

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Osmar Vieira Ramires Junior

**EFEITOS NEUROTÓXICOS DA HIPER-HOMOCISTEINEMIA LEVE
EXPERIMENTAL: PAPEL NEUROPROTETOR DO IBUPROFENO E DA
RIVASTIGMINA**

Porto Alegre

2023

Osmar Vieira Ramires Junior

**EFEITOS NEUROTÓXICOS DA HIPER-HOMOCISTEINEMIA LEVE
EXPERIMENTAL: PAPEL NEUROPROTETOR DO IBUPROFENO E DA
RIVASTIGMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Bioquímica.
Orientadora: Prof^a Dr^a Angela T. S. Wyse

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Ramires Junior, Osmar Vieira
Efeitos neurotóxicos da Hiper-homocisteinemia leve
experimental: papel neuroprotetor do ibuprofeno e da
rivastigmina / Osmar Vieira Ramires Junior. -- 2023.
192 f.
Orientadora: Angela Wyse.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Homocisteina e seu metabolismo. 2. Estresse
oxidativo, nitrativo e neuroinflamação. 3. Sistema
colinérgico e via colinérgica anti-inflamatória. 4.
Metabolismo da glicose. 5. Memória e motricidade. I.
Wyse, Angela, orient. II. Título.

À minha Mãe Maria

pelo incentivo, confiança e amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Angela Wyse, pela oportunidade de participar do seu grupo, por confiar em mim e no meu trabalho, pelo comprometimento, paciência, ensinamentos e dedicação durante todos esses anos de orientação. Sua dedicação e amor à pesquisa mantêm todo o seu grupo de pesquisa motivado!

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica pelo ensino gratuito e de qualidade, aos funcionários do Departamento de Bioquímica, do biotério e da recepção.

Agradeço aos órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dessa tese e ao longo da minha formação.

À minha família, por acreditarem em mim, pelo amor e carinho incondicionais. Vocês são o meu porto seguro. Obrigado por todo o suporte ao longo dessa trajetória, a qual não teria sido possível sem o apoio de vocês. Amo vocês!

Agradeço ao meu namorado Lucas por toda paciência, apoio e carinho. Com certeza o teu suporte foi essencial pra realização dessa etapa. Te amo.

Agradeço a todos os meus amigos pelo apoio, cumplicidade, parceria e companheirismo de sempre. Vocês fizeram as etapas dessa jornada serem mais amenas e reconfortantes, assim como fazem a vida ser mais feliz. Amo vocês.

Agradeço a todos os colaboradores/parceiros que, a partir das suas contribuições técnico-científicas e intelectuais, auxiliaram no desenvolvimento dessa tese. Muito Obrigado!

Sou grato a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desse projeto e para o desenvolvimento da ciência. Muito obrigado!

O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.

Eleanor Roosevelt

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
PARTE I.....	17
 1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Homocisteina e seu metabolismo	18
1.2 Hiper-Homocisteinemia e doenças neurodegenerativas.....	20
1.3 Estresse oxidativo e Nitrativo	22
1.4 Neuroinflamação.....	24
1.5 Sistema colinérgico e via colinérgica anti-inflamatória.....	27
1.7 Metabolismo da glicose.....	30
1.8 Memória e motricidade.....	33
 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	34
 3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
3.2.1 Capítulo I	36
3.2.2 Capítulo II	37
3.2.3 Capítulo II	38
 PARTE II.....	39
 4 METODOLOGIA E RESULTADOS.....	40
4.1 Modelo crônico de HHcy leve, rivastigmina e ibuprofeno.....	40
4.2 Modelo <i>ex vivo</i> em fatias com Hcy, ibuprofeno e rivastigmina	42
4.3 Capítulo I: Rivastigmine reverses the decrease in synapsin and memory caused by homocysteine: Is there relation to inflammation.....	44
4.4 Capítulo II: Homocysteine may decrease glucose uptake and alter the Akt/GSK3 β /GLUT1 signaling pathway in hippocampal slices: Neuroprotective effects of rivastigmine and ibuprofen.....	64

4.5 Capítulo III: Mild hyperhomocysteinemia compromises growth factors and neurotrophins in the hippocampus of rats: Neuroprotective effects of rivastigmine and ibuprofen.....	78
PARTE III.....	128
5 DISCUSSÃO.....	129
6 CONCLUSÕES.....	150
7 PERSPECTIVAS.....	154
8 REFERÊNCIAS.....	155
ANEXO	173
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS (CEUA/UFRGS).....	174

RESUMO

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado derivado do metabolismo da metionina. Os níveis plasmáticos de Hcy dependem de vários fatores, sendo que os valores normais variam de 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$ e acima deste é definido como hiperhomocisteinemia (HHcy). A HHcy leve, 16-30 $\mu\text{mol/L}$, é um fator de risco para doenças neurodegenerativas. Estudos têm demonstrado que HHcy leve induz estresse oxidativo, neuroinflamação e alteração na atividade da acetilcolinesterase (AChE), no hipocampo de ratos. Essas alterações também têm sido evidenciadas na patogênese da doença de Alzheimer. O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos e mecanismos da HHcy leve experimental em ratos Wistar, bem como o papel neuroprotetor do ibuprofeno e da rivastigmina sobre parâmetros comportamentais motores e cognitivos (campo aberto, trave de equilíbrio, *rotarod* e teste vertical, *Y-maze*) e parâmetros bioquímico-moleculares no hipocampo [homeostase redox, proteína sinapsina 1, parâmetros do perfil inflamatório, molécula adaptadora de ligação ao cálcio 1 (Iba1), expressão do gene que codifica para iNOS, níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), quimiocina ligante 5 (CCL5/RANTES), quimiocina ligante CX3C 1 (CX3CL1) e NGF/p75NTR/tropomiosina quinase B (TrkB)], por meio da análise imuno-histoquímica de marcadores gliais (Iba-1 e GFAP) e a via anti-inflamatória colinérgica. Também investigamos, em modelo *ex vivo*, possíveis alterações bioquímico-molecular em fatias de hipocampo [excitabilidade neuronal, níveis de glicose, lactato, a proteína Serina/Treonina quinase B (Akt), glicose sintase quinase-3 β (GSK3 β) e o transportador de glicose 1 (GLUT1)]. No capítulo I e III, o modelo crônico de HHcy leve foi induzido em ratos Wistar através da administração subcutânea de Hcy (0,03 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal), duas vezes ao dia, do 30º a 60º dia de vida. Ibuprofeno (40 mg/kg) e rivastigmina (0,5 mg/kg) foram administrados via intraperitoneal uma vez ao dia. No capítulo II, fatias de hipocampo de ratos Wistar de 90 dias foram pré-tratadas por 30 minutos [meio salino ou Hcy (30 μM)], depois os outros tratamentos foram adicionados ao meio por mais 30 minutos [ibuprofeno (100 μM), rivastigmina (0,5 μM) ou ibuprofeno+rivastigmina]. Os resultados do capítulo I mostraram que a HHcy leve causou déficits cognitivos na memória de trabalho e a coordenação motora prejudicada, reduziu a quantidade da proteína sinapsina 1, alterou o quadro neuroinflamatório e causou alterações na atividade das enzimas catalase e AChE. Ambos os tratamentos, rivastigmina e ibuprofeno, foram capazes de mitigar esses danos causados pela HHcy leve. No capítulo II, os níveis fosforilados de GSK3 β e Akt foram reduzidos em Hcy (30 μM) e o co-tratamento com Hcy+rivastigmina+ibuprofeno reverteu esses efeitos. A associação do tratamento com rivastigmina+ibuprofeno atenuou tais efeitos, provavelmente pela regulação da via de sinalização Akt/GSK3 β /GLUT1. No capítulo III, os resultados mostraram aumento nos níveis de CCL5/RANTES e redução nos níveis de VEGF, EGF e TrkB no hipocampo de ratos submetidos à HHcy. A rivastigmina reverteu o efeito neurotóxico da HHcy com

aumento de TrkB e VEGF. Já o ibuprofeno atenuou os níveis de CCL5/RANTES frente ao efeito neurotóxico da HHcy, reduzindo significativamente os níveis dessa quimiocina. Em conjunto, esses achados fornecem uma nova base para a compreensão dos resultados neuroquímicos e comportamentais associados à níveis aumentos de Hcy. Além disso, a reversão dos danos de HHcy por ibuprofeno e rivastigmina pode ser uma estratégia neuroprotetora potencial para danos cerebrais.

Palavras-chave: Homocisteína; Hiper-homocisteinemia leve; doenças neurodegenerativas; neuroproteção; rivastigmina; ibuprofeno.

ABSTRACT

Homocysteine (Hcy) is a sulfur amino acid derived from the metabolism of methionine. Plasma levels of Hcy depend on several factors, and normal values range from 5 to 15 $\mu\text{mol/L}$ and above this is defined as hyperhomocysteinemia (HHcy). Mild HHcy, 16-30 $\mu\text{mol/L}$, is a risk factor for neurodegenerative diseases. Studies have shown that mild HHcy induces oxidative stress, neuroinflammation and changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in the hippocampus of rats. These alterations have also been evidenced in the pathogenesis of Alzheimer's disease. The present study aims to evaluate the effects and mechanisms of experimental light HHcy in Wistar rats, as well as the neuroprotective role of ibuprofen and rivastigmine on motor and cognitive behavioral parameters (open field, balance beam, rotarod and vertical pole test, Y -maze) and biochemical-molecular parameters in the hippocampus [redox homeostasis, synapsin 1 protein, parameters of the inflammatory profile, calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), expression of the gene that encodes for iNOS, levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), chemokine ligand 5 (CCL5/RANTES), chemokine ligand CX3C 1 (CX3CL1) and NGF/p75NTR/tropomyosin kinase B (TrkB)], through immunohistochemical analysis of glial markers (Iba-1 and GFAP) and the cholinergic anti-inflammatory pathway. We also investigated, in an ex vivo model, possible biochemical-molecular changes in hippocampus slices [neuronal excitability, levels of glucose, lactate, protein Serine/Threonine kinase B (Akt), glucose synthase kinase-3 β (GSK3 β) and the transporter glucose 1 (GLUT1)]. In chapters I and III, the chronic model of mild HHcy was induced in Wistar rats through the subcutaneous administration of Hcy (0.03 $\mu\text{mol/g}$ of body weight), twice a day, from the 30th to the 60th day of life. Ibuprofen (40 mg/kg) and rivastigmine (0.5 mg/kg) were administered intraperitoneally once a day. In chapter II, slices of hippocampus from 90-day-old Wistar rats were pre-treated for 30 minutes [saline or Hcy (30 μM) medium], then the other treatments were added to the medium for another 30 minutes [ibuprofen (100 μM), rivastigmine (0.5 μM) or ibuprofen+rivastigmine]. The results of chapter I showed that mild HHcy caused cognitive deficits in working memory and impaired motor coordination, reduced the amount of synapsin 1 protein, altered the neuroinflammatory picture and caused alterations in the activity of catalase and AChE enzymes. Both treatments, rivastigmine and ibuprofen, were able to mitigate this damage caused by mild HHcy. In chapter II, phosphorylated levels of GSK3 β and Akt were reduced in Hcy (30 μM) and co-treatment with Hcy+rivastigmine+ibuprofen reversed these effects. The combination of treatment with rivatigmine+ibuprofen attenuated these effects, probably by regulating the Akt/GSK3 β /GLUT1 signaling pathway. In chapter III, the results showed an increase in the levels of CCL5/RANTES and a reduction in the levels of VEGF, EGF and TrkB in the hippocampus of rats submitted to HHcy. Rivastigmine reversed the neurotoxic effect of HHcy with increased TrkB and VEGF.

Ibuprofen, on the other hand, attenuated CCL5/RANTES levels against the neurotoxic effect of HHcy, significantly reducing the levels of this chemokine. Taken together, these findings provide a new basis for understanding the neurochemical and behavioral outcomes associated with increased Hcy levels. Furthermore, reversal of HHcy damage by ibuprofen and rivastigmine may be a potential neuroprotective strategy for brain damage.

Keywords: Homocysteine; Mild hyperhomocysteinemia; neurodegenerative diseases; neuroprotection; rivastigmine; ibuprofen.

LISTA DE ABREVIATURAS

α7nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina contendo a subunidade alfa7
βA: β-amilóide
ACh: Acetilcolina
AChE: Acetilcolinesterase
AINEs: Anti-inflamatórios não esteróides
Akt: Serina/Treonina quinase B
ATP: Adenosina trifosfato
BChE: Butirilcolinesterase
BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT: Catalase
ChAT: Colina acetiltransferase
COX-2: Ciclooxygenase-2
CCL1: Ligante 1 de quimiocina CC
CCL5/RANTES: Ligante 5 de quimiocina CC
CX3CL1: Ligante 1 de quimiocina do motivo C-X3-C
DCFH: 2',7'-dihidroclorofluoresceína
DNA: Ácido desoxirribonucleico
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
ERK: Quinase regulada por sinal extracelular
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
GLUT: Transportador de glicose
GLUT1: Transportador de glicose do tipo 1
GPx: Glutationa peroxidase
GSH: Glutationa reduzida
GSK3β: Glicogênio sintase quinase 3 beta
GSSG: Glutationa oxidada
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
Hcy: Homocisteína
HHcy: Hiper-homocisteinemia
HIF-1α: Fator 1-alfa induzível por hipóxia
IB: Ibuprofeno
Iba1: molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
IL: Interleucina
MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos-1
MGO: Agente glicante metilgioxal
NGF: Fator de crescimento neural
NMDA: N-metil-d-aspartato
nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal
NO: Óxido nítrico
ONOO⁻: Peroxinitrito
PGE2: Prostaglandina E2
RANTES: *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*

SAH: S-adenosil-homocisteína
SAM: S-adenosilmetionina
SNC: Sistema nervoso central
SOD: Superóxido dismutase
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TLR: receptor *Toll-like*
TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Fórmula estrutural da homocisteína.....18

Figura 2: Rota da Metionina-Homocisteína.....19

METODOLOGIA

Figura 3: Linha do tempo experimental.....40

CONCLUSÕES

Figura 4: Resumo dos resultados do capítulo I, II e III.....153

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Homocisteína e seu metabolismo

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado, contendo enxofre, a qual possui estrutura semelhante à cisteína exceto por um átomo de carbono adicional (figura 1), (KAPLAN et al., 2020), razão pela qual recebe esse nome. A Hcy é formada durante o metabolismo da metionina, um aminoácido essencial derivado das proteínas da dieta ou da degradação de proteínas endógenas (LONG; NIE, 2016).

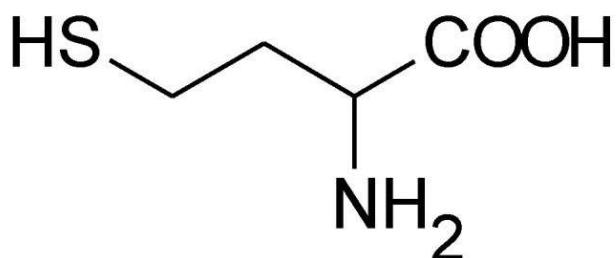


Figura 1: Fórmula estrutural da homocisteína (KAPLAN et al., 2020).

Uma vez metabolizada sob a ação da metionina adenosiltransferase, a metionina recebe o grupamento adenosil da adenosina trifosfato (ATP) formando S-adenosilmetionina (SAM), fonte de grupo metil para reações de metilação, como metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou formação de catecolaminas (CESARI et al., 2005; FRISO et al., 2002; PI; LIU; SHI, 2020). Quando o grupo metil é transferido pelas metiltransferases (estando essa ação envolvida em modificações epigenéticas) para os respectivos aceptores, SAM é convertida em S-adenosil-homocisteína (SAH) e posteriormente hidrolisada pela SAH hidrolase, que remove adenosina para formar Hcy e adenosina (LONG; NIE, 2016; MARTÍNEZ et al., 2017; PI; LIU; SHI, 2020;

ŠKOVIEROVÁ et al., 2016).

A Hcy biossintetizada é metabolizada por duas principais vias metabólicas: a remetilação e transsulfuração, produzindo finalmente metionina e cisteína, respectivamente (figura 2) (KIM et al., 2018). Na via de remetilação, a metionina é regenerada através de uma reação catalisada pela enzima metionina sintase, requerendo folato e vitamina B12 como cofatores. (VISRAM et al., 2018). Na via de transsulfuração, a Hcy combina-se com a serina para formar a cistationina pela cistationina beta-sintase e depois a cistationina é hidrolisada em cisteína e α-acetobutirato pela cistationina γ-liase (ŠKOVIEROVÁ et al., 2016).

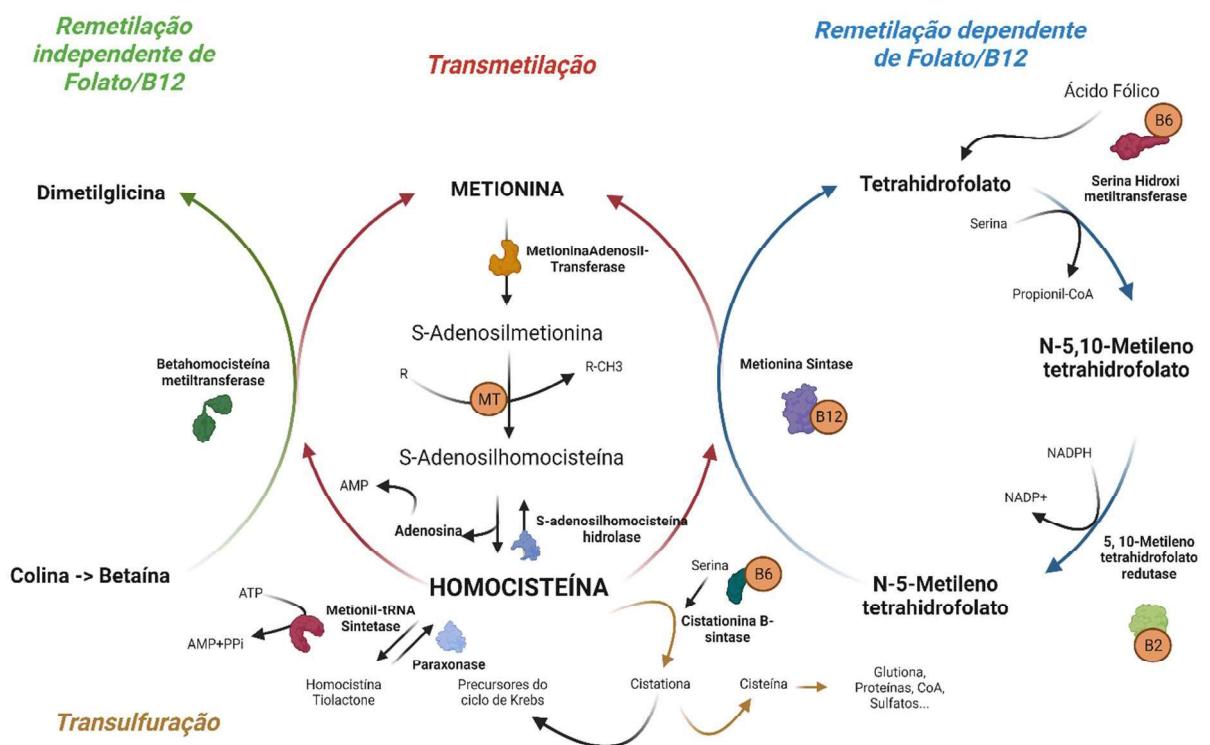


Figura 2: Rota da Metionina-Homocisteína. R- Qualquer radical a ser metilado, CH₃ – grupamento metila, ATP – adenosina trifosfato, ADP – adenosina difosfato, AMP – adenosina monofosfato, NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, NADP+ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado, B₁₂ – vitamina B₁₂, B₆ – vitamina B₆, B₂ – vitamina B₂, PPi – pirofosfato inorgânico, Pi – fosfato inorgânico. Adaptado de Skovierová et. al, (2016) (ŠKOVIEROVÁ et al., 2016).

A Hcy, quando em excesso na célula é liberada do líquido intracelular para o líquido extracelular através da diferença nas concentrações interna e externa e então exportada para a circulação sistêmica para evitar seu acúmulo intracelular (HANNIBAL; BLOM, 2017; PI; LIU; SHI, 2020). Sendo assim, o equilíbrio da produção e do metabolismo da Hcy é essencial para manter a homeostase. Os níveis plasmáticos de Hcy dependem de vários fatores, como a alteração genética das enzimas do metabolismo da metionina e deficiências de vitamina B₁₂, vitamina B₆, ácido fólico, níveis de estrogênio e idade (LONG; NIE, 2016; PI; LIU; SHI, 2020).

1.2 Hiper-Homocisteinemia e doenças neurodegenerativas

O nível plasmático normal de Hcy é na faixa de 5 a 10 µM. Em condições normais, as concentrações plasmáticas desse aminoácido não excedem 15 µM, no entanto,

níveis <16 µM são definidos como HHcy leve, sendo a moderada na faixa de 31-100 µM e a grave é diagnosticada quando os níveis de Hcy é > 100 µM (VEERANKI; TYAGI, 2013). A HHcy grave ocorre na homocistinúria, um erro inato do metabolismo caracterizado por uma deficiência da atividade da cistationina beta-sintase (ŠKOVIEROVÁ et al., 2016).

Diferentes pesquisas destacam importantes papéis patológicos da HHcy leve em muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (MCCULLY, 2016; MIAO et al., 2021; TESSARI et al., 2018; WEBER et al., 2016). Neste contexto, a HHcy leve é considerada como importante fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (MONTECINOS-OLIVA et al., 2020; TAWFIK et al., 2021).

A prevalência de HHcy leve na população geral é estimada em 5% a 7%, sendo a população idosa a mais afetada (BRAUN et al., 2020; YE et al., 2016). De particular importância, tal população tem crescido consideravelmente na última década, devido ao aumento da expectativa de vida. Entre as doenças mais comuns que afetam a população idosa com mais de 65 anos estão as doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (JAUL; BARRON, 2017; TAWFIK et al., 2021). O motivo pelo qual a HHcy leve vem sendo epidemiologicamente relacionada a doenças neurodegenerativas, vai além do seu envolvimento cerebrovascular no sistema nervoso central (SNC), uma vez que a HHcy leve foi identificada como um fator de risco independente para acidente vascular cerebral e doença vascular (SUDDUTH et al., 2017). A HHcy leve, está emergindo também como um possível contribuinte da progressão da demência (BONETTI; BROMBO; ZULIANI, 2016), e tem sido associado ao comprometimento cognitivo, podendo esse comprometimento ser atribuído diretamente ao efeito neurotóxico da Hcy (OSTRAKHOVITCH; TABIBZADEH, 2019).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo crônico quimicamente induzido de hiper-homocisteinemia leve em ratos adultos, sendo os níveis de Hcy no sangue ($30\mu M$), comparáveis aos considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurológicas (SCHERER et al., 2011a). Usando esse modelo foi demonstrado, em diferentes estudos, que a HHcy leve pode causar um desequilíbrio na homeostase redox, um aumento de citocinas de perfil inflamatório, bem como alteração na via colinérgica (DOS SANTOS et al., 2019a; SCHERER et al., 2011a, 2013, 2014, 2014).

1.3 Estresse oxidativo e Nitrativo

As células vivas estão sujeitas aos efeitos perigosos de moléculas oxidantes altamente reativas produzidas exógena ou endogenamente (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015). Espécies reativas são espécies químicas altamente reativas, geralmente com propriedades oxidantes e que são produzidas naturalmente pelas células por possuírem importantes funções biológicas (HALLIWELL; CHEAH; TANG, 2018). Essas espécies incluem os radicais livres, que são moléculas ou átomos que possuem um elétron não pareado na sua última camada, e as formas não-radicalares (KOWALCZYK, 2013). As principais espécies reativas podem ser divididas em dois grupos: espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As espécies reativas mais relevantes e deletérias produzidas nos sistemas biológicos são o radical ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($\cdot OH$), o óxido nítrico (NO), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o ácido hipocloroso (HOCl) (HALLIWELL, 2007).

A manutenção da homeostase do estado redox depende da produção e consumo de espécies reativas o qual é regulado por um fino equilíbrio entre as defesas

antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Em relação às defesas enzimáticas, as principais são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx). Vitamina C, vitamina E, betacaroteno, glutationa reduzida (GSH) e outros estão entre as defesas não-enzimáticas (KALYANARAMAN, 2013). A GSH é o antioxidante celular mais abundante: é um tiol não proteico encontrado principalmente na sua forma reduzida que pode reagir diretamente com espécies reativas ou participar da reação catalisada pela GPx. Durante a detoxificação de peróxidos pela GPx, a GSH é convertida em sua forma oxidada (GSSG), que por sua vez é reduzida novamente à GSH pela enzima glutationa redutase (MASTRONIKOLIS et al., 2022).

A SOD, é uma enzima antioxidante importante sendo uma metaloenzima que catalisa a dismutação de O_2^- a H_2O_2 e O_2 (KALYANARAMAN, 2013; KOWALCZYK, 2013). As enzimas CAT e GPx são as principais responsáveis pela degradação de H_2O_2 , formando H_2O e O_2 (KALYANARAMAN, 2013; KOWALCZYK, 2013). Quando os níveis de H_2O_2 estão relativamente baixos a CAT é responsável pela redução dessa espécie reativa, no entanto em níveis mais elevados, a GPx, que é a principal responsável pela degradação de peróxidos lipídicos também age na detoxificação do H_2O_2 . Quando ocorre um desequilíbrio na formação e degradação das EROs e ERNs, o seu excesso torna-se tóxico e causa danos oxidativos a todos os componentes da célula, incluindo proteínas, lipídios e DNA, que podem levar à morte celular. Este desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante em favor da situação pró-oxidante é caracterizado como estresse oxidativo (HALLIWELL, 2012; LAMBETH; NEISH, 2014).

O cérebro é extremamente suscetível a insultos por espécies reativas (TARAFDAR; PULA, 2018). Um aumento no estresse oxidativo/nitroxidativo e uma diminuição na capacidade antioxidante do cérebro são fatores-chave envolvidos na

etiology das doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (POPA-WAGNER et al., 2013). Em paralelo, Scherer e colaboradores (2011) demonstraram que a HHcy leve aumenta a produção de espécies reativas em plasma e córtex cerebral, bem como promove um desequilíbrio nas defesas antioxidantes enzimáticas e peroxidação lipídica. Além disso, o mesmo estudo demonstrou uma redução nas defesas antioxidantes não enzimáticas em plasma e córtex cerebral de ratos, sugerindo que o estresse oxidativo proveniente do aumento dos níveis de Hcy podem estar associados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SCHERER et al., 2011b).

1.4 Neuroinflamação

A neuroinflamação geralmente se refere a uma resposta inflamatória dentro do SNC que pode ser causada por vários insultos patológicos, incluindo infecção, trauma, isquemia e toxinas (LENG; EDISON, 2021). Os componentes imunes celulares e moleculares, tais como citocinas e o sistema complemento, levam à ativação das células da glia, principalmente microglia e astrócitos (LYMAN et al., 2014; MORALES et al., 2014). No entanto, as células endoteliais capilares e as células sanguíneas infiltradas também contribuem para a neuroinflamação, especialmente quando a barreira sangue-cérebro sofre danos bioquímicos ou mecânicos (LENG; EDISON, 2021).

Uma vez que a microglia e astrócitos inflamatórios estão ativados, essas células liberam várias moléculas neurotóxicas como NO, prostaglandina E2 (PGE2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e EROs (ALFADLY et al., 2019; BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017; LENG; EDISON, 2021). Essas células gliais reativas induzem ainda a expressão da ciclooxigenase (COX) 2, envolvida em transtornos neurodegenerativos (ALFADLY et al., 2019).

A microglia e astrócitos também desempenham um papel fundamental na produção e liberação de quimiocinas no cérebro durante a neuroinflamação (KWON; KOH, 2020). O ligante 1 de quimiocina do motivo C-X3-C (CX3CL1), também conhecido como fractalquina, desempenha um papel importante na comunicação entre neurônios e células gliais no SNC e está ligada na regulação da inflamação e neurodegeneração (BACHSTETTER et al., 2011). Alterações na expressão e função da CX3CL1 têm sido observadas em várias doenças neurodegenerativas, o que sugere seu envolvimento na patogênese dessas condições (WINTER et al., 2020). Em paralelo, o ligante 1 de quimiocina CC (CCL1), bem como o ligante 5 de quimiocina CC (CCL5), também conhecida como RANTES (*sigla para Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), são quimiocinas que podem desempenhar um papel na modulação da inflamação crônica, a qual desempenha um papel importante na patogênese de doenças neurodegenerativas. A expressão aumentada de CCL5/RANTES desempenha um papel na patogênese das doenças neurodegenerativas, principalmente por sua capacidade de modular a resposta inflamatória (KEMPURAJ et al., 2016).

A liberação de moléculas pró-inflamatórias além de morte neuronal também pode levar à disfunção sináptica e inibição da neurogênese (JACOBS; TAVITIAN, 2012). Astrócitos e microglia expressam uma variedade de receptores *Toll-like* (TLRs) que ativam essas células e iniciam uma reação neuroinflamatória (LYMAN et al., 2014). O *Toll-like* 2 (TLR-2) e *Toll-like* 4 (TLR-4) são de grande importância, pois induem a liberação de citocinas como TNF- α e IL-1 β e são receptores chave na sinalização pró-inflamatória (MEHRABADI et al., 2020; WARREN et al., 2010). Dentre as citocinas pró-inflamatórias liberadas pela microglia ativada para o seu ambiente celular, podemos destacar TNF- α , IL-6, IL-1 β . Evidências experimentais indicaram que essas

citocinas (as quais são secretadas pela microglia) reativam os astrócitos, resultando em disfunção neuronal e, finalmente promovem a morte celular (JACOBS; TAVITIAN, 2012). Estudos mostram que TNF- α , IL-6, IL-1 β foram observadas em pacientes pós-morte com doença de Parkinson por análise cerebral, bem como a superexpressão dessas citocinas tem um *feedback* positivo, que gera uma cascata e leva a um aumento da hiperfosforilação da proteína tau, reduzindo os marcadores de sinapses e finalmente levando à degeneração e morte neuronal (GUZMAN-MARTINEZ et al., 2019; MORALES et al., 2014).

Citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, também são produzidas durante o processo neuroinflamatório e podem desempenhar um mecanismo de prevenção da neuroinflamação excessiva (CALSOLARO; EDISON, 2016). No entanto, é importante ressaltar que a neuroinflamação em doenças neurodegenerativas tende a ser um processo crônico, que não se resolve por si só e é considerada um fator vital da doença (HENEKA et al., 2015; LENG; EDISON, 2021).

1.4.1 Participação da via das ciclooxygenases na neuroinflamação

A COX converte o ácido araquidônico em prostaglandinas as quais possuem várias funções inflamatórias. As vias de suas duas isoformas comuns, COX-1 e COX-2, estão se tornando cada vez mais associadas à neuroinflamação e à neurodegeneração (LYMAN et al., 2014). A COX-1 é expressa constitutivamente no cérebro e promove à síntese de prostaglandinas podendo levar a uma liberação excessiva de prostaglandinas (ALFADLY et al., 2019). Muitos aspectos da via COX-1 são pró-inflamatórios, resultando em neuroinflamação prejudicial e comprometimento cognitivo (MATOUSEK et al., 2010). Já COX-2 é induzida em distúrbios neurodegenerativos, tanto em neurônios quanto em células gliais e está associada ao

funcionamento sináptico e à formação de memória (LYMAN et al., 2014). Altos níveis de prostaglandinas produzidas por COX-2, foram encontrados no córtex frontal de pacientes com DA e com consequente regulação positiva da micróglia e astrócitos em placas senis (CALSOLARO; EDISON, 2016).

Com o papel das vias COX na neuroinflamação, cada vez mais os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) tem sido identificados como uma classe de drogas com potenciais efeitos terapêuticos (LYMAN et al., 2014). Vários estudos epidemiológicos e observacionais demonstraram efeitos protetores dos AINEs na redução ou retardo da progressão da DA (SPANGENBERG; GREEN, 2017). Dentre os AINEs de venda livre e mais comumente usados, destaca-se o ácido *iso*-butilfenilpropiônico, também conhecido como ibuprofeno (IB) (KRUKEWICZ et al., 2020). Esse fármaco é conhecido por diminuir a produção de NO e proteger os neurônios contra a toxicidade do glutamato, bem como por diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias em humanos (BESSLER et al., 2017).

O IB tem sido sugerido como uma terapêutica promissora para o tratamento da neuroinflamação, uma vez que demonstrou diminuir a resposta inflamatória induzida por lesão cerebral traumática (WALLENQUIST et al., 2012), proteger células dopaminérgicas e retardar a progressão da doença de Parkinson (RAMAZANI; TAYARANI-NAJARAN; FEREIDONI, 2019), exibindo ainda efeitos neuroprotetores contra DA (MENDONÇA et al., 2019).

1.5 Sistema colinérgico e via colinérgica anti-inflamatória

A neuroinflamação descontrolada, proveniente do mau funcionamento imunológico, é um dos principais contribuintes para a disfunção cerebral (REN et al., 2020). Os sinais inflamatórios atingem as diferentes regiões do cérebro, promovendo

o comprometimento da barreira sangue-cérebro e ativando fibras aferentes do nervo vago, respectivamente (DANTZERA et al., 2000). Fibras aferentes do nervo vago transmitem sinais inflamatórios periféricos ao cérebro, que por sua vez desencadeiam respostas inflamatórias (GOEHLER et al., 2000). Os sinais do nervo vago eferente suprimem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e inibem a inflamação, a qual é definido como função vagal de “via colinérgica anti-inflamatória” (PAVLOV; TRACEY, 2005).

A comunicação neuroimune é complexa e mantém o equilíbrio fisiológico de cada órgão e as funções do corpo. A rede regulatória importante em todo esse processo é composta por circuitos neuronais centrais e periféricos, células imunológicas e citocinas, sistemas hormonais neuroendócrinos, microbiota intestinal e seus metabólitos, barreira sangue-cérebro e mucosa intestinal (HALDER; LAL, 2021). Sendo assim, o sistema colinérgico é encontrado tanto nas células neuronais quanto nas não neuronais e forma uma rede que desempenha várias funções no corpo (PRADO et al., 2017). Esse sistema serve como um centro de controle que conecta os impulsos entre o cérebro e os órgãos internos, pelas fibras aferentes e eferentes parassimpáticas do nervo vago (RINAMAN; COMER, 2000).

Para a manutenção da homeostase imunológica é essencial respostas imunes adequadas contra抗ígenos. No entanto, uma resposta imune exacerbada geralmente induz o dano tecidual que acompanha a autoimunidade ou distúrbios imunopatológicos. A eliminação desse dano é dependente de diferentes mecanismos regulatórios, onde o mecanismo básico chave que rege interações de sistema nervoso/sistema imunológico é considerado a via anti-inflamatória colinérgica (HAN; LI; HAO, 2017; TRACEY, 2002). A via anti-inflamatória colinérgica desempenha um papel crucial no processo de redução da inflamação. Como exemplo disso, a acetilcolina (ACh) (um

neurotransmissor primário nos SNC e periférico) derivada de células T no baço, induzida pela estimulação do nervo vago, regula a intensidade das respostas inflamatórias por meio da inibição da liberação do TNF- α (TRACEY, 2002). Além disso, a estimulação do nervo vago demonstrou atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias sem afetar as citocinas anti-inflamatórias (BOROVICOVA et al., 2000).

A ACh, é produzida pela colina acetiltransferase (ChAT). Esse neurotransmissor em meio extracelular atua em receptores muscarínicos e nicotínicos (ZHENG et al., 2021). A degradação da ACh é mediada pela acetilcolinesterase (AChE) ou butirilcolinesterase (BChE) (HAN; LI; HAO, 2017). Em seguida, a colina sofre recaptação por proteínas do tipo transportador de colina ou transportador de colina de alta afinidade-1, que é o procedimento limitante da taxa de síntese de ACh (TRAIFFORT et al., 2005; YAMADA et al., 2011). No SNC, a ACh atua sobre receptor nicotílico de acetilcolina contendo a subunidade alfa7 (α 7nAChR), que é expresso na microglia e astrócitos , resultando em redução da neuroinflamação (HAN; LI; HAO, 2017; REVATHIKUMAR et al., 2016).

A potencialização da via anti-inflamatória colinérgica, via abordagens farmacológicas, foram indicadas para o controle de doenças neuroinflamatórias. Conforme citado anteriormente, reações inflamatórias estão ativamente envolvidas no processo de inúmeras doenças neurológicas, como acidente vascular cerebral e doença neurodegenerativa como a doença de Alzheimer. Portanto, a via anti-inflamatória colinérgica pode representar uma estratégia de tratamento inovadora para muitas doenças neurológicas (HAN; LI; HAO, 2017). Os inibidores da colinesterase participam na manutenção dos níveis de ACh através da inibição das enzimas implicadas na sua degradação (BChE e AChE). Esta ação farmacológica tem um papel importante em várias doenças, incluindo as doenças neurodegenerativas como a

doença de Alzheimer (DE LOS RÍOS, 2012). A rivastigmina (RVT), um inibidor da AChE, diminui acentuadamente a atividade da AChE no cérebro e atenuar poderosamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, desmielinização, ativação da microglia, dano axonal e sintomas clínicos de doenças neurodegenerativas (NIZRI et al., 2008).

1.6 Metabolismo da glicose

O cérebro é um órgão altamente dependente de glicose como fonte de energia. Além disso, a memória a nível celular, é dependente da atividade na força sináptica e também de uma fase inicial de expressão gênica que, se interrompida, resulta em amnésia. Sendo assim, a memória depende da ativação de vias moleculares e são acompanhadas por modificações morfológicas da sinapse (KNOUSE; SAFREN, 2010). Em paralelo, as células gliais participamativamente de funções cerebrais complexas, incluindo as cognitivas, atribuídas apenas aos astrócitos e neurônios (HAYDON; NEDERGAARD, 2015). Dessa forma, a plasticidade sináptica e a memória dependem dos regulamentos astrocíticos da disponibilidade de nutrientes, sendo a entrada de glicose no cérebro e seu metabolismo subsequente, de suma importância (HALASSA; HAYDON, 2009).

O metabolismo da glicose no cérebro desempenha um papel crucial na manutenção da função neuronal e na homeostase energética. Tanto os neurônios quanto os astrócitos, desempenham papéis essenciais no metabolismo da glicose (ZHANG et al., 2021). Os neurônios são altamente dependentes da glicose como fonte de energia para sustentar atividades metabólicas e elétricas (DIENEL, 2019). A glicose é captada pelos neurônios por meio de transportadores de glicose (GLUT), que estão

expressos em níveis elevados nas membranas neuronais (LÓPEZ-GAMBERO et al., 2019). Uma vez dentro dos neurônios, a glicose é metabolizada pela glicólise, produzindo piruvato, que é então convertido em acetil-CoA e utilizado no ciclo de Krebs para a produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa (ZHANG et al., 2021). Além disso, os neurônios possuem alta atividade de transporte de glicose e consomem glicose em níveis elevados, representando uma grande parte do metabolismo da glicose no cérebro (LÓPEZ-GAMBERO et al., 2019).

A enzima Na^+/K^+ ATPase desempenha um papel fundamental no metabolismo da glicose no cérebro, sendo a sua atividade crucial para manter o equilíbrio eletroquímico das células. Na^+/K^+ ATPase consome uma grande quantidade de energia na forma de ATP para transportarativamente íons de sódio para fora das células e íons de potássio para dentro das células (MATSUDA et al., 1992). Esse transporte é essencial para manter uma concentração baixa de sódio extracelular e uma concentração alta de potássio intracelular. Esse gradiente iônico é fundamental para a captação de glicose pelas células (MATSUDA et al., 1992). Em condições de baixa atividade da Na^+/K^+ ATPase, como ocorre em casos de lesão cerebral traumática ou isquemia cerebral, há um comprometimento do metabolismo da glicose e diminuição da captação de glicose pelas células (ANