso de deficiência de cblC foi relatado por Mudd *et al.* em um lactente com homocistinúria, acidúria metilmalônica, cistinemia e hipometioninemia. A criança morreu com 7,5 semanas de idade. A análise *in vitro* identificou um defeito nas duas reações em que os derivados da vitamina B12 funcionam como coenzimas: 1) AdoCbl na formação de Met a partir Hcy por MTR, e 2) MeCbl para isomerização de metilmalonil-CoA para succinil-CoA por MCM. Como a vitamina B12 estava presente em concentrações normais no fígado, os autores concluíram que o gene responsável por esse defeito envolvia a conversão de vitamina B12 em suas coenzimas ativas (Mudd *et al.*, 1969).

3.6.1 Sintomas e Apresentação Clínica

Pacientes com deficiência de cblC geralmente sofrem de um amplo espectro de complicações clínicas, incluindo aspectos de desenvolvimento, metabólicos, hematológicos, neurológicos, oftalmológicos e dermatológicos (Rosenblatt *et al.*, 1997). Embora seja considerada uma doença da infância, os pacientes podem apresentar sintomas a qualquer momento desde o período neonatal até a idade adulta, e podem até mesmo ser afetados intra-útero. A doença é classificada como: forma de início precoce e de início tardio (Thauvin-Robinet *et al.*, 2008).

Pacientes com doença de início precoce, definida pelo início dos sintomas antes do primeiro ano de vida, geralmente apresentam comprometimento sistêmico grave. Os sintomas incluem dificuldades de alimentação, hipotonia, déficit de crescimento, convulsões, microcefalia e atraso no desenvolvimento. Acidose foi observada em alguns pacientes. Nistagmo, retinopatia pigmentar e diminuição da acuidade visual são comuns. Os achados hematológicos incluíram trombocitopenia, anemia macrocítica megaloblástica e/ou neutrófilos polimorfonucleares hipersegmentados e leucopenia, provavelmente todos relacionados à deficiência celular de folato. Também ocorrem complicações renais, que não são induzidas pelo aumento de MMA, mas sim por microangiopatia (que pode ocorrer em qualquer órgão), resultando em síndrome hemolítico-urêmica (Rosenblatt *et al.*, 1997).

O início tardio da doença parece ser mais raro do que a forma de início precoce. Além de anormalidades hematológicas leves, o curso clínico é caracterizado por distúrbios comportamentais, psiquiátricos, rápida deterioração mental com confusão e desorientação, demência, delirium e psicose (Martinelli *et al.*, 2011). Embora sua ocorrência seja rara, a deficiência de cblC de início tardio deve ser considerada em diagnóstico diferencial de pacientes que apresentam sintomas neurológicos que não são consistentes com doenças neurológicas comuns, especialmente quando a cognição, o trato piramidal e nervos periféricos estão envolvidos (Wang *et al.*, 2012). É importante ressaltar que facilmente os pacientes podem ser diagnosticados erroneamente ou até mesmo permanecerem sem diagnóstico.

3.6.2 Tratamento dos Pacientes com deficiência de cblC

O tratamento para deficiência de cblC consiste numa abordagem combinada que utiliza uma alta dose de vitamina B12 intramuscular, de preferência sob a forma de hidroxocobalamina (OHCbl). Em uma diretriz para o diagnóstico e tratamento de distúrbios da remetilação, Huemer *et al.* (2017) recomendam uma dose inicial de 1 mg de OHCbl por dia, administrada por via parenteral. A betaína oral é usada para melhorar a remetilação de Hcy pela via alternativa, e o ácido fólico oral melhora o “aprisionamento” de folato (Martinelli *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2014). Restrição proteica para reduzir MMA é contraindicada porque resulta em uma grande redução de Met (Manoli *et al.*, 2016). Bom controle metabólico e correção de problemas hematológicos podem por vezes ser alcançados com tratamento, mas a maioria dos doentes continua a ter sinais de atraso motor e da linguagem, déficit intelectual e achados oftalmológicos anormais (Rosenblatt *et al.*, 1997).

3.7 DEFICIÊNCIA DE METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)

A homocistinúria devido à deficiência de MTHFR (OMIM # 236250) resulta no metabolismo intracelular anormal do ácido fólico e impede a redução de 5-10 metilenotetrahidrofolato a 5-metilenotetrahidrofolato, doador do grupo metil para a remetilação da Hcy em Met. Como resultado, a doença leva à deficiência de metiletrahidrofolato e, conseqüentemente, a homocistinúria com hipometioninemia (Huemer *et al.*, 2015).

O gene que codifica a enzima MTHFR, também chamado *MTHFR*, localiza-se no braço longo do cromossomo 1 (GenBank ID: 4524), e é composto por 11 éxons, de tamanhos que variam de 102 a 432 pb. A sequência codifica uma proteína de aproximadamente 70 kDa (Goyette *et al.*, 1998). Em humanos, quatro transcritos diferentes podem ser produzidos, diferindo entre si no primeiro éxon (Homburger *et al.*, 2000). Mais de 130 mutações causadoras de homocistinúria já foram identificadas no gene, sendo a maioria delas privada e de troca de sentido. Exceções são as mutações c.1141C>T, frequente em populações Amish, e c.1542G>A, detectada em mais de 20 alelos não relacionados (Burda *et al.*, 2015).

Muito mais frequentes que as mutações causadoras de homocistinúria por deficiência de MTHFR são os polimorfismos que resultam em hiperhomocisteinemia leve a moderada. O polimorfismo c.677C>T é o mais frequente, resultando na redução da atividade enzimática em 70% em homozigotos. Está associado com baixos níveis de folato no soro, plasma e eritrócitos e hiperhomocisteinemia (Jacques *et al.*, 1996; Brustolin *et al.*, 2010). No Brasil, o estudo de Arruda *et al.* (1998) encontrou alta prevalência de homozigose para este polimorfismo entre descendentes de caucasianos (10%) e baixa entre negros (1,45%) e indígenas (1,2%).

3.7.1 Sintomas e Apresentação Clínica

Deficiência de MTHFR é uma doença grave que afeta principalmente o SNC, provavelmente devido à reduzida disponibilidade de metilenotetrahydrofolato e Met, causando redução da metilação cerebral, como sugerido pela diminuição dos níveis de AdoMet no líquido (Surtees *et al.*, 1991; Strauss *et al.*, 2007). Assim, está associada a um lento desenvolvimento do cérebro, à incapacidade neurológica grave e à morte prematura (Rosenblatt & Erbe, 2001).

Foi descrita pela primeira vez em 1972 por Mudd *et al.* em três pacientes: 1) menino de 16 anos com fraqueza muscular, convulsões e sinais encefálicos anormais, 2) menina de 17 anos com degradação mental e esquizofrenia e 3) irmã de 15 anos de idade do paciente 2. Esses três pacientes apresentavam homocistinúria, mas níveis normais de Met, atividade normal de CBS em fibroblastos e baixa atividade de MTHFR (Mudd *et al.*, 1972). A deficiência grave de MTHFR é caracterizada bioquimicamente por hiper-homocisteinemia, homocistinúria, cistationina aumentada e Met baixa ou normal, em contraste com a deficiência de CBS, que apresenta Met elevada. Em cultura de fibroblastos, a atividade enzimática residual é inferior a 20% do valor médio de controle (Rosenblatt & Erbe, 2001; Watkins & Rosenblatt, 2012; Huemer *et al.*, 2017).

Uma apresentação clássica sugestiva de deficiência de MTHFR é um recém-nascido com hipotonia generalizada, dificuldade de alimentação, déficit de crescimento, letargia, apneia e, eventualmente, microcefalia. Os pacientes também podem apresentar sintomas durante a infância e até na idade adulta, na forma tardia da doença. Os pacientes com a forma

tardia têm um quadro clínico variável, incluindo marcos tardios de desenvolvimento, comprometimento cognitivo e/ou anormalidades de marcha, bem como degradação mental e encefalopatia progressiva, compatíveis com mielopatia ou ataxia, problemas comportamentais de espasticidade, um espectro inespecífico de sintomas psiquiátricos e ocasionalmente trombose. A anemia megaloblástica e/ou macrocítica é tipicamente ausente (Thomas & Rosenblatt, 2005; Saudubray *et al.*, 2012; Diekman *et al.*, 2014).

3.7.2 Tratamento dos Pacientes com deficiência de MTHFR

Pacientes não tratados com a forma precoce da doença apresentam retardo progressivo do desenvolvimento e retardo mental, alguns pacientes também podem apresentar epilepsia e doença neurológica (marcha anormal, espasticidade). No entanto, um grande número de pacientes não tratados vem a óbito (Thomas & Rosenblatt, 2005; Diekman *et al.*, 2014).

O tratamento envolve a administração (doses sugestivas) de betaína (100 a 250 mg/kg/dia em crianças e 5 a 20 g/dia em adultos) para fornecer uma via alternativa para a remetilação de Hcy. Além disso, OHcbl (1-2 g/dia) e ácido fólico (400 mg/d) são indicados. Piridoxina, como cofator para CBS, pode ser administrada para maximizar a via de transulfuração e a riboflavina como cofator da enzima MTHFR (Huemer *et al.*, 2017).

Met pode ser suplementada se seu nível permanecer baixo, apesar do tratamento. Em geral, o tratamento melhora o curso da doença em casos de início precoce (Rosenblatt & Erbe, 2001; Sibani *et al.*, 2003; Thomas & Rosenblatt, 2005). Em uma revisão sistemática, incluindo 36 pacientes, o impacto do tratamento com betaína em pacientes com a forma precoce da doença mostrou que todos os cinco pacientes tratados precocemente sobreviveram com desenvolvimento psicomotor normal. Enquanto nove dos dez pacientes não tratados e dois dos 21 tratados tardiamente morreram. O desenvolvimento psicomotor foi prejudicado em todas as crianças com atraso no início do tratamento, apesar da estabilização clínica e bioquímica observada desde a introdução do tratamento com betaína (Diekman *et al.*, 2014).

3.8 FENILCETONÚRIA

PKU e as hiperfenilalaninemias são doenças hereditárias do metabolismo do aminoácido Phe, caracterizadas pela deficiência de fenilalanina hidroxilase (PAH; EC:1.14.16.1). PKU é uma doença metabólica autossômica recessiva em que o aminoácido essencial Phe não pode ser convertido em tirosina, levando ao acúmulo de metabólitos tóxicos (Dobbelaere *et al.*, 2003). PKU é uma hiperfenilalaninemia caracterizada por mutações no gene *PAH* (GenBank ID: 5053) que sintetiza enzima hepática com mesmo nome. PAH é responsável por converter a Phe no aminoácido tirosina na presença do cofator tetra-hidrobiopterina (BH4), oxigênio molecular e ferro (figura 3) (Blau *et al.*, 2010; Flydal & Martinez, 2013).

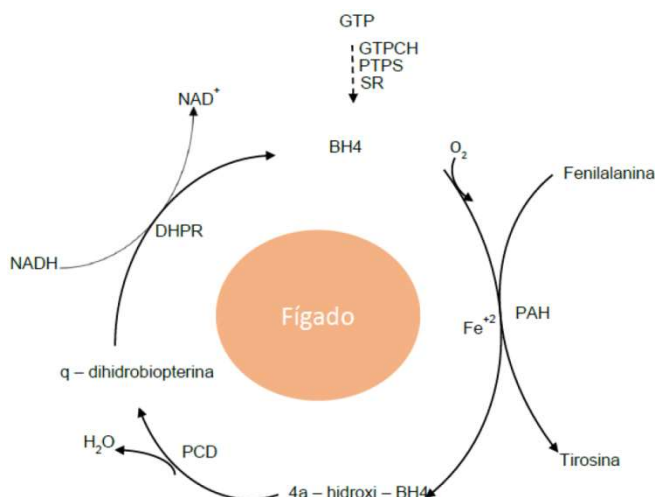


Figura 3. Sistema de hidroxilação de fenilalanina. Durante a hidroxilação de Phe pela PAH, na presença de oxigênio molecular (O₂) e ferro (Fe⁺²), tetra-hidrobiopterina (BH4) é oxidada para 4a-hidroxi-BH4 intermediário, que é subsequentemente regenerado em BH4 via quinonoide (q) de dihidrobiopterina pela enzima carbinolamina-4adehidratase (PCD) e pela dihidropteridina redutase dependente de NADH (DHPR). BH4 é sintetizada a partir da guanosina trifosfatada (GTP) por três enzimas adicionais: ciclohidrolase I GTP (GTPCH), 6-piruvil-tetrahydropterina sintase (PTPS), e sepiapterina redutase (SR). **Fonte:** Adaptado e traduzido de Blau *et al.*, 2010.

O tratamento para PKU é principalmente dietético e consiste em: (1) fornecer uma quantidade rigorosa e restrita de Phe, tipicamente inferior a 10g/dia (2) uso de um substituto proteico livre de Phe, constituído de todos os outros aminoácidos, vitaminas e traços minerais (fórmula metabólica) e (3) alimentos naturalmente pobres em Phe que são fornecidos livremente (MacDonald *et al.*, 2011). O início precoce, logo após o nascimento,

de uma dieta restrita em Phe evita complicações neuropsicológicas (Blau *et al.*, 2010). Cada indivíduo apresenta uma “tolerância” distinta de Phe, por isso, a quantidade de Phe que será consumida na dieta deve se adequar às necessidades do paciente (Casey, 2013). A dieta restrita em Phe mostrou ter efeito positivo para o desenvolvimento mental, mas um efeito negativo no crescimento físico (Dobbelaere *et al.*, 2003; Blau *et al.*, 2010).

Durante a infância, o aleitamento materno é recomendado para fornecer proteínas naturais de acordo com a tolerância de Phe individual, e/ou se necessário uma fórmula metabólica infantil livre de Phe é usada. Com a introdução de alimentos sólidos, as crianças com PKU têm de evitar alimentos ricos em proteínas (carne, peixe, ovos, produtos lácteos, pão padrão, nozes e sementes) (Verduci *et al.*, 2016).

Uma vez que a Phe faz parte da proteína natural, pacientes com PKU consomem quantidades limitadas de proteína natural para manter as concentrações de Phe no sangue dentro da faixa alvo para a idade. A demanda pelos demais aminoácidos é preenchida com uma fórmula substituta de proteína isenta de Phe. Esta fórmula é enriquecida com micronutrientes, normalmente fornecidos com a ingestão de proteínas e com tirosina extra sendo um aminoácido especialmente deficiente na PKU (Vugteveen *et al.*, 2011).

3.8.1 Sintomas, Apresentação Clínica e Mecanismos Fisiopatológicos

A PKU foi descrita pela primeira vez em 1934 por Følling quando ele detectou fenilcetonas na urina de indivíduos afetados e em 1953, Bickel et al. relataram pela primeira vez a eficácia de uma dieta pobre em Phe em uma criança com PKU. Os fenótipos podem variar de um aumento médio de Phe no soro para um fenótipo clássico grave com hiperfenilalaninemia pronunciada que, se não tratada, resulta em incapacidade mental profunda e irreversível. PKU não tratada está associada com comprometimento intelectual progressivo, acompanhado por uma série de sintomas adicionais como erupção eczematosa, autismo, convulsões, e déficits motores. Problemas de desenvolvimento, comportamento aberrante e sintomas psiquiátricos frequentemente se tornam aparentes à medida que a criança cresce (Blau *et al.*, 2010; van Wegberg *et al.*, 2017). Estudos de imagem descrevem lesões na substância branca do cérebro associadas à redução da formação de mielina, embora

ainda não haja ligação causal entre a desmielinização e dano neuropsicológico (Pearsen *et al.*, 1990).

As mulheres com PKU com controle inadequado de Phe durante a gestação estão sob alto risco de ter um filho com retardo mental, defeitos cardíacos congênitos, retardo de crescimento intra-uterino e outros defeitos uma vez que a Phe é teratogênica. Portanto, os níveis de Phe inferiores a 360 $\mu\text{mol/L}$ antes da concepção e durante toda a gravidez são indicados (Rouse & Azen, 2004; Prick *et al.*, 2012).

Os níveis elevados de Phe no sangue são neurotóxicos principalmente devido ao seu efeito inibitório sobre o transportador de aminoácido neutros do tipo L (LAT1), que é a o principal meio de entrada de Phe no SNC. LAT1 também é a única rota de entrada para outros grandes aminoácidos neutros (LNAAs) ao SNC – triptofano, histidina, tirosina, isoleucina, leucina, valina, Met e lisina (Pratt, 1980). Destacando que a tirosina é um precursor de dopamina e norepinefrina; e triptofano é um precursor da serotonina. Altas doses de Phe no sangue podem inibir LAT1, e assim inibir o transporte de outros grandes aminoácidos neutros para o SNC, aumentando o potencial para disfunção de neurotransmissores pela menor disponibilidade de substrato para a sua síntese (Hoeksma *et al.*, 2009).

Outros mecanismos possíveis para indução de danos ao cérebro pela hiperfenilalaninemia incluem atividade reduzida de piruvato quinase (Hörster *et al.*, 2006), neurotransmissão glutamatérgica perturbada (Martynyuk *et al.*, 2005), atividade reduzida da HMG-CoA redutase (ou 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase) (Shefer *et al.*, 2000), e a função da monoamina oxidase B, que degrada feniletilamina (metabólito tóxico da Phe) (Ghozlan *et al.*, 2004).

4. JUSTIFICATIVA

No Brasil, há poucos estudos descrevendo o perfil genético e clínico de pacientes com HCU. O serviço de Genética Médica do HCPA é referência no diagnóstico e tratamento de pacientes com EIMs, incluindo homocistinúrias, e a amostra analisada no presente estudo inclui pacientes das diversas regiões do Brasil. A incidência de HCU é estimada em ao menos 0,29 a 1 a cada 100,000 indivíduos pessoas em todo o mundo. Parece ser mais comum em alguns países, como Alemanha (0,7:100.000), Irlanda (1,5:100.000) e Qatar (55:100.000). Por outro lado a descrição de pacientes é muito rara na Ásia, com 0,1:100.000 RN no Japão. As formas mais brandas da doença, que geralmente inclui pacientes responsivos ao tratamento com piridoxina, podem não ser percebidos e diagnosticados, e a incidência de HCU pode ser muito mais comum do que a descrita. Assim, a estimativa de incidência a partir de heterozigotos descritos em grandes bancos de dados genômicos pode ser de grande valia, pelo alto número de indivíduos analisados e sua diversidade genética.

Pacientes com HCU são tratados com piridoxina e grande parte deles tem que ser tratada por uma dieta restrita em Met, a qual é muito difícil de seguir, em particular depois da infância. Pacientes com defeitos de remetilação são tratados com betaína, no entanto, estratégias alternativas de tratamento são urgentemente necessárias. A síntese endógena de Cre requer uma considerável porção de grupos metil no fígado, e é responsável pela formação de uma importante parcela de Hcy. Além disso, a Cre é descrita com potencial antioxidante, assim poderia ser um adjuvante no tratamento dos pacientes com homocistinúria.

Já os pacientes com PKU tem seu tratamento baseado em restrição dietética de Phe e uso de fórmula metabólica. Com base na dieta pobre em proteínas esses pacientes estão em risco de desenvolver deficiência de Met e vitamina B12, e conseqüentemente aumento nos níveis de Hcy e MMA. Hiperhomocisteinemia e deficiência de vitamina B12 foram relatadas em pacientes com PKU, mas há estudos discordantes. A análise de Hcy, MMA e vitamina B12 em pacientes com PKU no pré-tratamento e pós-tratamento; pacientes em momentos aderentes à dieta hipoproteica, comparados a períodos não aderentes; e mulheres nos estágios pré, pós e durante a gravidez, pode auxiliar no entendimento das apresentações clínicas e tratamento de pacientes com PKU, já que o aumento dos níveis de Hcy pode elevar o risco de eventos tromboembólicos e cardiovasculares.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GERAIS:

- 1) Caracterizar aspectos epidemiológicos, clínicos e bioquímicos da homocistinúria clássica;
- 2) Avaliar o papel da creatina como novo tratamento das homocistinúrias;
- 3) Avaliar o metabolismo da homocisteína na fenilcetonúria, de forma a propor novos mecanismos fisiopatológicos para a doença;

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar e comparar as principais causas de homocistinúria: homocistinúria por deficiência de CBS, cblC e MTHFR;
- Discutir o papel da homocisteína na patogenicidade das homocistinúrias;
- Caracterizar o perfil clínico da homocistinúria clássica no Brasil;
- Estimar a incidência de homocistinúria clássica com base no número de heterozigotos em bancos de dados genômicos;
- Avaliar a ação antioxidante da creatina em cultura celular de fibroblastos com defeito de remetilação da homocisteína e controles;
- Avaliar os níveis de homocisteína, ácido metilmalônico e vitamina B12 em pacientes com fenilcetonúria.

6. CAPÍTULOS


6.1 CAPÍTULO 1: *“Three main causes of homocystinuria: CBS, cblC and MTHFR deficiency. What do they have in common?”*

O capítulo 1 consiste em uma revisão da literatura que descreve e compara as principais causas de homocistinúria, discutindo a patogenicidade da Hcy. Este capítulo será apresentado na forma de artigo, o qual está submetido à publicação na revista Pathology, cujo fator de impacto é 3,068 e o Qualis CAPES da área de genética (Biotecnologia) é A2. O formato obedece às normas de submissão da revista.

6.2 CAPÍTULO 2: *“Diagnosis and Management of Classical Homocystinuria in Brazil: A Summary of 72 Late-Diagnosed Patients”*

O capítulo 2 desta tese consiste na avaliação e caracterização clínica de 72 pacientes das diversas regiões do Brasil com HCU. O capítulo será apresentado na forma do artigo publicado na revista JIEMS em junho de 2018.

Diagnosis and Management of Classical Homocystinuria in Brazil: A Summary of 72 Late-Diagnosed Patients

Journal of Inborn Errors of Metabolism
& Screening
2018, Volume 6: 1–6
© The Author(s) 2018
DOI: 10.1177/2326409818788900
journals.sagepub.com/home/iem


Soraia Poloni, PhD^{1,2}, Giovana W. Hoss, MD^{2,3},
Fernanda Sperb-Ludwig, PhD^{2,3}, Taciane Borsatto, PhD^{2,3},
Maria Juliana R. Doriqui, MD⁴, Emília K.E.A Leão, PhD^{5,6},
Ney Boa-Sorte, PhD^{5,6}, Charles M. Lourenço, PhD^{7,8},
Chong A. Kim, PhD⁹, Carolina F. M. de Souza, PhD¹⁰,
Helio Rocha, MD¹¹, Marcia Ribeiro, PhD¹¹, Carlos E. Steiner, PhD¹²,
Carolina A. Moreno, PhD¹², Pricila Bernardi, MD¹³,
Eugenia Valadares, PhD¹⁴, Osvaldo Artigalas, MD^{15,16},
Gerson Carvalho, MD¹⁷, Hector Y. C. Wanderley, MD¹⁸,
Vânia D'Almeida, PhD¹⁹, Luiz C. Santana, PhD²⁰,
Henk J. Blom, PhD²¹, and Ida V. D. Schwartz, PhD^{1,2,3,10}

Abstract

This study described a broad clinical characterization of classical homocystinuria (HCU) in Brazil. This was a cross-sectional, observational study including clinical and biochemical data from 72 patients (60 families) from Brazil (South, n = 13; Southeast, n =

¹ Post-Graduation Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Laboratory of Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³ Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴ Complexo Hospitalar Materno-Infantil do Maranhão, São Luis, Brazil

⁵ Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos, Salvador, Brazil

⁶ Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Brazil

⁷ Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

⁸ Centro Universitário Estácio de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

⁹ Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

¹⁰ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

¹¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

¹² Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

¹³ Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

¹⁴ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

¹⁵ Hospital da Criança Conceição, GHC, Porto Alegre, Brazil

¹⁶ Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, Brazil

¹⁷ Hospital de Apoio de Brasília, Brasília, Brazil

¹⁸ Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, Brazil

¹⁹ Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

²⁰ Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

²¹ Laboratory for Clinical Biochemistry and Metabolism, University Medical Center, Freiburg, Germany

Received April 16, 2018, and in revised form June 07, 2018. Accepted for publication June 12, 2018.

Corresponding Author:

Giovana W. Hoss, Ms, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, 90040, Brazil.

Email: giovana.weber@gmail.com



This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits any use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

37; Northeast, $n = 8$; North, $n = 1$; and Midwest, $n = 1$). Parental consanguinity was reported in 42% of families. Ocular manifestations were the earliest detected symptom (53% of cases), the main reason for diagnostic suspicion (63% of cases), and the most prevalent manifestation at diagnosis (67% of cases). Pyridoxine responsiveness was observed in 14% of patients. Only 22% of nonresponsive patients on treatment had total homocysteine levels $<100 \mu\text{mol/L}$. Most commonly used treatment strategies were pyridoxine (93% of patients), folic acid (90%), betaine (74%), vitamin B12 (27%), and low-methionine diet + metabolic formula (17%). Most patients diagnosed with HCU in Brazil are late diagnosed, express a severe phenotype, and poor metabolic control. Milder forms of HCU are likely underrepresented due to underdiagnosis.

Keywords

classical homocystinuria, CBS deficiency, homocysteine, pyridoxine responsiveness, diagnosis

Introduction

Classical homocystinuria (HCU; OMIM 236200) is an inborn error of methionine metabolism caused by deficient activity of cystathionine β -synthase (C β S; EC 4.2.1.22). Cystathionine β -synthase deficiency leads to massive accumulation of homocysteine and methionine and low levels of cysteine.^{1,2} Homocystinuria was first described in 1962³; since then, many advances in treatment and early diagnosis, including newborn screening, have improved prognosis dramatically.^{4–6} However, diagnosis and management of HCU is still a major challenge in developing countries, where newborn screening is unavailable and access to health-care services is often poor and unequal.⁷

From a clinical standpoint, the classic signs of HCU are lens dislocation, thromboembolism, mental retardation, psychiatric disorders, osteoporosis, and marfanoid features.⁸ Established treatment strategies include supplementation of pyridoxine (C β S cofactor), folic/foinic acid, betaine, and a methionine-restricted diet supplemented with an essential amino acids admixture free of methionine.⁹ Novel therapies with chaperones and enzyme replacement are currently under development.^{10–12} Usually, patients who respond to pyridoxine supplementation exhibit a milder phenotype and have a better prognosis.⁸

The worldwide prevalence of HCU is estimated to be 1:100 000.¹³ However, several mild and late presentation phenotypes have been described,^{14–16} raising the issue of whether HCU is largely underdiagnosed. Newborn screening for HCU is performed in some countries with high incidence of the disease, such as Ireland and Qatar.^{5,17} Usually, newborn screening is performed by the determination of methionine on filter paper. However, this method has a large percentage of false negatives (up to 50%), since pyridoxine-responsive HCU may not present with hypermethioninemia in the first days of life.^{18,19} In Brazil, the prevalence of HCU is unknown, and the disease is not included in the National Neonatal Screening Program.

Brazil is a very large country with over 200 million inhabitants, and the country is characterized by intense admixture.^{20,21} The country also has one of the world's largest publicly funded health-care systems, the Unified Health System (*Sistema Único de Saúde*), which was established to provide equitable and comprehensive care to all users. However, betaine and the methionine-free amino acid formulation

are not available through Unified Health System, and few centers across the country offer biochemical testing for diagnosis and management of this condition. Furthermore, several factors make diagnosis and management of HCU within the Brazilian health system a major challenge; hence, a substantial number of patients with this treatable condition are believed to remain undiagnosed and thus untreated. Within this context, the present study sought to establish a broad clinical characterization of HCU in Brazil through a survey on diagnosis and management of a representative patient population that is being followed at several centers nationwide.

Materials and Methods

The present study was approved by the local research ethics committee. Collection procedures for the study were conducted only after participants or their caregivers had agreed to take part in the investigation and provided written informed consent.

Patients

The study sample comprised 72 Brazilian patients with a diagnosis of HCU, from 60 different families. Diagnosis was in general made on clinical symptoms followed by clear elevations in homocysteine and methionine. Mutation analyses was performed in 35 of the 72 patients.²² Families from all 5 regions of Brazil were represented: South ($n = 13$), Southeast ($n = 37$), Northeast ($n = 8$), North ($n = 1$), and Midwest ($n = 1$). Patients were recruited through contact with physicians involved in care and/or research activities at medical genetics centers across the country. A structured questionnaire containing queries regarding diagnosis, consanguinity, treatment strategies, metabolic control, and current health condition of patients with HCU was sent to 15 medical centers that had agreed to participate in the study. Clinical data regarding diagnosis were available only for 28 patients.

All 72 patients had delayed diagnoses: 62 patients had been diagnosed after clinical suspicion and biochemical findings consistent with HCU (hyperhomocysteinemia and hypermethioninemia), and the remaining 10 had been diagnosed on family screening. Each of the participating centers used a different protocol for determination of pyridoxine responsiveness. For the purposes of this study, patients were classified as

Table 1. Classical Homocystinuria in Brazil: A Summary of Clinical Findings at Diagnosis.^a

	Total (N = 72)	Pyridoxine Responsive		P
		Yes (n = 10)	No (n = 61)	
Current age, years	19 (5-45)	23 (14-35)	18 (5-45)	.120
Age at first symptom onset, years	5 (0-20)	2 (0.2-15)	5 (0.7-20)	.316
Age at diagnosis, years	10 (1-39)	11 (4-34)	9 (1-39)	.545
Systems affected at diagnosis, %				
Ocular	72	50	75	.100
CNS	60	70	59	.497
Skeletal	60	40	54	.401
Vascular	15	20	14	.625

Abbreviation: CNS, central nervous system.

^aN = 72, data expressed as the median (range) or percentage. In 1 patient, pyridoxine responsiveness could not be determined, data from this patient were used alone in the whole-group analysis.

responsive if they achieved homocysteine levels <50 µmol/L on pyridoxine alone or pyridoxine + folic acid (regardless of the number of weeks since testing). All other patients were classified as nonresponsive to pyridoxine.

Target total homocysteine levels on treatment were set according HCU guidelines,⁹ which were <50 µmol/L for pyridoxine-responsive patients and <100 µmol/L for nonresponsive patients. Treatment adherence was determined by the subjective impressions of the care team at each medical center.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows, version 18.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Asymmetrically distributed variables were expressed as the median (range). The Mann-Whitney *U* test (continuous variables) or χ^2 test (categorical variables) was used to assess between-group differences. Values of $P < .05$ were considered significant.

Results

Of the 72 patients included, 55% were male. Two patients were already deceased at the time of inclusion in the study (presumably due to thromboembolic events). The patients belonged to 60 families; parental consanguinity was reported in 25 (42%) families. Median age at assessment was 19 years. The youngest patient was aged 5, and the oldest was 45. Regarding pyridoxine responsiveness, 61 (85%) patients were classified as nonresponsive and 10 (13.8%) as responsive. In 1 patient, pyridoxine responsiveness was not reported/determined.

Journey to Diagnosis

The very first symptom noticed by families and/or physicians was visual impairment (mainly due to *ectopia lentis*) in 53% of

the cases, followed by developmental delay (22% of cases), seizures (11% of cases), and isolated thromboembolic episodes (9.5% of cases). Table 1 reports clinical features at diagnosis for the sample as a whole and stratified by pyridoxine responsiveness.

The median time elapsed between symptom onset and diagnosis was 5 years (maximum, 34 years). One-third of the patients had 3 or more systems already affected at the time of diagnosis. The main clinical findings leading to investigation of HCU are represented in Figure 1. Eye disease, the most prevalent symptom at diagnosis (67% of cases), accounted for 63% of referrals for HCU investigation.

Management

Current clinical and biochemical data were available for 44 patients, of whom 7 were responsive and 37 were nonresponsive to pyridoxine. The median length of follow-up was 6 years (range, 0-27 years). Table 2 describes clinical manifestations and biochemical control in this group of patients. Ocular manifestations were more prevalent among pyridoxine-nonresponsive patients (71% vs 97%, $P = .01$). *Ectopia lentis* was the most common complication in our sample, affecting 91% of patients at the time of study inclusion.

Pyridoxine-responsive patients had significantly lower total homocysteine levels at study inclusion ($P < .001$). Only 22% of nonresponsive patients achieved target total homocysteine levels (<100 µmol/L) on treatment, while all responsive patients ($n = 7$) had total homocysteine <50 µmol/L. Treatment adherence was reported as appropriate in 44% of patients.

Regarding treatment strategies, 93% of patients were on pyridoxine supplementation, 90% on folic acid, 74% on betaine, 27% on vitamin B12, and only 17% on a low-methionine diet + metabolic formula.

Discussion

The present report provides the largest clinical profile of patients with HCU ever studied in Brazil to date. Clinical data of 72 patients (60 unrelated) from 15 medical genetics centers across Brazil were analyzed. Most families lived in the South and Southeast regions of the country. These regions are home to 57% of the country's population (<http://www.ibge.gov.br/>) and, compared to other regions of Brazil, have higher rates of access to health-care services and procedures. The fact that patients from other regions, particularly the North ($n = 1$) and Midwest ($n = 1$), were underrepresented suggests high rates of HCU underdiagnosis and/or limited access to care in these regions.⁷

A high proportion of pyridoxine-nonresponsive patients with HCU was found in our study (85%). Nonresponsive patients usually present a more severe phenotype, have more complications, and younger ages.^{6,8,23} In our study, this proportion exceeded rates described worldwide of approximately 50%.⁸ In countries where the proportion of nonresponsive patients is disproportionately high, such as Qatar and Ireland,

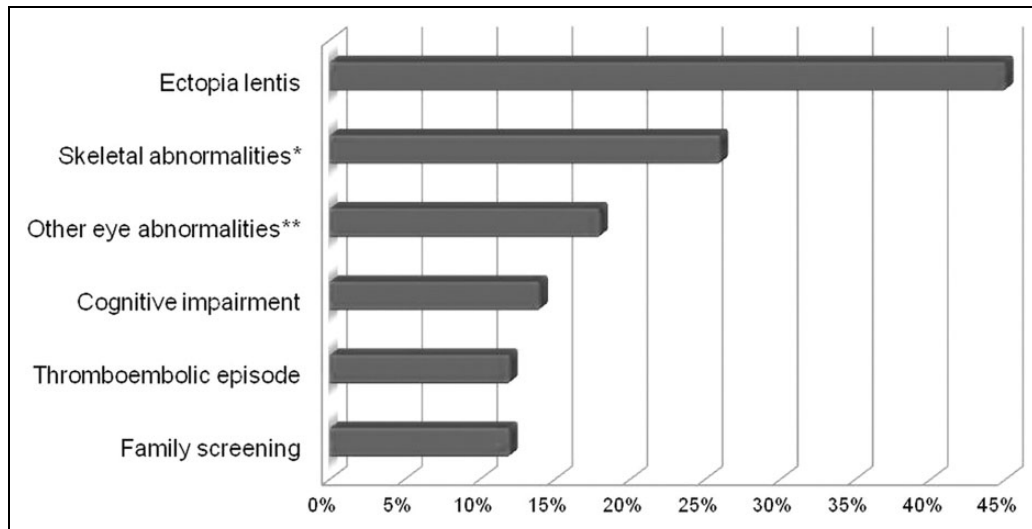


Figure 1. Main reasons for clinical suspicion of classical homocystinuria in our sample (N = 72). *Including marfanoid habitus, **Other than *ectopia lentis*.

Table 2. Classical Homocystinuria in Brazil: Clinical and Biochemical Profile of Patients on Treatment at the Time of Study Inclusion.^a

	Total (n = 44)	Pyridoxine Responsive		P
		Yes (n = 7)	No (n = 37)	
Current age, years	16	19 (14-35)	16 (5-37)	.182
Homocysteine, $\mu\text{mol/L}$	168	19 (14-34)	212 (9-455)	<.001
Methionine, $\mu\text{mol/L}$	131	27 (23-650)	218 (6-881)	.065
Clinical manifestations, %				
Ocular	93	71	97	.013
CNS	70	86	68	.318
Skeletal	61	57	62	.803
Vascular	25	14	27	.475

Abbreviation: CNS, central nervous system.

^an = 44, data expressed as the median (range) or percentage; reference ranges: homocysteine, 5-15 $\mu\text{mol/L}$; methionine, 5-30 $\mu\text{mol/L}$.

specific genotypes are highly prevalent and account for these discrepancies.^{24,25} In a previous study of our group, we explored in more depth the genotype of 35 patients with HCU who are also included in the current study.²²

Our results show there is no single molecular basis for the high prevalence of HCU nonresponsive phenotypes in Brazil. In fact, the most prevalent mutation in that study (p.Ile278Thr) is a pyridoxine-responsive mutation. Another genetic study of 14 Brazilian patients with HCU showed similar results.²⁶ These findings rather suggest underdiagnosis of pyridoxine-responsive patients in Brazil who express milder phenotypes with fewer symptoms and later onset of clinical presentation.^{6,8} In our study, no significant differences in age at symptom onset or age at diagnosis were found between pyridoxine-responsive and nonresponsive patients; however, we believe our analysis was underpowered because of the low number of pyridoxine-responsive patients (n = 10 vs n = 61, respectively).

The high prevalence of ocular manifestations at diagnosis and their predominant contribution to diagnostic suspicion reinforce the importance of eye disease in HCU. *Ectopia lentis* is usually the earliest manifestation of HCU, occurring in half of all untreated patients by age 10 years and in over 90% by age 24 years.⁸ No significant difference in the prevalence of ocular manifestations at diagnosis was found between responsive and nonresponsive patients (75% vs 50%, $P = .10$), although the lack of significance could also be explained by the small sample size. However, this finding is consistent with previous reports in the literature.⁸

Skeletal and neurologic manifestations were also highly prevalent at diagnosis, affecting more than half of patients of our cohort. The lower prevalence of vascular events at diagnosis is consistent with the natural history of HCU, in which such manifestations usually occur in general at a later age.⁸ However, vascular disease may have been underrepresented due to the high lethality of thromboembolic events. The relative large time gap between symptom onset to diagnosis (median, 5 years) and the presence of multiple clinical manifestations attest to the difficulty in establishing a definitive diagnosis in these patients.

The main strategies and goals of HCU treatment have been recently established in the first guidelines for the diagnosis and management of CBS deficiency.⁹ Early diagnosis and early treatment are the key to prevent clinical manifestations and improve prognosis.^{4,18} In the present study, current clinical and biochemical data were obtained from 44 patients in treatment. There was a clear difference in metabolic control between the groups: Responsive patients had low and even near-normal homocysteine and methionine levels, whereas most nonresponsive patients had persistently high homocysteine levels (>100 $\mu\text{mol/L}$) despite multiple treatment strategies. This difficulty in achieving metabolic control in pyridoxine-nonresponsive patients has been reported elsewhere.^{18,27,28}

The high rate of betaine supplementation and comparatively low use of methionine-restricted diet in the nonresponsive patients may be attributed to several factors: (1) difficulties in obtaining the metabolic formula, which is expensive and not provided by the Unified Health System in Brazil;²⁹ (2) low adherence to dietary methionine restriction, particularly in patients with a late diagnosis; and (3) limited training of health-care professionals in dietary prescription. In a European survey of 181 patients with pyridoxine-nonresponsive HCU, 66% were on dietary treatment, that is, twice as many as in the present study.³⁰ Homocystinuria guidelines clearly state that betaine should not be considered a first-line treatment for HCU-nonresponsive patients but used as adjunct treatment in those who cannot achieve target levels of homocysteine by other means.⁹ While dietary therapy dramatically reduces methionine and homocysteine and normalizes cysteine, betaine supplementation reduces homocysteine but increases methionine levels.^{31,32} In animal models, betaine is less effective at preventing clinical manifestations,³³ and its efficacy declines over time.³⁴ In humans, there are no studies of the long-term efficacy of betaine supplementation alone in HCU.

In conclusion, this study provides the first broad clinical characterization of HCU in Brazil. All patients described here were late diagnosed, and most expressed a severe phenotype associated with nonresponsiveness to pyridoxine, early and multisystem clinical manifestations, and poor metabolic control. Limitations of this study include the underrepresented number of patients responsive to pyridoxine, and the number of patients coming from some regions of the country. We believe that our findings will contribute to the development of protocols and guidelines to improve diagnosis and management of HCU in Brazil.

Authors' Note

Soraia Poloni and Giovana Weber Hoss contributed equally to this article. Soraia Poloni, Giovana W. Hoss, Fernanda Sperb-Ludwig, Taciane Borsatto, and Ida V. D. Schwartz made substantial contributions to the conception and design, acquisition of data, analysis, and interpretation of data; Maria Juliana R. Doriqui, Emilia K.E.A Leão, Charles M. Lourenço, Chong A. Kim, Carolina F. M. Souza, Helio Rocha, Marcia Ribeiro, Carlos E. Steiner, Carolina A. Moreno, Pricila Bernardi, Eugenia Valadares, Osvaldo Artigalas, Gerson Carvalho, Hector Y. C. Wanderley, Ney Boa Sorte, and Luiz C. Santana made substantial contributions to the acquisition of data and were involved in revising the manuscript. Ida V. D. Schwartz and Henk J. Blom were involved in the analysis and interpretation of data and critically revising the manuscript for important intellectual content. All authors have given final approval of the version to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Roberto Giugliani, Rede EIM Brasil, Simone Allan Arede, and Associação Brasileira de Homocistinúria for their assistance with patient diagnosis and follow-up.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article. I. Schwartz and V. D'Almeida are National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) research productivity fellows.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Financial support for this study was provided by CNPq, CAPES, DAAD, and FIPE-HCPA.

References

1. Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):17-32.
2. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):75-81.
3. Carson NA, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child.* 1962;37:505-513.
4. Yap S, Rushe H, Howard PM, Naughten ER. The intellectual abilities of early-treated individuals with pyridoxine-nonresponsive homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2001;24(4):437-447.
5. Naughten ER, Yap S, Mayne PD. Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. *Eur J Pediatr.* 1998; 157(suppl 2):S84-S87.
6. Skovby F, Gaustadnes M, Mudd SH. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2010;99(1):1-3.
7. Stopa SR, Malta DC, Monteiro CN, Szwarcwald CL, Goldbaum M, Cesar CLG. Use of and access to health services in Brazil, 2013 National Health Survey. *Rev Saude Publica.* 2017;51(suppl 1):3s.
8. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985;37(1):1-31.
9. Morris AA, Kožich V, Santra S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2017;40(1):49-74.
10. Singh LR, Chen X, Kozich V, Kruger WD. Chemical chaperone rescue of mutant human cystathionine beta-synthase. *Mol Genet Metab.* 2007;91(4):335-342.
11. Kopecká J, Krijt J, Raková K, Kožich V. Restoring assembly and activity of cystathionine β -synthase mutants by ligands and chemical chaperones. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):39-48.
12. Majtan T, Hůlková H, Park I, et al. Enzyme replacement prevents neonatal death, liver damage, and osteoporosis in murine homocystinuria. *FASEB J.* 2017;31(12):5495-5506.
13. Moorthie S, Cameron L, Sagoo GS, Bonham JR, Burton H. Systematic review and meta-analysis to estimate the birth prevalence of five inherited metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis.* 2014; 37(6):889-898.

14. Magner M, Krupková L, Honzík T, Zeman J, Hyánek J, Kožich V. Vascular presentation of cystathionine beta-synthase deficiency in adulthood. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):33-37.
15. Quintas S, Dotor-García Soto J, Alonso-Cerezo MC, Carreras MT. Late diagnosis of homocystinuria in an adult after extensive cerebral venous thrombosis. *Pract Neurol.* 2018;18(1):49-51.
16. Woods E, Dawson C, Senthil L, Geberhiwot T. Cerebral venous thrombosis as the first presentation of classical homocystinuria in an adult patient. *BMJ Case Rep.* 2017;2017.
17. Zschocke J, Kebbewar M, Gan-Schreier H, et al. Molecular neonatal screening for homocystinuria in the Qatari population. *Hum Mutat.* 2009;30(6):1021-1022.
18. Yap S, Naughten E. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J Inherit Metab Dis.* 1998;21(7):738-747.
19. Huemer M, Kožich V, Rinaldo P, et al. Newborn screening for homocystinurias and methylation disorders: systematic review and proposed guidelines. *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(6):1007-1019.
20. Moura RR, Coelho AV, Balbino VeQ, Crovella S, Brandão LA. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am J Hum Biol.* 2015;27(5):674-680.
21. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(28):8696-8701.
22. Poloni S, Sperb-Ludwig F, Borsatto T, et al. CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: a study based on the analysis of 35 Brazilian Classical Homocystinuria patients. *Mol Genet Genomic Med.* 2018;6(2):160-170.
23. Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 8th ed. New York: McGraw Hill; 2001.
24. El-Said MF, Badii R, Bessisso MS, et al. A common mutation in the CBS gene explains a high incidence of homocystinuria in the Qatari population. *Hum Mutat.* 2006;27(7):719.
25. Gallagher PM, Ward P, Tan S, et al. High frequency (71%) of cystathionine beta-synthase mutation G307 S in Irish homocystinuria patients. *Hum Mutat.* 1995;6(2):177-180.
26. Porto MP, Galdieri LC, Pereira VG, et al. Molecular analysis of homocystinuria in Brazilian patients. *Clin Chim Acta.* 2005;362(1-2):71-78.
27. Yap S, Boers GH, Wilcken B, et al. Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(12):2080-2085.
28. Yap S, Naughten ER, Wilcken B, et al. Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(3):335-340.
29. Chieffi AL, Barradas RCB, Golbaum M. Legal access to medications: a threat to Brazil's public health system? *BMC Health Serv Res.* 2017;17(1):499.
30. Adam S, Almeida MF, Carbasius Weber E, et al. Dietary practices in pyridoxine non-responsive homocystinuria: a European survey. *Mol Genet Metab.* 2013;110(4):454-459.
31. Lawson-Yuen A, Levy HL. The use of betaine in the treatment of elevated homocysteine. *Mol Genet Metab.* 2006;88(3):201-207.
32. Komrower GM. Dietary treatment of homocystinuria. *Am J Dis Child.* 1967;113(1):98-100.
33. Gupta S, Wang L, Kruger WD. Betaine supplementation is less effective than methionine restriction in correcting phenotypes of CBS deficient mice. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39(1):39-46.
34. Maclean KN, Jiang H, Greiner LS, Allen RH, Stabler SP. Long-term betaine therapy in a murine model of cystathionine beta-synthase deficient homocystinuria: decreased efficacy over time reveals a significant threshold effect between elevated homocysteine and thrombotic risk. *Mol Genet Metab.* 2012;105(3):395-403.

6.3 CAPÍTULO 3: “*Classical homocystinuria: a common inborn error of metabolism? An epidemiological study based on genetic databases*”

O capítulo 3 estima a incidência mínima de HCU em diferentes populações a partir do número de heterozigotos para as 25 mutações mais comuns em CBS, descritos em grandes bancos de dados genômicos. Este capítulo será apresentado na forma de artigo, o qual será submetido para a revista Human Mutation, cujo fator de impacto é 5,359 e o Qualis CAPES da área de genética (Ciências biológicas I) é A1. O formato obedece às normas de submissão da revista.

6.4 CAPÍTULO 4: “*Creatine as a treatment for homocystinuria*”

O capítulo 4 consiste em estudo *in vitro* com células controle e com defeitos de remetilação tratadas com creatina monohidratada, avaliando aspectos de inflamação e stress oxidativo. Este capítulo será apresentado na forma de artigo, o qual será submetido para a revista *Physiological Research*, cujo fator de impacto é 1,697 e o Qualis CAPES da área de genética (Ciências biológicas I) é B3. O formato obedece às normas de submissão da revista.

6.5 CAPÍTULO 5: “Homocysteine and vitamin B12 in PKU patients”

O capítulo 5 consiste em estudo bioquímico de pacientes com PKU em diferentes momentos, avaliando os níveis de Hcy, MMA, vitamina B12 e outros, comparados a apresentação clínica. Este capítulo será apresentado na forma de artigo (*short report*), o qual será submetido para a revista Clinica Acta, cujo fator de impacto é 2,926 e o Qualis CAPES da área de genética (Ciências biológicas I) é B1. O formato obedece às normas de submissão da revista.

7. DISCUSSÃO

Homocistinúria é um grupo de EIM dos aminoácidos sulfurados. Ao comparar as principais causas de homocistinúria (deficiência de CBS, cblC e MTHFR) observa-se que a manifestação bioquímica em comum é o acúmulo de Hcy, enquanto os outros aminoácidos sulfurados apresentam perfis diversos e até inversos. Pacientes com HCU apresentam altos níveis de Met com baixa cistationina e Cys, enquanto pacientes com defeitos de remetilação apresentam Met normal ou diminuída e a cistationina aumentada. Eventos tromboembólicos, atraso no desenvolvimento e convulsões são apresentações clínicas encontradas em todas as homocistinurias. No entanto, as complicações do SNC diferem em uma ampla variedade de apresentações e severidades e são aparentemente menos pronunciadas na HCU. Além disso, pacientes com defeitos de remetilação tipicamente não apresentam *ectopia lentis* e distúrbios ósseos como alta estatura e osteoporose.

O principal objetivo do tratamento em todas as formas de homocistinúria é reduzir a Hcy plasmática. Na HCU isso resulta em uma melhora clínica marcante (Morris *et al.*, 2017), incluindo a redução de eventos vasculares (Yap *et al.*, 2000; Yap *et al.*, 2001a) e a prevenção do retardo mental (Yap *et al.*, 2001b) e anomalias ósseas (Lim & Lee, 2013). No entanto, mesmo em tratamento, os níveis de Hcy plasmática permaneceram claramente elevados, em particular nos pacientes não-responsivos à piridoxina (Wilcken & Wilcken, 1997; Yap *et al.*, 2000). Os pacientes tratados com cblC têm, em geral, uma redução acentuada de tHcy, abaixo dos níveis encontrados em pacientes com HCU que são não-responsivos. No entanto, problemas neurológicos e oftalmológicos geralmente permanecem em cblC (Fischer *et al.*, 2014).

O significado de níveis elevados de Hcy plasmática também é comprometido por numerosos estudos sobre a mortalidade e o risco de doenças cardiovasculares. Embora o nível elevado de Hcy esteja relacionado a um risco aumentado de aterosclerose e trombose venosa, em grandes estudos controlados randomizados, a redução de Hcy por tratamento com folato e vitamina B12 não reduziu o risco de eventos tromboembólicos (Martí-Carvajal *et al.*, 2017). As observações em homocistinúrias e a elevação da Hcy como fator de risco para doença vascular causam fortes dúvidas se os níveis elevados de Hcy estão direta e causalmente relacionados às apresentações clínicas.

A prevalência de HCU é estimada em ao menos 0.29 a 1 a cada 100,000 indivíduos, mas varia dramaticamente entre regiões de 416:100.000 uma ilha habitada por uma tribo Tao em Taiwan e 55:100.000 no Catar para menos de um em um milhão na população Han de Taiwan (El-Said *et al.*, 2006; Gan-Schreier *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2012). Através da frequência de heterozigotos para o gene *CBS*, reportados no banco dados genéticos, gnomAD, estimamos a incidência mínima mundial de HCU em cerca de 0,38 em 100.000 indivíduos. Estratificando populações por ancestralidade, a maior incidência foi encontrada em europeus e latino americanos. Uma incidência muito menor foi encontrada em asiáticos. As incidências nestes grupos étnicos se aproximam das encontradas pelo *screening* bioquímico neonatal. Por exemplo, em Europeus estimamos 0,72:100.000 indivíduos, calculados pelo número de heterozigotos no gnomAD, versus 0,77:100.000 de acordo com a triagem neonatal e em Asiáticos 0,02:100.000 indivíduos versus 0,07:100.000, respectivamente.

No Brasil, não há dados epidemiológicos sobre a HCU. Utilizando a prevalência mundial mínima estimada em nosso estudo de 0,38:100.000 indivíduos, se esperaria quase 800 pacientes portadores da doença no país. Este número está muito aquém da amostra obtida em nosso estudo clínico (n=72) e do número de pacientes em acompanhamento estimado pela Associação Brasileira de Homocistinúria (80-100 pacientes, relato verbal). Isto sugere uma elevada taxa de subdiagnóstico no país.

Os dados clínicos obtidos no estudo reforçam esta hipótese. Observamos maior proporção de pacientes com fenótipo grave (não responsivos à piridoxina e múltiplas manifestações clínicas). Além disso, o atraso do diagnóstico após o início dos sintomas sugere baixo acesso aos serviços de saúde capacitados para o diagnóstico e/ou baixo conhecimento dos profissionais de saúde sobre a doença. Também deve-se considerar que os testes bioquímicos e moleculares para diagnóstico de HCU estão disponíveis em poucos centros do país, o que dificulta e atrasa a confirmação diagnóstica.

A dificuldade no controle metabólico nos pacientes não responsivos à piridoxina, bem como a baixa adesão à dieta pobre em Met/fórmula metabólica revelaram problemas no manejo deste grupo de pacientes. Além das dificuldades na obtenção da fórmula, podem ter contribuído para este resultado o preparo insuficiente dos profissionais de saúde para prescrição deste tipo de dieta e dificuldade de compreensão da importância da adesão ao tratamento por parte dos pacientes e familiares. Estes achados também reforçam a

necessidade de protocolos clínicos e diretrizes para o diagnóstico de manejo da HCU no país. A alta prevalência de déficit cognitivo e distúrbios psiquiátricos na HCU também pode prejudicar a adesão ao tratamento (Abbott *et al.*, 1987; S.H. *et al.*, 2001).

Diversos pacientes com HCU, incluídos em nosso artigo sobre descrição clínica, foram diagnosticados através de pesquisa molecular realizada durante o doutorado. Além disso, publicamos um estudo com descrição molecular de 35 pacientes, e no momento temos dados de mais 18 pacientes, para publicação de um *update*. Nos últimos quatro anos identificamos cinco novas variantes ou ainda não descritas em pacientes com HCU. A variante p.Trp323Ter é descrita apenas na Arábia Saudita, sendo muito frequente nesse país e foi identificada em homozigose em sete pacientes brasileiros, todos da região Nordeste; iremos investigar e descrever com detalhes esses achados. Além disso, iniciamos a pesquisa molecular para identificação de pacientes com deficiência de MTHFR, e o sequenciamento de cDNA do gene *CBS* para caracterização de alterações de splicing e também identificação de variantes possivelmente não detectadas pelo sequenciamento de DNA.

Pacientes com homocistinúria, mesmo em tratamento, mantêm altos níveis de Hcy, e diversos estudos indicam uma associação entre a hiper-homocisteinemia e a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem ter impacto na clínica e no tratamento desses pacientes. Estudamos o efeito da suplementação de Cre em cultivo celular de pacientes com homocistinúria, uma vez que a síntese hepática endógena de Cre é responsável pela formação de uma porção substancial de Hcy, e a Cre é apontada como um composto antioxidante. Em nosso estudo *in vitro* observamos aumento do conteúdo intracelular de Cre nos grupos tratados. No grupo de células saudáveis após o tratamento com Cre houve uma diminuição em CAT, SOD, SH e DCFH, mas sem diferença estatística, possivelmente devido ao pequeno tamanho amostral.

Em pacientes com homocistinúria, Vanzin *et al.* (2015) relataram que o teor de SH e o estado antioxidante total são baixos no diagnóstico e em pacientes em tratamento, sugerindo que o tratamento não é capaz de prevenir a diminuição das defesas antioxidantes encontradas no diagnóstico. Em ratos submetidos a hiper-homocisteinemia crônica, a oxidação de DCFH, um índice de produção de espécies reativas, e os níveis de TBARS, um índice de peroxidação lipídica no músculo esquelético, aumentaram. A atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT também aumentaram, mas a atividade da GPx não foi alterada. Os teores de glutatona, SH e carbonila foram diminuídos, assim como os níveis de

nitrito. A administração concomitante de Cre impediu o aumento das atividades de SOD e CAT causadas pela hiper-homocisteinemia (Kolling *et al.*, 2014). No entanto, Machado *et al.*, (2011) relataram que a administração crônica de Hcy reduziu significativamente as atividades antioxidantes de CAT e SOD no hipocampo de ratos.

Hiper-homocisteinemia e deficiência de vitamina B12 também foram relatadas em pacientes com PKU. Em nosso estudo, foi encontrada uma redução nos níveis de tHcy após o tratamento de pacientes com PKU com dieta e fórmula metabólica. Nenhum dos pacientes com PKU apresentava valores de tHcy acima do intervalo normal, indicando não haver deficiências evidentes de folato ou vitamina B12 durante o tratamento, provavelmente devido ao enriquecimento das fórmulas com esses compostos, como previamente demonstrado (Kose & Arslan, 2018). O enriquecimento também pode explicar que até 34% dos pacientes com PKU tinham valores de tHcy menores que 5 $\mu\text{mol/L}$.

Semelhante ao nosso estudo, Stølen *et al.* (2014) mostraram que 68% de 34 crianças com PKU em tratamento dietético tinham concentrações plasmáticas de Hcy abaixo do intervalo de referência. Neste estudo, 91% e 53% das crianças estudadas apresentaram níveis plasmáticos de folato e vitamina B12 acima do nível de referência, respectivamente. No entanto, em outro estudo nenhuma diferença foi observada nos níveis de Hcy em indivíduos com PKU em tratamento (idade: 4-20 anos) e controles, embora os níveis de folato e vitamina B12 fossem maiores em pacientes com PKU (Huemer *et al.*, 2008).

Ao analisar as gestantes antes, durante e após a gestação, observamos uma diminuição nos níveis de Phe, tHcy e tirosina durante o período gestacional. Os níveis de tHcy foram especialmente elevados nas mulheres com PKU incluídas neste estudo antes da gravidez, com média de 22 $\mu\text{mol/L}$. Durante a gravidez, os níveis de tHcy estavam dentro da faixa normal e eram similares aos descritos em gestantes saudáveis (Murphy *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2004; Gaiday *et al.*, 2018). Os níveis de MMA não foram estatisticamente diferentes dentre os períodos comparados, com valores dentro da faixa normal. Chowdhury *et al.* (2011) relataram que gestantes de crianças com cardiopatias congênitas apresentavam níveis mais elevados de Hcy e AdoHcy e menores níveis de Met e AdoMet. Essas diferenças foram acompanhadas por hipometilação do DNA materno, em comparação com os controles.

8. CONCLUSÕES

As conclusões do trabalho serão apresentadas por objetivo.

I. Caracterizar e comparar as principais causas de homocistinúria: homocistinúria por deficiência de CBS, cblC e MTHFR

A manifestação bioquímica comum às deficiências de CBS, cblC e MTHFR é o acúmulo de tHcy e o tratamento da homocistinúria tem se concentrado principalmente na redução dos níveis de Hcy. Os outros aminoácidos sulfurados apresentam perfis diversos e até inversos. A deficiência de CBS mostra metionina alta com baixa cistationina e Cys, enquanto nos defeitos de remetilação, a metionina é normal ou diminuída e a cistationina aumentada. No momento do diagnóstico, o folato é tipicamente baixo ou (funcionalmente) deficiente em todas as homocistinúrias. Alguns achados clínicos comuns dentre as homocistinúrias, são atraso no desenvolvimento e convulsões, bem como eventos tromboembólicos. No entanto, as complicações do SNC diferem em uma ampla variedade de apresentações e severidades entre as diferentes formas de homocistinúria e são aparentemente menos pronunciadas na deficiência de CBS. Além disso, pacientes com defeitos de remetilação tipicamente não apresentam *ectopia lentis* e distúrbios ósseos, estatura alta e osteoporose, sintomas comuns na HCU. Alterações hematológicas, como anemia megaloblástica, neutropenia e trombocitopenia, são achados específicos de deficiência de cblC.

II. Discutir o papel da homocisteína na patogenicidade das homocistinúrias.

Há pouca sobreposição nas apresentações bioquímicas e clínicas das três formas mais comuns de homocistinúria. A clara diferença nas apresentações clínicas nos faz questionar se a própria Hcy é o principal metabólito patológico. Na deficiência de CBS, a redução dos níveis de Hcy, após tratamento, resulta em um desfecho clínico marcante, incluindo a redução de eventos vasculares, prevenção do retardo mental e anomalias ósseas. Apesar disso, os níveis de Hcy no plasma permaneceram claramente elevados, em particular nos pacientes não responsivos à piridoxina. Já os pacientes tratados com cblC têm, em geral, uma redução acentuada de tHcy abaixo dos níveis encontrados em pacientes com deficiência

de CBS que não são responsivos. No entanto, problemas neurológicos e oftalmológicos geralmente permanecem em pacientes com deficiência de cblC. O significado de níveis elevados de Hcy plasmática também é comprometido por numerosos estudos sobre a mortalidade e risco de doenças cardiovasculares. Embora o nível elevado de tHcy esteja relacionado a um risco aumentado de aterosclerose e trombose venosa, a redução de tHcy por folato e vitamina B12 não reduziu o risco de desfechos vasculares em grandes estudos controlados randomizados. As observações de homocistinúria, e elevação da homocisteína como fator de risco para doença vascular geram fortes dúvidas se os níveis elevados de homocisteína estão direta e causalmente relacionados às apresentações clínicas.

III. Caracterizar o perfil clínico da homocistinúria clássica no Brasil.

Dados clínicos de 72 pacientes (60 famílias) em acompanhamento em serviços de genética de todas as regiões do Brasil foram analisados. As manifestações oculares foram as mais precoces e prevalentes na amostra, bem como a principal suspeita diagnóstica, corroborando com dados da literatura. Observou-se maior prevalência de pacientes não responsivos à piridoxina, e uma pequena porção dos pacientes não responsivos manteve os níveis de homocisteína indicados ($<100\mu\text{mol/L}$). Os tratamentos mais comuns foram respectivamente: piridoxina, ácido fólico, betaína, vitamina B12 e dieta restrita em metionina associada ao uso de fórmula metabólica. A maioria dos pacientes teve diagnóstico tardio, mesmo após apresentação de sintomas.

IV. Estimar a incidência de homocistinúria clássica com base no número de heterozigotos em bancos de dados genômicos.

Dentre as mutações no gene *CBS*, p.Ile278Thr é a variante geograficamente mais difundida. Conforme a frequência de heterozigotos para *CBS* no banco de dados *GnomAD*, a incidência mundial de HCU foi calculada em aproximadamente 0,38:100.000 indivíduos. Estratificando populações por ancestralidade, as maiores incidências foram encontradas em Europeus e Latino Americanos, e a menor incidência foi encontrada em Asiáticos. As incidências nestas populações corroboram com as encontradas por *screening* bioquímico neonatal. O grande número de indivíduos analisados e a cobertura populacional do banco de dados utilizado permitem grande precisão na estimativa de incidência. A incidência estimada

de HCU, que é um distúrbio tratável, apóia a implementação da triagem neonatal na Europa (~ 0,72:100.000) e na América Latina (~ 0,45:100.000).

- V. Avaliar a ação antioxidante da creatina em cultura celular de fibroblastos com defeito de remetilação da homocisteína e controles.

Observamos que o conteúdo intracelular de Cre aumentou nos grupos tratados, e no grupo de células saudáveis após o tratamento com Cre houve uma redução na CAT, SOD, SH e DCFH, mas não houve diferença estatisticamente significativa, provavelmente devido ao pequeno número amostral. Portanto, Cre tem o potencial de reduzir marcadores de estresse oxidativo, mesmo que apenas em algumas células, o que pode sugerir uma ação indivíduo-dependente. Em pacientes com homocistinúria, a suplementação de Cre pode ser um tratamento adjuvante para restaurar a homeostase redox causada por hiperhomocisteinemia.

- VI. Avaliar os níveis de homocisteína, ácido metilmalônico e vitamina B12 em pacientes com fenilcetonúria.

Nossos resultados indicam que o tratamento de pacientes PKU com fórmula metabólica reduz nos níveis de tHcy. Nenhum dos pacientes com PKU apresentou valores de tHcy acima da faixa normal, indicando que não há deficiências evidentes de folato ou vitamina B12 entre os pacientes em tratamento, provavelmente devido ao enriquecimento das fórmulas metabólicas com vitamina B12 e folato. Nas pacientes grávidas, os níveis de fenilalanina foram menores durante a gestação, bem como os níveis de Hcy, indicando melhor aderência ao tratamento. Concluimos que o acompanhamento clínico e adesão ao tratamento dietético são muito importantes. O manejo de pacientes com PKU deve abordar a adequação da ingestão de proteínas, além de monitorar os níveis de fenilalanina, os aminoácidos plasmáticos, Hcy e MMA, que devem ser avaliados para detectar a deficiência de vitamina B12, especialmente antes da concepção, para minimizar os riscos para o feto.

9. PERSPECTIVAS

Como continuidade dessa pesquisa, os seguintes estudos serão ou estão sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa:

- Ensaio clínico com suplementação de creatina em pacientes com homocistinúria;
- Sequenciamento de cDNA de pacientes com homocistinúria clássica onde foi encontrado apenas uma mutação, ou ainda que apresentem variantes próximas à sítios de splicing;
- Caracterização clínica e molecular de pacientes brasileiros com suspeita de homocistinúria por deficiência de MTHFR. Até o momento realizamos a análise molecular de 16 pacientes, foram identificados polimorfismos em todos os indivíduos, além de uma mutação ainda não descrita e uma variante com possível alteração de splicing. Assim, nenhum dos pacientes com suspeita de deficiência de MTHFR teve seu diagnóstico confirmado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalan F (1999) Primer in folic acid: folates and neuropsychiatry. *Nutrition* 15: 595-598.
- Abbott MH, Folstein SE, Abbey H and Pyeritz RE (1987) Psychiatric manifestations of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: prevalence, natural history, and relationship to neurologic impairment and vitamin B6-responsiveness. *Am J Med Genet* 26: 959-969.
- Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C and Schoffemeer AN (2006) Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* 60: 118-23.
- Andrade VM, Dal Pont HS, Leffa DD, Damiani AP, Scaini G, Hainzenreder G et al. (2014) Methylmalonic acid administration induces DNA damage in rat brain and kidney. *Mol Cell Biochem* 391: 137-145.
- Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, et al. (1998) Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 78: 332-335.
- Bickel H, Gerrard J and Hickmans EM (1953) Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 265: 812-813.
- Blau N, van Spronsen FJ and Levy HL (2010) Phenylketonuria. *Lancet* 376: 1417-1427.
- Blom HJ and Smulders Y (2011) Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis* 34: 75-81.
- Bottiglieri T (1996) Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders. *Nutr Rev* 54: 382-90.
- Brett AS and Roberts MS (1994) Screening for vitamin B12 deficiency in psychiatric patients. *J Gen Intern Med* 9: 522-524.
- Brosnan ME, Edison EE, da Silva R and Brosnan JT (2007) New insights into creatine function and synthesis. *Adv Enzyme Regul* 47: 252-260.
- Brusque AM, Borba Rosa R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CA, Silva CG, et al. (2002) Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 40: 593-601.
- Brustolin S, Giugliani R and Félix TM (2010) Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res* 43: 1-7.
- Burda P, Schäfer A, Suormala T, Rummel T, Bürer C, Heuberger D, et al. (2015) Insights into severe 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: molecular genetic and enzymatic characterization of 76 patients. *Hum Mutat* 36: 611-621.
- Carrillo-Carrasco N, Chandler RJ and Venditti CP (2012) Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. I. Clinical presentations, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis* 35: 91-102.
- Carson NA, Cusworth DC, Dent CE, Field CM, Neill DW and Westall RG (1963) Homocystinuria: A New Inborn Error Of Metabolism Associated With Mental Deficiency. *Arch Dis Child* 38: 425-436.
- Casella G, Antonelli E, Di Bella C, Di Marco E, Piatti M, Villanacci V, et al. (2013) Hyperhomocysteinemia in patients with Crohn's disease. *Tech Coloproctol* 17: 497-500.
- Casey L (2013) Caring for children with phenylketonuria. *Can Fam Physician* 59: 837-40.
- Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C and Tavares de Almeida I (2006) Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: an overview. *J Inherit Metab Dis* 29: 3-20.
- Chowdhury S, Cleves MA, MacLeod SL, James SJ, Zhao W and Hobbs CA (2011) Maternal DNA hypomethylation and congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91: 69-76.

- Coşar A, Ipçioğlu OM, Özcan O and Gültepe M (2014) Folate and homocysteine metabolisms and their roles in the biochemical basis of neuropsychiatry. *Turk J Med Sci* 44: 1-9.
- Deminice R, Portari GV, Vannucchi H and Jordao AA (2009) Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. *Br J Nutr* 102: 110-116.
- Diekman EF, de Koning TJ, Verhoeven-Duif NM, Rovers MM and van Hasselt PM (2014) Survival and psychomotor development with early betaine treatment in patients with severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *JAMA Neurol* 71: 188-194.
- Dobbelaere D, Michaud L, Debrabander A, Vanderbecken S, Gottrand F, Turck D, et al. (2003) Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 26: 1-11.
- Edison EE, Brosnan ME, Meyer C and Brosnan JT (2007) Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1799-804.
- El-Said MF, Badii R, Bessisso MS, Shahbek N, El-Ali MG, El-Marikhie M, et al. (2006) A common mutation in the CBS gene explains a high incidence of homocystinuria in the Qatari population. *Hum Mutat* 27: 719.
- Finkelstein JD (2006) Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. *J Nutr* 136: 1750S-1754S.
- Fischer S, Huemer M, Baumgartner M, Deodato F, Ballhausen D, Boneh A, et al. (2014) Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the cblC defect. *J Inherit Metab Dis* 37: 831-840.
- Flydal MI and Martinez A (2013) Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life* 65: 341-9.
- Fowler B (1997) Disorders of homocysteine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 20: 270-285.
- Frangipani BJ, Brum JM, Silva LCS, Rand MH, Kyosen S and Voos SM (2006) Homocistinúria. *Protocolo Brasileiro de Dietas – Erros Inatos do Metabolismo. Segmento Farma, São Paulo.*
- Gaiday AN, Tussupkaliyev AB, Bermagambetova SK, Zhumagulova SS, Sarsembayeva LK, Dossimbetova MB, et al. (2018) Effect of homocysteine on pregnancy: A systematic review. *Chem Biol Interact* 293: 70-76.
- Gan-Schreier H, Kebbewar M, Fang-Hoffmann J, Wilrich J, Abdoh G, Ben-Omran T, et al. (2010) Newborn population screening for classic homocystinuria by determination of total homocysteine from Guthrie cards. *J Pediatr* 156: 427-432.
- Gariballa S (2011) Testing homocysteine-induced neurotransmitter deficiency, and depression of mood hypothesis in clinical practice. *Age Ageing* 40: 702-705.
- Gaustadnes M, Ingerslev J and Rütiger N (1999) Prevalence of congenital homocystinuria in Denmark. *N Engl J Med* 340: 1513.
- Ghozlan A, Varoquaux O and Abadie V (2004) Is monoamine oxydase-B a modifying gene and phenylethylamine a harmful compound in phenylketonuria? *Mol Genet Metab* 83: 337-340.
- Givvimani S, Munjal C, Narayanan N, Aqil F, Tyagi G, Metreveli N, et al. (2012) Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G281-90.
- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, et al. (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9: 652-6.
- Guthmiller P, Van Pilsum JF, Boen JR and McGuire DM (1994) Cloning and sequencing of rat kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. Studies on the mechanism of regulation by growth hormone and creatine. *J Biol Chem* 269: 17556-17560.
- Hannibal L and Blom HJ (2017) Homocysteine and disease: Causal associations or epiphenomenons? *Mol Aspects Med* 53: 36-42.
- Herrmann W, Obeid R, Schorr H and Geisel J (2003) Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 41: 1478-1488.

- Hoeksma M, Reijngoud DJ, Pruim J, de Valk HW, Paans AM and van Spronsen FJ (2009) Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Mol Genet Metab* 96: 177-182.
- Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, et al. (2000) Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet* 8: 725-729.
- Huang RF, Hsu YC, Lin HL and Yang FL (2001) Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 131: 33-38.
- Huemer M, Diodato D, Schwahn B, Schiff M, Bandeira A, Benoist JF, et al. (2017) Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency. *J Inher Metab Dis* 40: 21-48.
- Huemer M, Födinger M, Bodamer OA, Mühl A, Herle M, Weigmann C, et al. (2008) Total homocysteine, B-vitamins and genetic polymorphisms in patients with classical phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 94: 46-51.
- Huemer M, Mulder-Bleile R, Burda P, Froese DS, Suormala T, Zeev BB, et al. (2015) Clinical pattern, mutations and in vitro residual activity in 33 patients with severe 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency. *J Inher Metab Dis*.
- Huemer M, Simma B, Mayr D, Möslinger D, Mühl A, Schmid I, et al. (2012) Free asymmetric dimethylarginine (ADMA) is low in children and adolescents with classical phenylketonuria (PKU). *J Inher Metab Dis* 35: 817-821.
- Hörster F, Schwab MA, Sauer SW, Pietz J, Hoffmann GF, Okun JG, et al. (2006) Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr Res* 59: 544-548.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93: 7-9.
- Janosík M, Sokolová J, Janosíková B, Krijt J, Klatovská V and Kozich V (2009) Birth prevalence of homocystinuria in Central Europe: frequency and pathogenicity of mutation c.1105C>T (p.R369C) in the cystathionine beta-synthase gene. *J Pediatr* 154: 431-437.
- Jiang X, Yang F, Tan H, Liao D, Bryan RM, Randhawa JK, et al. (2005) Hyperhomocystinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2515-2521.
- Karam PE, Majdalani MN, Daher RT, Barhoumi A and Yazbeck N (2015) Cardiovascular disease biomarkers in patients with inborn errors of protein metabolism: a pilot study. *J Hum Nutr Diet* 28: 344-349.
- Klee GG (2000) Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem* 46: 1277-1283.
- Kolling J, Scherer EB, Siebert C, Marques EP, Dos Santos TM and Wyse AT (2014) Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats. *Gene* 545: 72-79.
- Kose E and Arslan N (2018) Vitamin/mineral and micronutrient status in patients with classical phenylketonuria. *Clin Nutr*.
- Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W and Demaree S (2002) Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 47-52.
- Lawson-Yuen A and Levy HL (2006) The use of betaine in the treatment of elevated homocysteine. *Mol Genet Metab* 88: 201-207.
- Lerner-Ellis JP, Anastasio N, Liu J, Coelho D, Suormala T, Stucki M, et al. (2009) Spectrum of mutations in MMACHC, allelic expression, and evidence for genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 30: 1072-1081.
- Lim JS and Lee DH (2013) Changes in bone mineral density and body composition of children with well-controlled homocystinuria caused by CBS deficiency. *Osteoporos Int* 24: 2535-2538.

- Linnebank M, Homberger A, Junker R, Nowak-Goettl U, Harms E and Koch HG (2001) High prevalence of the I278T mutation of the human cystathionine beta-synthase detected by a novel screening application. *Thromb Haemost* 85: 986-988.
- Liu Z, Cui C, Wang X, Fernandez-Escobar A, Wu Q, Xu K, et al. (2018) Plasma Levels of Homocysteine and the Occurrence and Progression of Rectal Cancer. *Med Sci Monit* 24: 1776-1783.
- Lu YH, Huang YH, Cheng LM, Yu HC, Hsu JH, Wu TJ, et al. (2012) Homocystinuria in Taiwan: an inordinately high prevalence in an Austronesian aboriginal tribe, Tao. *Mol Genet Metab* 105: 590-595.
- Lühmann D, Schramm S and Raspe H (2007) The role of Homocysteine as a predictor for coronary heart disease. *GMS Health Technol Assess* 3: Doc11.
- MacDonald A, Cochrane B, Wopereis H and Loveridge N (2011) Specific prebiotics in a formula for infants with Phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 104 Suppl: S55-9.
- Machado FR, Ferreira AG, da Cunha AA, Tagliari B, Mussulini BH, Wofchuk S, et al. (2011) Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C. *Metab Brain Dis* 26: 61-67.
- Manoli I, Myles JG, Sloan JL, Carrillo-Carrasco N, Morava E, Strauss KA, et al. (2016) A critical reappraisal of dietary practices in methylmalonic acidemia raises concerns about the safety of medical foods. Part 2: cobalamin C deficiency. *Genet Med* 18: 396-404.
- Martinelli D, Deodato F and Dionisi-Vici C (2011) Cobalamin C defect: natural history, pathophysiology, and treatment. *J Inherit Metab Dis* 34: 127-135.
- Martynyuk AE, Glushakov AV, Sumners C, Laipis PJ, Dennis DM and Seubert CN (2005) Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain. *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1: S34-42.
- Martí-Carvajal AJ, Solà I, Lathyris D and Dayer M (2017) Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev* 8: CD006612.
- McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56: 111-128.
- McCully KS (2015) Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 8: 211-219.
- Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M and Castilho RF (2008) Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis* 31: 44-54.
- Moorthie S, Cameron L, Sagoo GS, Bonham JR and Burton H (2014) Systematic review and meta-analysis to estimate the birth prevalence of five inherited metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis* 37: 889-898.
- Moraes R, Van Bavel D, Moraes BS and Tibiriçá E (2014) Effects of dietary creatine supplementation on systemic microvascular density and reactivity in healthy young adults. *Nutr J* 13: 115.
- Morris AA, Kožich V, Santra S, Andria G, Ben-Omran TI, Chakrapani AB, et al (2017) Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 40: 49-74.
- Mudd SH, Edwards WA, Loeb PM, Brown MS and Laster L (1970) Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: the effect of pyridoxine. *J Clin Invest* 49: 1762-1773.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F and Laster L (1964) Homocystinuria: An Enzymatic Defect. *Science* 143: 1443-1445.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, et al. (2000) Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1704-1706.
- Mudd SH, Levy HL, Abeles RH and Jennedy JP (1969) A derangement in B 12 metabolism leading to homocystinemia, cystathioninemia and methylmalonic aciduria. *Biochem Biophys Res Commun* 35: 121-126.

- Mudd SH, Levy HL and Kraus JP (2001) Disorders of transulfuration. 8 ed. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw Hill, New York.
- Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al. (1985) The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 37: 1-31.
- Mudd SH, Uhlendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD and Shih VE (1972) Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 905-912.
- Murphy MM, Scott JM, Arija V, Molloy AM and Fernandez-Ballart JD (2004) Maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy predicts fetal homocysteine and birth weight. *Clin Chem* 50: 1406-1412.
- Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM and Fernandez-Ballart JD (2002) The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 76: 614-619.
- Naughten ER, Yap S and Mayne PD (1998) Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2: S84-87.
- Padilla CD (2003) Newborn screening in the Philippines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34 Suppl 3: 87-88.
- Paniz C, Grotto D, Schmitt GC, Valentini J, Schott KL, Pomblum VJ, et al. (2005) Physiopathology of vitamin B12 deficiency and its laboratorial diagnosis. *J. Bras. Patol. Med. Lab* 41.
- Pearson KD, Gean-Marton AD, Levy HL and Davis KR (1990) Phenylketonuria: MR imaging of the brain with clinical correlation. *Radiology* 177: 437-440.
- Perla-Kaján J, Twardowski T and Jakubowski H (2007) Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 32: 561-572.
- Petr M, Steffl M and Kohlíková E (2013) Effect of the MTHFR 677C/T polymorphism on homocysteinemia in response to creatine supplementation: a case study. *Physiol Res* 62: 721-729.
- Pettenuzzo LF, Ferreira GAC, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT and Wajner M (2006) Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int J Dev Neurosci* 24: 45-52.
- Picker JD and Levy HL (2014) Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. *GeneReviews*[®] University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Pico MLC and Bermudez JMF (2006) Homocystinuria y alteraciones del metabolismo de folatos y vitamina B₁₂. 2^o ed. ed. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. Majadahonda, Madrid.
- Pratt OE (1980) A new approach to the treatment of phenylketonuria. *J Ment Defic Res* 24: 203-217.
- Prick BW, Hop WC and Duvekot JJ (2012) Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in pregnancy: pregnancy complications and neonatal sequelae in untreated and treated pregnancies. *Am J Clin Nutr* 95: 374-382.
- Refsum H, Fredriksen A, Meyer K, Ueland PM and Kase BF (2004) Birth prevalence of homocystinuria. *J Pediatr* 144: 830-832.
- Ribas GS, Manfredini V, de Marco MG, Vieira RB, Wayhs CY, Vanzin CS, et al. (2010) 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.
- Rosenblatt D and Erbe R (2001) Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. 8th ed. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York, NY.


- Rosenblatt DS, Aspler AL, Shevell MI, Pletcher BA, Fenton WA and Seashore MR (1997) Clinical heterogeneity and prognosis in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC). *J Inher Metab Dis* 20: 528-538.
- Rouse B and Azen C (2004) Effect of high maternal blood phenylalanine on offspring congenital anomalies and developmental outcome at ages 4 and 6 years: the importance of strict dietary control preconception and throughout pregnancy. *J Pediatr* 144: 235-239.
- Santacruz L, Darrabie MD, Mantilla JG, Mishra R, Feger BJ and Jacobs DO (2015) Creatine supplementation reduces doxorubicin-induced cardiomyocellular injury. *Cardiovasc Toxicol* 15: 180-188.
- Saudubray JM, van den Berghe G and Walter JH (2012) *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*.
- Schalinske KL and Smazal AL (2012) Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr* 3: 755-762.
- Schiff M and Blom HJ (2012). Treatment of inherited homocystinurias. *Neuropediatrics* 43: 295-304.
- Schulpis KH, Karikas GA and Papakonstantinou E (2002) Homocysteine and other vascular risk factors in patients with phenylketonuria on a diet. *Acta Paediatr* 91: 905-909.
- Schulze A (2003) Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 244: 143-150.
- Shefer S, Tint GS, Jean-Guillaume D, Daikhin E, Kendler A, Nguyen LB, et al. (2000) Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res* 61: 549-563.
- Sibani S, Leclerc D, Weisberg IS, O'Ferrall E, Watkins D, Artigas C, et al. (2003) Characterization of mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency reveals an FAD-responsive mutation. *Hum Mutat* 21: 509-520.
- Snow RJ and Murphy RM (2001) Creatine and the creatine transporter: a review. *Mol Cell Biochem* 224: 169-181.
- Soni RM, Tiwari SC, Mahdi AA and Kohli N (2019) Serum Homocysteine and Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia: Is There Any Correlation in Alzheimer's Disease? *Ann Neurosci* 25: 152-159.
- Stead LM, Au KP, Jacobs RL, Brosnan ME and Brosnan JT (2001) Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1095-1100.
- Stead LM, Brosnan JT, Brosnan ME, Vance DE and Jacobs RL (2006) Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am J Clin Nutr* 83: 5-10.
- Strauss KA, Morton DH, Puffenberger EG, Hendrickson C, Robinson DL, Wagner C, et al. (2007) Prevention of brain disease from severe 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Mol Genet Metab* 91: 165-175.
- Stølen LH, Lilje R, Jørgensen JV, Blikrud YT and Almaas R (2014) High dietary folic Acid and high plasma folate in children and adults with phenylketonuria. *JIMD Rep* 13: 83-90.
- Surtees R, Leonard J and Austin S (1991) Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. *Lancet* 338: 1550-1554.
- Thauvin-Robinet C, Roze E, Couvreur G, Horellou MH, Sedel F, Grabli D, et al. (2008) The adolescent and adult form of cobalamin C disease: clinical and molecular spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 725-728.
- Thomas M and Rosenblatt D (2005) Severe methylenetetrahydrofolate deficiency. MTHFR polymorphisms and disease. Landes Bioscience, Georgetown, Texas; USA.
- van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, et al. (2017) The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet J Rare Dis* 12: 162.
- Vanzin CS, Mescka CP, Donida B, Hammerschmidt TG, Ribas GS, Kolling J, et al. (2015) Lipid, Oxidative and Inflammatory Profile and Alterations in the Enzymes Paraoxonase and

- Butyrylcholinesterase in Plasma of Patients with Homocystinuria Due CBS Deficiency: The Vitamin B12 and Folic Acid Importance. *Cell Mol Neurobiol* 35: 899-911.
- Verduci E, Banderali G, Moretti F, Lassandro C, Cefalo G, Radaelli G, et al. (2016) Diet in children with phenylketonuria and risk of cardiovascular disease: A narrative overview. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 26: 171-177.
- Vugteveen I, Hoeksma M, Monsen AL, Fokkema MR, Reijngoud DJ, van Rijn M, et al. (2011) Serum vitamin B12 concentrations within reference values do not exclude functional vitamin B12 deficiency in PKU patients of various ages. *Mol Genet Metab* 102: 13-17.
- Walter JH, Wraith JE, White FJ, Bridge C and Till J (1998) Strategies for the treatment of cystathionine beta-synthase deficiency: the experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2: S71-76.
- Wang X, Sun W, Yang Y, Jia J and Li C (2012) A clinical and gene analysis of late-onset combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, in China. *J Neurol Sci* 318: 155-159.
- Watkins D and Rosenblatt DS (2012) Update and new concepts in vitamin responsive disorders of folate transport and metabolism. *J Inherit Metab Dis* 35: 665-670.
- Weiss N (2005) Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* 6: 27-36.
- Weiss N, Keller C, Hoffmann U and Loscalzo J (2002) Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 7: 227-239.
- Wilcken B (2006) Disorders of Sulfur Amino Acids. Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases. Hardcover: Springer.
- Wilcken B and Turner G (1978). Homocystinuria in New South Wales. *Arch Dis Child* 53: 242-245.
- Wilcken DE and Wilcken B (1997) The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. *J Inherit Metab Dis* 20: 295-300.
- Wyss M and Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80: 1107-1213.
- Yap S (2005) Homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. Orphanet encyclopedia.
- Yap S, Boers GH, Wilcken B, Wilcken DE, Brenton DP, Lee PJ, et al. (2001a) 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.
- Yap S and 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, Naughten ER, Wilcken B, Wilcken DE and Boers GH (2000) Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy. *Semin Thromb Hemost* 26: 335-340.
- Yap S, Rushe H, Howard PM and Naughten ER (2001b) The intellectual abilities of early-treated individuals with pyridoxine-nonresponsive homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 24: 437-447.
- Zhang Y, Hodgson NW, Trivedi MS, Abdolmaleky HM, Fournier M, Cuenod M, et al. (2016) Decreased Brain Levels of Vitamin B12 in Aging, Autism and Schizophrenia. *PLoS One* 11: e0146797.
- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, et al. (2016) The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci* 17.

11. APÊNDICES

Apêndice 1 - Artigo publicado no *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2018: "*CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: A study based on the analysis of 35 Brazilian Classical Homocystinuria patients*"

***CBS* mutations are good predictors for B6-responsiveness: A study based on the analysis of 35 Brazilian Classical Homocystinuria patients**

Soraia Poloni^{1,2} | Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2} | Taciane Borsatto^{1,2} |
 Giovana Weber Hoss^{1,2} | Maria Juliana R. Doriqui³ | Emília K. Embiruçu^{4,5} |
 Ney Boa-Sorte^{4,5} | Charles Marques⁶ | Chong A. Kim⁷ |
 Carolina Fischinger Moura de Souza⁸ | Helio Rocha⁹ | Marcia Ribeiro⁹ |
 Carlos E. Steiner¹⁰ | Carolina A. Moreno¹⁰ | Pricila Bernardi¹¹ | Eugenia Valadares¹² |
 Osvaldo Artigalás^{13,14} | Gerson Carvalho¹⁵ | Hector Y. C. Wanderley¹⁶ |
 Johanna Kugele¹⁷ | Melanie Walter¹⁷ | Lorena Gallego-Villar¹⁷ | Henk J. Blom¹⁷ |
 Ida Vanessa D. Schwartz^{1,2,8} 

¹Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Laboratory of Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³Complexo Hospitalar Materno-Infantil do Maranhão, São Luis, Brazil

⁴Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Brazil

⁵Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Brazil

⁶Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

⁷Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁸Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

¹⁰Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

¹¹Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

¹²Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

¹³Children's Hospital, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil

¹⁴Genetics Unit, Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, Brazil

¹⁵Hospital de Apoio de Brasília, Brasília, Brazil

¹⁶Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, Brazil

¹⁷Laboratory for Clinical Biochemistry and Metabolism, University Medical Center, Freiburg, Germany

Correspondence

Ida Vanessa D. Schwartz, Serviço de
 Genética Médica, Hospital de Clínicas de
 Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.
 Email: ischwartz@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Background: Classical homocystinuria (HCU) is a monogenic disease caused by the deficient activity of cystathionine β -synthase (C β S). The objective of this study was to identify the *CBS* mutations in Brazilian patients with HCU.

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Deutscher Akademischer Austauschdienst

Methods: gDNA samples were obtained for 35 patients (30 families) with biochemically confirmed diagnosis of HCU. All exons and exon-intron boundaries of *CBS* gene were sequenced. Gene expression analysis by qRT-PCR was performed in six patients. Novel missense point mutations were expressed in *E. coli* by site-directed mutagenesis.

Results: Parental consanguinity was reported in 16 families, and pyridoxine responsiveness in five (15%) patients. Among individuals from the same family, all presented the same phenotype. Both pathogenic mutations were identified in 29/30 patients. Twenty-one different mutations were detected in nine exons and three introns; being six common mutations. Most prevalent were p.Ile278Thr (18.2%), p.Trp323Ter (11.3%), p.Thr191Met (11.3%), and c.828+1G>A (11.3%). Eight novel mutations were found [c.2T>C, c.209+1delG, c.284T>C, c.329A>T, c.444delG, c.864_868delGAG, c.989_991delAGG, and c.1223+5G>T]. Enzyme activity in *E. coli*-expressed mutations was 1.5% for c.329A>T and 17.5% for c.284T>C. qRT-PCR analysis revealed reduced gene expression in all evaluated genotypes: [c.209+1delG; c.572C>T]; [c.2T>C; c.828+1G>A]; [c.828+1G>A; c.1126G>A]; [c.833T>C; c.989_991delAGG]; [c.1058C>T; c.146C>T]; and [c.444delG; c.444delG]. The expected phenotype according to the genotype (pyridoxine responsiveness) matched in all cases.

Conclusions: Most patients studied were pyridoxine nonresponsive and presented early manifestations, suggesting severe phenotypes. Many private mutations were observed, but the four most prevalent mutations together accounted for over 50% of mutated alleles. A good genotype–phenotype relationship was observed within families and for the four most common mutations.

KEYWORDS

classical homocystinuria, C β S deficiency, C β S expression, *CBS* mutations, homocysteine

1 | INTRODUCTION

Classical homocystinuria (HCU; OMIM 236200) is an inborn error of metabolism caused by deficient activity of cystathionine β -synthase (C β S; EC 4.2.1.22). This enzyme catalyzes the first step of the transsulfuration pathway, whereby homocysteine is condensed with serine to form cystathionine. C β S deficiency leads to significantly elevated plasma levels of homocysteine and methionine and low levels of cysteine. HCU is inherited in an autosomal recessive pattern, and its worldwide prevalence is estimated between 1:100,000 and 1:344,000 (Moorthie, Cameron, Sagoo, Bonham, & Burton, 2014; Mudd, Levy, & Skovby, 2001; Skovby, Gaustadnes, & Mudd, 2010).

From a clinical standpoint, the classical signs of the disease are lens dislocation, thromboembolism, intellectual disability, psychiatric disorders, osteoporosis, and marfanoid features (Mudd et al., 1985, 2001). The treatment strategies include supplementation of pyridoxine (C β S cofactor), folic/foinic acid, betaine, and a methionine-

restricted diet (Morris et al., 2016; Schiff & Blom, 2012). Usually, patients who respond to pyridoxine supplementation exhibit a milder phenotype and have a better prognosis (Mudd et al., 1985; Skovby et al., 2010).

The *CBS* gene is located on chromosome 21q22.3. It spans 23 exons, with exons 1–16 comprising the coding region, which encodes a 551-amino acid polypeptide. The 5'-UTR region of the gene is formed by one of five alternative exons (–1a to –1e), in addition to exon 0. The 3'-UTR region is encoded by exons 16 and 17 (Bao, Vlcek, Paces, & Kraus, 1998; Kraus et al., 1998). Over 160 different mutations in *CBS* have been reported, most of them being private. However, taken together, the four most prevalent mutations (p.Ile278Thr, p.Thr191Met, p.Gly307Ser, and p.Arg336Cys) account for more than half of all HCU alleles worldwide (Kraus, 2017). While the first of these mutations is panethnic, the other three follow rather well-demarcated geographic and ethnic distributions (Cozar et al., 2011; El-Said et al., 2006; Galagher et al., 1995; Porto et al., 2005; Shih et al., 1995;

Urreizti et al., 2006). The molecular bases of HCU in Brazil are poorly characterized. In the only study published (Porto et al., 2005), CBS analysis performed by RFLP and SSCP is reported for 14 patients (11 unrelated) followed in a single medical center located in southeast Brazil. The common mutations p.Ile278Thr and p.Thr191Met were detected at a frequency of 13.6% each.

A consistent genotype–phenotype correlation is described for some frequent mutations. For instance, p.Ile278Thr mutation is usually associated with milder phenotypes and pyridoxine responsiveness (Kraus, 2017; Shih et al., 1995). It is also reported that homozygotes for this mutation may have a higher risk of developing thromboembolism instead of other HCU symptoms (Magner et al., 2011; Skovby et al., 2010). Patients carrying the Latin/Iberian p.Thr191Met mutation are usually nonresponsive to pyridoxine, but a great variability of severity and clinical symptoms can be observed (Cozar et al., 2011; Urreizti et al., 2006).

The present study sought to establish a broad genetic characterization of HCU in Brazil, performing CBS analysis in HCU patients that are being followed at several centers nationwide.

2 | METHODS

The present study was approved by the local research ethics committee (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil). Collection procedures were conducted only after participants/legal guardians had agreed to take part in the investigation and provided written informed consent. To be included in the study, the patient should have been previously diagnosed as having HCU according to the following criteria: (1) presence of high levels of homocysteine in plasma; (2) presence of normal or high levels of methionine in plasma; AND (3) presence of clinical picture compatible with HCU. As public neonatal screening for HCU is not available in Brazil, all patients were late diagnosed (e.g., diagnosed after the starting of clinical manifestations).

2.1 | Patients

The study sample comprised of 35 Brazilian HCU patients, from 30 different families. Families from 4/5 regions of Brazil were represented: south ($n = 12$), southeast ($n = 11$), northeast ($n = 6$), and midwest ($n = 1$) (Table 1). In addition, RNA samples were obtained from six patients. In 10 families, the genetic variant(s) found in the probands were also confirmed in at least one parent.

Patients were recruited through contact with physicians involved in care and/or research activities at medical genetics centers across the country. Overall, 13 medical centers participated in the study. Some patients have been followed in different medical centers in Brazil and even abroad throughout their lives. Thus, it may be possible that they might have been or will be studied and described elsewhere. To the best of our knowledge, however, only one patient in our sample (patient #30) might have been already described in the CBS mutation database (Kraus, 2017), although no clinical data is available there.

Pyridoxine responsiveness was the clinical parameter used to evaluate genotype–phenotype relationship. For the purposes of this study, patients were classified as responsive if they achieved target homocysteine levels ($<100 \mu\text{mol/L}$) on pyridoxine alone or pyridoxine + folic acid (regardless of the number of weeks since testing) (Morris et al., 2016). All other patients were classified as nonresponsive to pyridoxine. The genotypes found were compared with other family members and with previously reported cases.

2.2 | CBS sequencing

Genomic DNA was extracted from whole blood using the commercially available Easy-DNA™ gDNA Purification Kit (Invitrogen), following manufacturer instructions. Exons 1–14 and 16 and the exon/intron junctions of the CBS were amplified by conventional PCR, using primers and reaction conditions previously described elsewhere (Kruger, Wang, Jhee, Singh, & Elsas, 2003). The following primers were designed to amplify exon 15: forward, CCA CAGGAAGAGTTGGGAGG; reverse, TGAGAGCCATTC TGAGGGGT. After amplification, fragments were purified and sequenced by the Sanger method. The sequence found was compared to the GenBank reference sequence (NG_008938.1). Any mutations identified were confirmed by repetition of amplification and sequencing reactions. Furthermore, parental DNA was used whenever available to confirm that mutations were in *trans* position.

Missense mutations not previously described in the literature were analyzed *in silico* in the PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping), MutPred, and SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) software. In addition, a group of 100 controls were tested for the novel c.2T>C (exon 1), c.284T>C (exon 2), and c.329A>T (exon 3) mutations and for the previously described c.828+1G>A mutation (intron 7). Testing for c.2T>C was performed by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method with the *NlaIII* restriction enzyme, whereas the other mutations were analyzed by sequencing of the mutation-containing exon.

TABLE 1 CBS analysis—pathogenic mutations found in patients with classical homocystinuria (*n* = 35)

Patient	Sex	Origin (Brazilian region)	Allele 1		Allele 2		Cons.	Age at inclusion (years)	Age of onset (years)	B6 response found	B6 response expected ^a
			cDNA	Protein	cDNA	Protein					
1a	M	S	c.253G>A ^c	p.Gly85Arg	c.253G>A	p.Gly85Arg	Y	36	6	N	N
1b	F	S	c.253G>A ^c	p.Gly85Arg	c.253G>A	p.Gly85Arg	Y	27	NA	N	N
1c	F	S	c.253G>A ^c	p.Gly85Arg	c.253G>A	p.Gly85Arg	Y	31	7	N	N
2	M	S	c.833T>C	p.Ile278Thr	c.833T>C	p.Ile278Thr	Y	35	0.2	Y	Y
3	M	S	c.833T>C	p.Ile278Thr	c.833T>C	p.Ile278Thr	N	35	7	Y	Y
4	F	SE	c.833T>C ^c	p.Ile278Thr	c.833T>C ^d	p.Ile278Thr	Y	18	15	Y	Y
5	M	SE	c.833T>C	p.Ile278Thr	c.28delG	p.Val10 fs	N	26	1	Y	Y/N ^b
6	M	SE	c.833T>C	p.Ile278Thr	c.451G>A	p.Gly151Arg	N	23	4	Y	Y/N ^b
7	F	S	c.833T>C	p.Ile278Thr	c.989_991delAGG	p.(Glu330del)	N	28	20	N	Y/N ^b
8	M	NE	c.833T>C	p.Ile278Thr	c.828+1G>A	p.?	N	16	4	N	N ^b
9	F	S	c.828+1G>A ^c	p.?	c.1126G>A	p.Asp376Asn	N	23	5	N	N ^b
10	M	SE	c.828+1G>A ^d	p.?	c.2T>C^c	p.?	N	13	1	N	N ^b
11	F	S	c.828+1G>A	p.?	c.691G>C	p.Ala231Leu	N	13	1	N	N ^b
12	M	NE	c.828+1G>A	p.?	c.828+1G>A	p.?	Y	8	1	N	N ^b
13	M	SE	c.572C>T	p.Thr191Met	c.572C>T	p.Thr191Met	Y	26	19	N	N
14	M	SE	c.572C>T	p.Thr191Met	c.572C>T	p.Thr191Met	Y	10	5	N	N
15	F	S	c.572C>T	p.Thr191Met	c.572C>T	p.Thr191Met	Y	18	5	N	N
16	M	SE	c.572C>T	p.Thr191Met	c.572C>T	p.Thr191Met	Y	19	4	N	N
17	M	S	c.572C>T	p.Thr191Met	c.209+1delG^c	p.?	N	14	8	N	N ^b
18a	M	SE	c.969G>A ^c	p.Trp323Ter	c.969G>A ^d	p.Trp323Ter	Y	17	6	N	NA
18b	M	SE	c.969G>A ^c	p.Trp323Ter	c.969G>A ^d	p.Trp323Ter	Y	6	1	N	NA
19	M	NE	c.969G>A	p.Trp323Ter	c.969G>A	p.Trp323Ter	N	15	1	N	NA
20	M	NE	c.969G>A	p.Trp323Ter	c.969G>A	p.Trp323Ter	N	10	7	N	NA
21a	M	SE	c.451G>A	p.Gly151Arg	c.451G>A	p.Gly151Arg	Y	15	7.5	N	N
21b	F	SE	c.451G>A	p.Gly151Arg	c.451G>A	p.Gly151Arg	Y	14	NA	N	N
22	F	SE	c.451G>A	p.Gly151Arg	c.451G>A	p.Gly151Arg	Y	17	3	N	N
23	M	S	c.284T>C^c	p.Ile95Thr	c.284T>C	p.Ile95Thr	Y	18	1	N	NA
24	M	S	c.1058C>T ^c	p.Thr353Met	c.146C>T	p.Pro49Leu	N	19	3	Y	Y ^b

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Patient	Sex	Origin (Brazilian region)	Allele 1		Allele 2		Protein	Cons.	Age at inclusion (years)	Age of onset (years)	B6 response found	B6 response expected ^a
			cDNA	Protein	cDNA	Protein						
25	F	S	c.1126G>A ^c	p.-Asp376Asn	c.1126G>A ^d	p.-Asp376Asn	Y	14	1.5	N	N	
26	M	S	c.444delG ^c	p.(Asn149fs)	c.444delG	p.(Asn149fs)	Y	22	1.5	N	NA	
27	M	NE	c.329A>T	p.Glu110Val	c.770C>T	p.Thr257Met	N	16	3	N	N ^b	
28a	F	NE	c.1223+5G>T	p.?	c.1223+5G>T	p.?	Y	5	3	NA	NA	
28b	F	NE	c.1223+5G>T	p.?	c.1223+5G>T	p.?	Y	7	3	NA	NA	
29	F	CW	c.864_868delGAG	p.(Glu289del)	c.864_868delGAG	p.(Glu289del)	Y	17	6	N	NA	
30	M	SE	c.209+1G>A	p.?	NI	NI	N	37	6	N	N ^b	

Novel mutations are set in bold. Patients represented by the same number belong to the same family. M, male; F, female; S, south; SE, southeast; NE, northeast; CW, central-west; Cons, consanguinity; Y, yes; N, no; B6, pyridoxine; NA, not available; NI, not identified.

^aAccording to previously described cases in the literature (Kraus, 2017), all partially responsive patients were considered as nonresponsive.

^bEstimated; no identical genotype reported previously.

^cMother heterozygous for mutation.

^dFather heterozygous for mutation.

2.3 | Homology modeling

Structural analyses were performed to investigate the structural and stability alteration of the novel coding *CBS* missense variants from the native CbS protein structure. The selected mutant models (c.284T>C; p.Ile95Thr and c.329A>T; p.Glu110Val) were generated using SWISS-MODEL and its automated server based on the target-template alignment using ProMod3. The crystal structure of the CbS protein was retrieved from the Protein Data Bank (PDB ID 4COO, resolution at 2 Å) (McCorvie et al., 2014). Coordinates which are conserved between the target and the template are copied from the template to the model. Finally, the geometry of the resulting model is regularized by using a force field. In case loop modeling with ProMod3 fails, an alternative model is built with PRO-MOD-II (Guex and Peitsch, 1997). The Swiss-PDB viewer (version 4.1.0) was utilized for energy minimization of the modeled 3D structure.

2.4 | qRT-PCR

For qRT-PCR analysis of gene expression, blood samples from six patients were collected into PAXgene tubes (Qiagen). RNA isolation was performed with the PAXgene Blood RNA kit (Qiagen) in accordance with manufacturer instructions. cDNA was then synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). *CBS* mRNA levels were determined by qRT-PCR using the commercially available *TaqMan Expression Assay* (Hs00163925_m1 (*CBS*); Hs02758991_g1 (*GAPDH*); and (Applied Biosystems) in a StepOne system (Applied Biosystems). *GAPDH* was used as the housekeeping gene. All reactions were performed under the conditions specified in the corresponding manufacturer instructions. Relative quantification of *CBS* RNA was normalized to the *GAPDH* gene using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Schmittgen & Livak, 2008).

2.5 | Expression of mutations in *E. coli*

The novel mutations c.284T>C and c.329A>T were expressed in *E. coli* using a protocol adapted after Mendes et al., (2014), as described below.

For expression of wild-type (WT) and mutant CβS, WT cDNA was first cloned in pOTB7 vector (Thermo Scientific, Lafayette, CO, USA), between restriction sites EcoRI and XhoI. The insert was then cleaved with NdeI and XhoI, purified (QIAquick gel extraction kit, Qiagen), and ligated into pET28b (Clontech Laboratories), at the same sites, with T4 DNA ligase (New England Biolabs). The pET28b carries an N-terminal 6xHis-tag, followed by a thrombin cleavage site which enables later removal of this tag. The pET28b-6xHis-pepT-hCBSWT expression construct was thus created

and used as a template for site-directed mutagenesis with the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies), per manufacturer instructions.

WT and mutant C β S proteins were expressed in *E. coli* (BL21 DE3). Cells without the expression vector and cells harboring an empty expression vector were used as negative controls. Cells were cultured at 37°C in LB medium and selected with kanamycin. Protein expression was induced by adding isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) and δ -aminolevulinic acid (ALA) to the medium. After 16 hr at 22°C, bacteria were resuspended in lysis buffer and sonicated. The insoluble (pellet) and soluble (supernatant) fractions were separated by centrifugation.

The proteins thus generated were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Briefly, the protein content of the pellet fraction was quantitated by the Bradford method. Then, a 60- μ g aliquot of protein was analyzed by SDS-PAGE. The same amount was used for Western blot analysis. This was performed using PVDF membranes, primary mouse anti-C β S polyclonal antibody (Abnova, A75-A01), and secondary polyclonal rabbit anti-His tag antibody (PAB0862, Abnova). The enzyme activity of C β S was determined by LC-MS/MS in the soluble fraction of the lysate, using the protocol described by Smith et al., (2012). All experiments were performed in triplicate, with the arithmetic mean of the resulting measurements considered for analysis.

2.6 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows, Version 18.0 (Chicago: SPSS Inc). Asymmetrically distributed variables were expressed as median (range), and normally distributed variables as mean and standard deviation. The Mann–Whitney *U* test (continuous variables) or chi-square test (categorical variables) was used to assess between-group differences. *p*-values <.05 were considered significant. To calculate allele frequencies, only unrelated patients were considered (*n* = 30), and when consanguinity was reported, only one allele per patient was taken into account.

3 | RESULTS

The summary of the clinical and genetic data of the sample is shown in Table 1.

Of the 35 patients included, 22 (63%) were male. Parental consanguinity was reported in 16 families (53%). Median age at inclusion was 19 years (range 5–37 years). Regarding pyridoxine responsiveness, 28 patients (85%) were classified as nonresponsive and five (15%) as responsive, with three of them homozygous for the p.Ile278Thr mutation (patients 4, 5, and 6). In two patients, pyridoxine responsiveness was not reported/determined. The median age of symptom onset was 4 years (Table 1).

3.1 | Genotype

Twenty-one different mutations were detected, with six recurrent (Figure 1). Regarding the type, most mutations were missense (*n* = 11, nine transitions and two transversions), followed by splicing site (*n* = 4), small deletions (*n* = 2), frameshift (*n* = 2) and nonsense (*n* = 1).

Exons 8, 9, 7, 5, and 3 had the higher number of nonrelated alleles mutated (*n* = 9, 7, 6, 5, and 5, respectively). Altogether, the most prevalent mutations were: p.Ile278Thr (allele frequency 18.2%; found in south, southeast, and northeast regions), p.Trp323Ter (allele frequency 11.3%; found in southeast and northeast), p.Thr191Met (allele frequency 11.3%; found in south and southeast), and c.828+1G>A (allele frequency 11.3%; found in south, southeast, and northeast). In only one allele no mutation could be identified (patient 30; Table 1). Eight novel mutations were detected: c.2T>C (exon 1), c.209+1delG (intron 1), c.284T>C (p.Ile95Thr, exon 2), c.329A>T (p.Glu110Val, exon 3), c.444delG (exon 3), c.864_868delGAG (exon 8), c.989_991delAGG (exon 9), and c.1223+5G>T (intron 11). No mutant alleles were detected in the 100 controls tested.

3.2 | Genotype versus phenotype relationship

When available in the literature, the expected phenotype according to the genotype (responsive or nonresponsive to

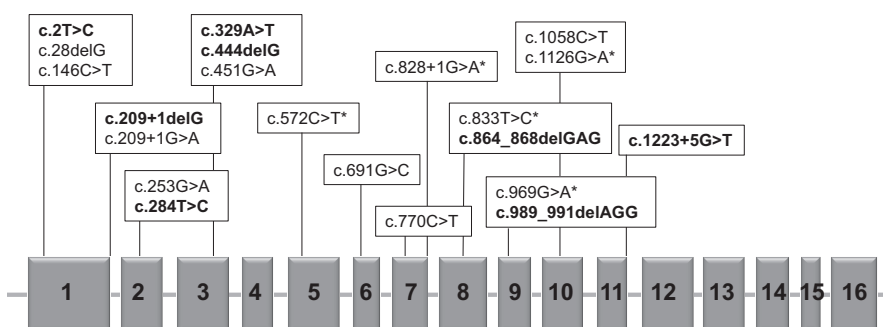
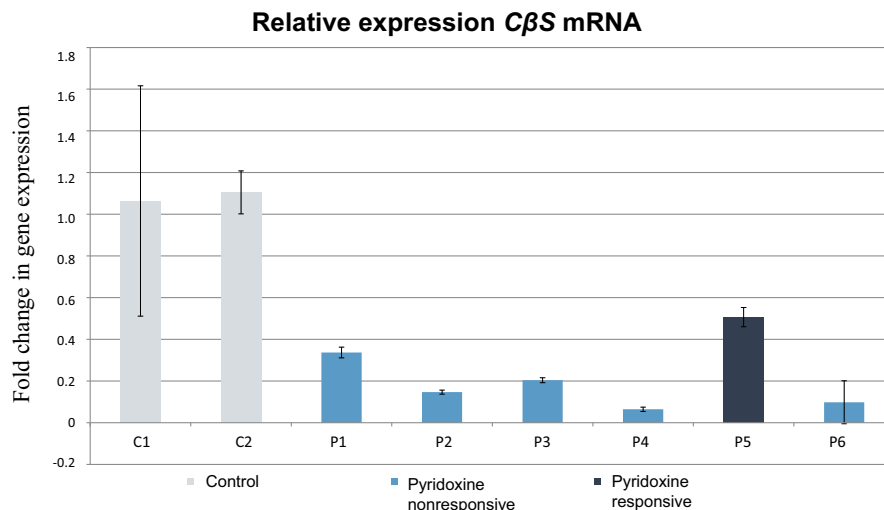


FIGURE 1 CBS map showing the location of the mutations found. Exons are represented by solid gray boxes. Novel mutations are shown in bold. An asterisk (*) indicates mutations found in more than one unrelated patient. Adapted from Kraus, 2017 (Kraus, 2017)

FIGURE 2 CBS mRNA expression as determined by qRT-PCR. Genotypes: P1 (c.209+1delG; c.572C>T); P2 (c.2T>C; c.828+1G>A); P3 (c.828+1G>A; c.1126G>A); P4 (c.833T>C; c.989_991delAGG); P5 (c.1058C>T; c.146C>T); and P6 (c.444delG; c.444delG). Fold change in gene expression is calculated through the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, where $\Delta C_T = (C_{T,Time\ x} - C_{T,Time\ 0})$ (Schmittgen & Livak, 2008)



pyridoxine) matched in all cases the observed phenotypes (Table 1).

All patients from the same family (1, 18, 21, and 28) presented the same phenotype regarding pyridoxine responsiveness. All homozygous for the p.Ile278Thr mutation ($n = 3$) were pyridoxine responsive. In the compound heterozygous ($n = 3$), association with another missense mutation (p.Gly151Arg) resulted in pyridoxine responsiveness in patient #6, while patients #7 and #8, carrying the mutations c.989_991delAGG and c.828+1G>A, were nonresponsive.

Most patients (4/5) carrying the p.Thr191Met mutation were homozygous, and all five were nonresponsive to pyridoxine. Patient #17 is heterozygous for the p.Thr191Met and the novel c.209+1delG mutation.

Patients carrying the c.828+1G>A were also nonresponsive to pyridoxine. Most of them (4/5) were compound heterozygous, and 3/4 carried a missense mutation in the second allele. Patients carrying the p.Trp323Ter mutation ($n = 4$) were all homozygous and nonresponsive to pyridoxine.

3.3 | In silico analysis

The p.Ile95Thr and p.Glu110Val mutations were analyzed in the PolyPhen-2 and SIFT software for prediction of functional effects, and both were predicted to be pathogenic (PolyPhen-2: scores of 0.999 and 1.000, respectively; SIFT: score of 0 for both mutations). The MutPred software suite, which estimates potential changes in mutant proteins, interpreted both mutations as probably damaging, with scores of 0.827 for p.Ile95Thr and 0.892 for p.Glu110Val.

In the crystal structure of the human CbS enzyme, Glu110 and Ile95 residues are located in the catalytic domain and have a predicted severe effect. Ile95 is a conserved residue located in the H3 of the catalytic domain near the dimers interface (Figs S1 and S2); its main interactions are with Phe99 and Lys98 residues located in the same helix and Glu342 located in the H14. The alignment

of the structure of the mutant model I95T with the CbS protein structure (PDB:4COO) showed no alteration of the original interactions of Ile95 in the monomers (Fig. S1). Glu110 is located in the H4 near to a highly conserved position surrounding the cofactor pyridoxal 5-phosphate (PLP). Glu110 form hydrogen bonds with the following residues: Thre87 located next to the strand A, Asn113 located in a beta turn, and Arg121 located in the H5. Salt bridge is observed with Lys108 and Arg121 residues. The central part of the dimer interface is formed by the residues Phe111 and Phe112 close to the twofold dimer axis; thus, Phe112 of monomer A interacts with Phe112 of monomer B and vice versa (Meier et al., 2001). The side chain of the Thr87 is part of the dimer interface. Alignment of the mutant model Glu110V with 4COO showed a loss of interaction with the Thr87 (Figs S1 and S2).

3.4 | Expression studies

Enzyme activity in the *E. coli*-expressed mutant proteins in relation to the WT control was 1.5% (24.7 nmol/h/mg protein) for c.329A>T (p.Glu110Val) and 17.5% (432.6 nmol/h/mg protein) for c.284T>C (p.Ile95Thr). Relative CBS mRNA levels measured by qRT-PCR in six patients are described in Figure 2. Reduced expression was observed in all, with the highest expression level detected in the sole pyridoxine-responsive patient (P24).

4 | DISCUSSION

The present report provides the largest genetic analysis of Brazilian HCU patients reported so far. The CBS gene was sequenced for 35 patients (30 unrelated) followed in 13 medical genetics centers across Brazil. Age of symptom onset varied considerably within the sample. However, more than half of the patients presented symptoms at an

early age (<5 years old), suggesting more severe forms of HCU in these patients. All patients included in the study have had delayed diagnosis, based mainly on clinical suspicion. This is partially explained by the fact that, in Brazil, HCU is not included in the National Neonatal Screening Program.

A high proportion of pyridoxine-nonresponsive HCU was observed in the study population. Nonresponsiveness to pyridoxine is associated with a more severe phenotype and challenging management (Mudd et al., 1985, 2001; Wilcken, 2006). In our study, this proportion exceeded rates described worldwide (approximately 50%) (Mudd et al., 2001). Although the proportion of nonresponsive patients is also high in some countries, such as Qatar and Ireland, these cases are associated with specific genotypes that are highly prevalent in the corresponding countries (El-Said et al., 2006; Gallagher et al., 1995). No such association was observed in our study. In fact, the most prevalent mutation in our sample (p.Ile278Thr) is a pyridoxine-responsive mutation. These findings may suggest that milder, pyridoxine-responsive forms of HCU remain largely underdiagnosed in Brasil.

Great variability in genotypes was observed in the present study. The Brazilian population is characterized by extraordinary genetic diversity as a result of centuries of admixture among Amerindians, European colonizers, and African slaves (IBGE, 2007). European ancestry has the higher contribution to the genetic background of Brazilians (0.62), followed by African (0.21) and Amerindian (0.17) (Moura, Coelho, Balbino Vde, Crovella, & Brandao, 2015). However, major regional differences exist: European contributions are even more dominant in the south of the country, whereas the northeast and north regions have the highest proportions of African and indigenous ancestry, respectively (Moura et al., 2015; Ruiz-Linares et al., 2014). This might contribute to the wide range of genotypes found. In our study, all frequent mutations found were detected in at least two different regions of Brazil, which does not support the hypothesis that they could have arisen through a founder effect.

The most prevalent mutation in our study was the p.Ile278Thr (c.833T>C). This is also the most prevalent mutation worldwide, accounting for 16% of all HCU alleles described (Kraus, 2017). It is particularly frequent in central and northern Europe (Kluijtmans et al., 1999; Sebastio et al., 1995; Shih et al., 1995; Sokolova et al., 2001; Sperandio et al., 1995). In the Brazilian study conducted by Porto et al., this mutation was detected in 6 of 28 alleles (frequency in unrelated alleles, 13.6%) (Porto et al., 2005). Since patients carrying this mutation can exhibit very mild or isolated symptoms later in life, it is possible that the prevalence of this mutation in Brazil is even higher, and that many HCU patients may remain

undiagnosed. In the present study, most patients harboring this mutation were pyridoxine responsive (4/6), with the two patients classified as nonresponsive being compound heterozygous carrying more severe mutations in the second allele. Although less frequent, several other cases of pyridoxine-nonresponsive patients carrying the p.Ile278Thr mutation are described (Kluijtmans et al., 1999; Kraus, 2017; Porto et al., 2005).

The Iberian mutation p.Thr191Met (c.572C>T) was found in 11.3% of unrelated alleles, again all in patients from the south and southeast regions. This allele frequency was similar to that reported by Porto et al. (13.64%) (Porto et al., 2005), but lower than those reported in other Latin American countries (75% in Colombia, 25% in Venezuela, and 20% in Argentina) and in the Iberian Peninsula (52% in Spain and 33% in Portugal) (Bermudez et al., 2006; Cozar et al., 2011; Urreizti et al., 2003). These findings appear to reflect the greater genetic heterogeneity of Brazil as compared with other Latin American countries and, possibly, the more limited contribution of Spanish immigration to Brazil (IBGE, 2007; Kehdy et al., 2015; Pena et al., 2011; Resque et al., 2016). Wide phenotypic variability has been observed for this mutation, with mild to severe phenotypes and pyridoxine responsiveness ranging from partial to absent (Kraus, 2017; Urreizti et al., 2006).

The c.828+1G>A mutation, detected in 11.3% of the alleles in our studies, had previously been described in only one individual, a heterozygous Czech patient [c.1146-2A>C; c.828+1G>A] (Janosik et al., 2001). Their patient was described as pyridoxine nonresponsive and had null CβS activity in fibroblasts. Furthermore, there was no mRNA expression of the allele containing the mutation. According to the authors, this suggests a nonsense-mediated mRNA decay mechanism, as a premature termination codon at exon 8 has been predicted for this mutation (Janosik et al., 2001). In our study, all patients with this mutation were classified as nonresponsive. One patient heterozygous for (c.828+1G>A; c.1126G>A) underwent qRT-PCR analysis, which showed a ~80% reduction in mRNA expression. Our clinical data support the severity of this mutation. In our sample, all patients carrying the c.828+1G>A presented early symptom onset (≤5 years) and were all nonresponsive to pyridoxine, even the compound heterozygous. The high prevalence of this mutation in Brazilian patients does not appear to be related to genetic drift effects, as the affected patients came from three geographically distant regions of the country. Furthermore, this mutation was not detected in any of the 100 healthy controls, and thus appears to be rare in the overall population.

The p.Trp323Ter (c.969G>A) mutation was also detected with an allele frequency of 11.3%. This mutation is highly prevalent in Saudi Arabia (10 of 13 families assessed) and is associated with severe phenotypes (Zaidi

et al., 2012). In our study, all patients with this mutation were homozygous and pyridoxine nonresponsive. These families were from the northeast and southeast regions of Brazil. As there was no determination of ancestry in our study, we could not infer whether the presence of this mutation in Brazilian patients might be associated with migratory events.

Eight novel mutations were detected in this study. Several tests corroborated the pathogenicity of the analyzed missense mutations. In silico analyses using three different software programmes predicted a damaging functional effect for the mutations p.Glu110Val and p.Ile95Thr. Furthermore, no allele containing these mutations was detected in 100 controls. *E. coli* expression assays demonstrated reduced enzyme activity consistent with pathogenicity for HCU of both mutations (<20% activity relative to controls) (Arruda et al., 1998; Picker & Levy, 2014). Enzyme activity in *E. coli* also correlated well with clinical phenotype (pyridoxine responsiveness and disease severity).

Homology modeling of the p.Ile95Thr mutation showed no alteration of the original interactions of Ile95 in the monomers. However, the loss of hydrophobicity due to the substitution of Ile to Thr may affect the hydrophobic character of the dimer interface. This could explain the lack of residual activity of the mutant in the protein extract. Analysis of protein oligomerization and CBS enzyme activity of the purified mutant protein could provide more information to confirm the structural predictions.

For the p.Glu110Val mutation, structural analyses showed that the substitution of Glu to Val may disturb the ionic interactions due to the charge difference of the Glu (negative) and Val (neutral). Furthermore, the size and the hydrophobicity difference may affect the hydrogen bond formation with the surrounded residues remaining just the interaction with Asn113 and Lys1083.

The c.2T>C mutation alters the translation start site codon, being the first of its kind ever described in CBS (Kraus, 2017). This mutation was not detected in the 100 controls we tested and not found in the 1000 genomes database (<http://www.1000genomes.org/>). Start-site missense mutations are relatively common in hereditary diseases; in fact, point mutations at this position are more likely to be damaging than other missense mutations (Wolf et al., 2011). In CBS, the next ATG codon is located in exon 2, far from the first methionine codon. However, exon 1 carries a leucine at position 28 with a flanking sequence that approximates the “Kozak consensus sequence,” a specific flanking sequence that maximizes translational efficiency (Kozak, 2002; Wolf et al., 2011). This suggests that this CTG codon could be used as an alternative initiation codon in CBS.

Finally, qRT-PCR analysis of samples from four patients heterozygous for the novel c.2T>C, c.209+1delG, c.989_991delAGG, and c.444delG mutations revealed

major reductions in mRNA levels relative to controls, which suggests reduced gene expression in the presence of these variants. This reduction is greater in patients with splice-site mutations, which disrupt reading, as premature termination codons are encoded in the mutant sequence; therefore, mRNA decay pathways eventually degrade the product of expression. Our findings were also consistent with the most severe phenotypes being found in patients with greater reductions in mRNA levels.

In general, the genotypes were consistently associated with pyridoxine responsiveness (presence or absence) within families and also agreed with previous findings worldwide (Janosik et al., 2001; Kraus, 2017; Zaidi et al., 2012). However, it is important to highlight that no clear genotype–phenotype correlation is established for most CBS mutations. The lack of clinical data in many studies, varied pyridoxine responsiveness protocols, and the high number of private/rare mutations in CBS are some of the factors that limit this analysis.

In our study, 72% of the mutated alleles were condensed in just five exons. Considering this finding, we propose a protocol for CBS sequencing that would be cost- and time-saving for the molecular investigation of new Brazilian HCU patients. We suggest that exons 8, 9, 7, 5, and 3 are sequenced first, since they carried the great majority of mutated alleles found in our sample. Second, exons 1, 2, 4, 10, 11, 12, and 16 should be tested. In our study, 10 different mutations were found there, and a great number of mutations reported worldwide are also located in these exons. We suggest that exons 6, 13, 14, and 16 are sequenced last, since mutations in these regions are rare. No disease-causing mutation has been reported in exon 15 (Kraus, 2017).

In conclusion, this study provides the most wide-ranging genetic characterization of HCU in Brazil to date. Most patients studied here were nonresponsive to pyridoxine and presented clinically early in life, suggesting more severe forms of HCU in our sample. A great variability in genotypes was observed; this might reflect the intense admixture and the diverse genetic background of the Brazilian population. The four most prevalent mutations together accounted for over 50% of mutated alleles. A consistent genotype–phenotype association was observed within families and for common mutation. However, for many rare and novel mutations described here, additional studies should be carried to evaluate the effect of these variants on human CBS deficiency. These findings should contribute to the development of protocols for diagnosis and molecular screening of HCU in Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Prof. Roberto Giugliani and Rede EIM Brasil for their assistance with patient diagnosis and

follow-up. Financial support for this study was provided by CNPq, CAPES, DAAD, and FIPE-HCPA. I. Schwartz is a National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) research productivity fellow.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Ida Vanessa D. Schwartz  <http://orcid.org/0000-0002-7933-6687>

REFERENCES

- Arruda, V. R., Siqueira, L. H., Goncalves, M. S., von Zuben, P. M., Soares, M. C., Menezes, R., ... Costa, F. F. (1998). Prevalence of the mutation C677 → T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *American Journal of Medical Genetics*, 78, 332–335. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1096-8628](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1096-8628)
- Bao, L., Vlcek, C., Paces, V., & Kraus, J. P. (1998). Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase mRNA isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 350, 95–103. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0486>
- Bermudez, M., Frank, N., Bernal, J., Urreiziti, R., Briceno, I., Merinero, B., ... Kraus, J. P. (2006). High prevalence of CBS p. T191M mutation in homocystinuric patients from Colombia. *Human Mutation*, 27, 296. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1098-1004](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1098-1004)
- Cozar, M., Urreiziti, R., Vilarinho, L., Grosso, C., Dodelson de Kremer, R., Asteggiano, C. G., ... Balcells, S. (2011). Identification and functional analyses of CBS alleles in Spanish and Argentinian homocystinuric patients. *Human Mutation*, 32, 835–842. <https://doi.org/10.1002/humu.21514>
- El-Said, M. F., Badii, R., Bessisso, M. S., Shahbek, N., El-Ali, M. G., El-Marikhie, M., ... Zschocke, J. (2006). A common mutation in the CBS gene explains a high incidence of homocystinuria in the Qatari population. *Human Mutation*, 27, 719. <https://doi.org/10.1002/humu.v27:7>
- Gallagher, P. M., Ward, P., Tan, S., Naughten, E., Kraus, J. P., Sellar, G. C., ... Whitehead, A. S. (1995). High frequency (71%) of cystathionine beta-synthase mutation G307S in Irish homocystinuria patients. *Human Mutation*, 6, 177–180. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1098-1004](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1098-1004)
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>
- IBGE (2007). *Brasil: 500 anos de povoamento*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Janosik, M., Oliveriusova, J., Janosikova, B., Sokolova, J., Kraus, E., Kraus, J. P., & Kozich, V. (2001). Impaired heme binding and aggregation of mutant cystathionine beta-synthase subunits in homocystinuria. *American Journal of Human Genetics*, 68, 1506–1513. <https://doi.org/10.1086/320597>
- Kehdy, F. S., Gouveia, M. H., Machado, M., Magalhaes, W. C., Hori-moto, A. R., Horta, B. L., ... Tarazona-Santos, E. (2015). Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 8696–8701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504447112>
- Kluijtmans, L. A., Boers, G. H., Kraus, J. P., van den Heuvel, L. P., Cruysberg, J. R., Trijbels, F. J., & Blom, H. J. (1999). The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Dutch patients with homocystinuria: Effect of CBS genotype on biochemical and clinical phenotype and on response to treatment. *American Journal of Human Genetics*, 65, 59–67. <https://doi.org/10.1086/302439>
- Kozak, M. (2002). Emerging links between initiation of translation and human diseases. *Mammalian Genome*, 13, 401–410. <https://doi.org/10.1007/s00335-002-4002-5>
- Kraus, J. P. (2017). CBS mutation database main page. Retrieved from <http://cbs.lf1.cuni.cz/>
- Kraus, J. P., Oliveriusova, J., Sokolova, J., Kraus, E., Vlcek, C., de Franchis, R., ... Kozich, V. (1998). The human cystathionine beta-synthase (CBS) gene: Complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms. *Genomics*, 52, 312–324. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5437>
- Kruger, W. D., Wang, L., Jhee, K. H., Singh, R. H., & Elsas, L. J. 2nd (2003). Cystathionine beta-synthase deficiency in Georgia (USA): Correlation of clinical and biochemical phenotype with genotype. *Human Mutation*, 22, 434–441. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1098-1004](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1098-1004)
- McCorvie, T. J., Kopec, J., Hyung, S. J., Fitzpatrick, F., Feng, X., Termine, D., ... Yue, W. W. (2014). Inter-domain communication of human cystathionine β-synthase: structural basis of S-adenosyl-L-methionine activation. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 36018–36030. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.610782>
- Magner, M., Krupkova, L., Honzik, T., Zeman, J., Hyanek, J., & Kozich, V. (2011). Vascular presentation of cystathionine beta-synthase deficiency in adulthood. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34, 33–37. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9146-y>
- Meier, M., & Burkhard, P. (2001). Structure of human cystathionine β-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *The EMBO Journal*, 20, 3910–3916. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.3910>
- Mendes, M. I., Colaco, H. G., Smith, D. E., Ramos, R. J., Pop, A., van Dooren, S. J., ... Blom, H. J. (2014). Reduced response of Cystathionine Beta-Synthase (CBS) to S-Adenosylmethionine (SAM): Identification and functional analysis of CBS gene mutations in Homocystinuria patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37, 245–254. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9647-6>
- Moorthie, S., Cameron, L., Sagoo, G. S., Bonham, J. R., & Burton, H. (2014). Systematic review and meta-analysis to estimate the birth prevalence of five inherited metabolic diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37, 889–898. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9729-0>
- Morris, A. A. M., Kozich, V., Santra, S., Andria, G., Ben-Omran, T. I. M., Chakrapani, A. B., ... Chapman, K. A. (2016). Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 40, 1–26.
- Moura, R. R., Coelho, A. V., Balbino Vde, Q., Crovella, S., & Brandao, L. A. (2015). Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *American*

- Journal of Human Biology*, 27, 674–680. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22714>
- Mudd, S., Levy, H., & Skovby, F. (2001). Disorders of transulfuration. In C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly & D. Valle (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (pp. 2007–2056). New York, NY, USA: McGraw-Hill Professional.
- Mudd, S. H., Skovby, F., Levy, H. L., Pettigrew, K. D., Wilcken, B., Pyeritz, R. E., ... Schweitzer, L. (1985). The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 37, 1–31.
- Pena, S. D., Di Pietro, G., Fuchshuber-Moraes, M., Genro, J. P., Hutz, M. H., Kehdy Fde, S., ... Suarez-Kurtz, G. (2011). The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE*, 6, e17063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>
- Picker, J. D., & Levy, H. L. (2014). Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: Pagon, RA, Adam, MP, Ardinger, HH, Wallace, SE, Amemiya, A, Bean, LJH, Bird, TD, Fong, CT, Mefford, HC, Smith, RJH, Stephens, K, editors. GeneReviews(R). Seattle (WA): University of Washington, SeattleUniversity of Washington, Seattle. All rights reserved.
- Porto, M. P., Galdieri, L. C., Pereira, V. G., Vergani, N., da Rocha, J. C., Micheletti, C., ... Almeida, V. D. (2005). Molecular analysis of homocystinuria in Brazilian patients. *Clinica Chimica Acta*, 362, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.030>
- Resque, R., Gusmao, L., Geppert, M., Roewer, L., Palha, T., Alvarez, L., ... Santos, S. (2016). Male lineages in Brazil: Intercontinental admixture and stratification of the European background. *PLoS ONE*, 11, e0152573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152573>
- Ruiz-Linares, A., Adhikari, K., Acuna-Alonzo, V., Quinto-Sanchez, M., Jaramillo, C., Arias, W., ... Gonzalez-Jose, R. (2014). Admixture in Latin America: Geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genetics*, 10, e1004572. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004572>
- Schiff, M., & Blom, H. J. (2012). Treatment of inherited homocystinurias. *Neuropediatrics*, 43, 295–304.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Sebastio, G., Sperandeo, M. P., Panico, M., de Franchis, R., Kraus, J. P., & Andria, G. (1995). The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *American Journal of Human Genetics*, 56, 1324–1333.
- Shih, V. E., Fringer, J. M., Mandell, R., Kraus, J. P., Berry, G. T., Heidenreich, R. A., ... Ramesh, V. (1995). A missense mutation (I278T) in the cystathionine beta-synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype. *American Journal of Human Genetics*, 57, 34–39.
- Skovby, F., Gaustadnes, M., & Mudd, S. H. (2010). A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.09.009>
- Smith, D. E., Mendes, M. I., Kluijtmans, L. A., Janssen, M. C., Smulders, Y. M., & Blom, H. J. (2012). A liquid chromatography mass spectrometry method for the measurement of cystathionine beta-synthase activity in cell extracts. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies of Biomedical Life Science*, 911, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.10.041>
- Sokolova, J., Janosikova, B., Terwilliger, J. D., Freiberger, T., Kraus, J. P., & Kozich, V. (2001). Cystathionine beta-synthase deficiency in Central Europe: Discrepancy between biochemical and molecular genetic screening for homocystinuric alleles. *Human Mutation*, 18, 548–549. <https://doi.org/10.1002/humu.v18:6>
- Sperandeo, M. P., Panico, M., Pepe, A., Candito, M., de Franchis, R., Kraus, J. P., ... Sebastio, G. (1995). Molecular analysis of patients affected by homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: Report of a new mutation in exon 8 and a deletion in intron 11. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 18, 211–214. <https://doi.org/10.1007/BF00711769>
- Urreiziti, R., Asteggiano, C., Bermudez, M., Cordoba, A., Szlago, M., Grosso, C., ... Grinberg, D. (2006). The p. T191M mutation of the CBS gene is highly prevalent among homocystinuric patients from Spain, Portugal and South America. *Journal of Human Genetics*, 51, 305–313. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0362-0>
- Urreiziti, R., Balcells, S., Rodes, M., Vilarinho, L., Baldellou, A., Couce, M. L., ... Grinberg, D. (2003). Spectrum of CBS mutations in 16 homocystinuric patients from the Iberian Peninsula: High prevalence of T191M and absence of I278T or G307S. *Human Mutation*, 22, 103. <https://doi.org/10.1002/humu.9153>
- Wilcken, B. (2006). Disorders of sulfur amino acid metabolism. In G. F. Blau Hoffmann, J. V. Leonard & J. T. R. Clarke (Eds.), *Physician's guide to the treatment and follow-up of metabolic diseases* (pp. 105–115). Heidelberg: Springer Berlin. <https://doi.org/10.1007/3-540-28962-3>
- Wolf, A., Caliebe, A., Thomas, N. S., Ball, E. V., Mort, M., Stenson, P. D., ... Cooper, D. N. (2011). Single base-pair substitutions at the translation initiation sites of human genes as a cause of inherited disease. *Human Mutation*, 32, 1137–1143. <https://doi.org/10.1002/humu.21547>
- Zaidi, S. H., Faiyaz-Ul-Haque, M., Shuaib, T., Balobaid, A., Rahbeeni, Z., Abalkhail, H., ... Al-Owain, M. (2012). Clinical and molecular findings of 13 families from Saudi Arabia and a family from Sudan with homocystinuria. *Clinical Genetics*, 81, 563–570. <https://doi.org/10.1111/cge.2012.81.issue-6>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Poloni S, Sperb-Ludwig F, Borsatto T, et al. CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: A study based on the analysis of 35 Brazilian Classical Homocystinuria patients. *Mol Genet Genomic Med*. 2017;00:1–11. <https://doi.org/10.1002/mgg3.342>

Apêndice 2 - Artigo publicado no Molecular Genetics and Metabolism Reports, 2018:
"Cytokines levels in late-diagnosed Classical Homocystinuria patients"



Correspondence

Cytokines levels in late-diagnosed Classical Homocystinuria patients



ARTICLE INFO

Keywords:

Classical homocystinuria
CBS deficiency
Inflammation
Cytokines

Classical homocystinuria (HCU; CBS deficiency) is characterized by a blockage in homocysteine (Hcy) degradation, resulting in Hcy and methionine accumulation and cysteine deficiency. Studies in healthy and chronically ill individuals have found positive associations between proinflammatory cytokines and plasma total homocysteine (tHcy) [1–3], suggesting a role for immunomodulation in HCU pathogenesis. Therefore, we aimed to investigate 20 inflammatory cytokines in plasma of poorly controlled HCU patients and healthy controls.

The study sample comprised 9 late-diagnosed HCU patients and 10 age and gender-matched healthy controls from South Brazil. tHcy, cysteine, methionine, S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH) were measured in plasma by LC-MS/MS. The cytokines quantification assay was performed through EMD Millipore's MILLIPEX® MAP Human Cytokine kit, accordingly manufacturer's instruction. All samples were measured in duplicates for 20 cytokines (Table 1). Measurements with divergence $\geq 30\%$ between duplicates

Table 1
Homocysteine-related metabolites and cytokine levels in HCU patients and controls.

		Patients (n = 9)	Controls (n = 10)	p
		Median (range)	Median (range)	
Homocysteine-related metabolites ($\mu\text{mol/L}$)	Met	165 (22–777)	24 (14–30)	0.007
	Hcy	130 (17–300)	6.7 (5.7–12)	< 0.001
	Cys	158 (67–297)	223 (174–241)	0.014
	SAM	756 (99–3264)	82 (69–107)	< 0.001
	SAH	135 (18–591)	19 (10–23)	0.002
Pro-inflammatory cytokines (pg/mL)	IL-1 α	0.05 (0.01–1.25)	0.24 (0.01–30.77)	0.252
	IL-1 β	0.79 (0.39–1.83)	0.57 (0.37–1.05)	0.743
	IL-6	1.03 (0.45–2.05)	1.12 (0.47–11.56)	0.653
	IL-8	2.07 (0.58–15.60)	1.58 (1.12–18.14)	0.624
	IL-17	1.96 (1.04–5.48)	4.09 (1.23–12.94)	0.102
	TNF- α	7.92 (3.62–14.81)	9.17 (3.92–13.67)	0.287
	TNF- β	0.01 (0.00–1.94)	0.02 (0.00–119)	0.617
	MCP-1	254 (185–1014)	267 (216–357)	0.935
	IP-10	277 (170–1855)	489 (264–1764)	0.153
	GRO	829 (197–2473)	704 (303–1014)	0.595
	MDC	554 (299–1288)	527 (295–759)	0.744
	MIP-1 α	1.00 (0.54–3.62)	2.24 (0.66–34.89)	0.077
	MIP-1 β	18.61 (1.01–37.62)	19.57 (1.84–68.80)	0.327
Anti-inflammatory cytokines (pg/mL)	VEGF	156.71 (0.01–376)	255.33 (1.32–704)	0.102
	GM-CSF	3.62 (1.06–15.20)	3.01 (1.77–13.67)	0.744
	IFN- γ	3.62 (1.67–9.72)	10.92 (4.94–82.04)	0.007
	IL-4	0.48 (0.04–2.83)	0.68 (0.16–26.46)	0.327
	IL-10	0.75 (0.27–1.39)	0.79 (0.41–3.29)	0.935
	IL-13	0.11 (0.02–9.17)	0.15 (0.02–78)	0.368
	G-CSF	13.67 (7.69–46.01)	16.83 (7.69–135.66)	0.653

Met: methionine; Hcy: homocysteine; Cys: cysteine; SAM: S-Adenosylmethionine; SAH: S-Adenosylhomocysteine.

<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.09.003>

Received 6 September 2018; Accepted 7 September 2018

2214-4269/© 2018 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

were excluded from data analysis ($n = 1$).

Hcy-lowering treatment (pyridoxine 7/9, folic acid 8/9, betaine 7/9, methionine-restricted diet 3/9) was prescribed; but only 3/9 patients had tHcy $< 100 \mu\text{mol/L}$ (target level). Most patients (7/9) were pyridoxine nonresponsive. Because of the high concentrations of tHcy with a wide range we consider this an ideal group to explore the potential relation between cytokines and tHcy. Cytokines plasma levels were similar in patients and controls, with the exception of IFN- γ , which was three-fold reduced ($p = .007$) in patients (Table 1). In line an inverse association of Hcy and SAM with IFN- γ was found ($r = 0.487$ and $r = 0.537$; $p < .05$).

To our knowledge, only one study had previously evaluated cytokines in HCU patients. Keating et al. measured 16 cytokines in plasma of HCU patients, and found that patients with tHcy $> 150 \mu\text{M}$, ($n = 5$) had increased levels of several pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-17 and IL-12), while well controlled patients (Hcy $< 86.1 \mu\text{M}$, $n = 5$) had not [4]. The authors provided no information about which patients received treatment. IFN- γ was not evaluated in this study. In previous studies, reduced IFN- γ levels have shown anti-inflammatory properties [5,6].

In summary, our study provides no evidence of increased inflammatory cytokines in HCU patients on treatment, despite poor metabolic control. Hcy may even show anti-inflammatory properties like glutathione [7], what could explain the finding of lowered IFN- γ . The potential impact of Hcy-lowering treatment on cytokines requires further study.

Acknowledgments

Financial support for this study was provided by CNPq, FAPERGS, CAPES and DAAD.

References

- [1] A.M. Gori, A.M. Corsi, S. Fedi, A. Gazzini, F. Sofi, B. Bartali, S. Bandinelli, G.F. Gensini, R. Abbate, L. Ferrucci, A proinflammatory state is associated with hyperhomocysteinemia in the elderly, *Am. J. Clin. Nutr.* 82 (2005) 335–341.
- [2] I. Shai, M.J. Stampfer, J. Ma, J.E. Manson, S.E. Hankinson, C. Cannuscio, J. Selhub, G. Curhan, E.B. Rimm, Homocysteine as a risk factor for coronary heart diseases and its association with inflammatory biomarkers, lipids and dietary factors, *Atherosclerosis* 177 (2004) 375–381.
- [3] M. Michaud, L. Balardy, G. Moulis, C. Gaudin, C. Peyrot, B. Vellas, M. Cesari, F. Nourhashemi, Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases, *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 14 (2013) 877–882.
- [4] A.K. Keating, C. Freehauf, H. Jiang, G.L. Brodsky, S.P. Stabler, R.H. Allen, D.K. Graham, J.A. Thomas, J.L. Van Hove, K.N. Maclean, Constitutive induction of pro-inflammatory and chemotactic cytokines in cystathionine beta-synthase deficient homocystinuria, *Mol. Genet. Metab.* 103 (2011) 330–337.
- [5] L. Flaishon, I. Topilski, D. Shoseyov, R. Hershkoviz, E. Fireman, Y. Levo, S. Marmor, I. Shachar, Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma, *J. Immunol.* 168 (2002) 3707–3711.
- [6] H. Mühl, J. Pfeilschifter, Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma, *Int. Immunopharmacol.* 3 (2003) 1247–1255.
- [7] M. Pirchl, C. Ullrich, B. Sperner-Unterwieser, C. Humpel, Homocysteine has anti-inflammatory properties in a hypercholesterolemic rat model in vivo, *Mol. Cell. Neurosci.* 49 (2012) 456–463.

Soraia Poloni^{a,b}, Marina Siebert^b, Karina Carvalho Donis^c,
Giovana R. Weber Hoss^{b,c}, Henk J. Blom^d, Ida V.D. Schwartz^{a,b,c,*}

^a Post-Graduation Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b BRAIN (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences) Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^c Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d Department of Internal Medicine, VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

E-mail address: ischwartz@hcpa.ufrgs.br (I.V.D. Schwartz)

* Corresponding author at: Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil.

ANEXOS – Cartas de Aprovação de Projetos pelo CEP



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

COMISSÃO CIENTÍFICA

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

Projeto: 130525

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

SANDRA LEISTNER SEGAL

**Título: DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES C₂S, BHMT E CHDH EM PACIENTES
BRASILEIROS COM HÔMOCISTINÚRIA CLÁSSICA**

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

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

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

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

Porto Alegre, 26 de dezembro de 2013.


Prof. Eduardo Pandolfi Passos
Coordenador GPPG/HCPA



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

COMISSÃO CIENTÍFICA

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

Projeto: 150636

Data da Versão do Projeto: 17/12/2015

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

NATANIEL FLORIANO LUDWIG

GIOVANA REGINA WEBER

FERNANDA SPERB LUDWIG

SORAIA POLONI

Título: Creatina em Homocistinúria Clássica: Suplementação em Cultivo de Fibroblastos

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

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

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

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

Porto Alegre, 15 de abril de 2016.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA



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

COMISSÃO CIENTÍFICA

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

Projeto: 160140

Data da Versão do Projeto: 22/03/2016

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

TACIANE BORSATTO

GIOVANA REGINA WEBER

SORAIA POLONI

Título: INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES BRASILEIROS COM SUSPEITA DE HOMOCISTINÚRIA POR DEFICIÊNCIA DE MTHFR

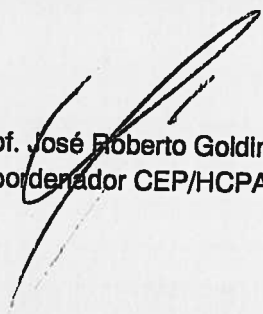
Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

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

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

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

Porto Alegre, 26 de abril de 2016.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA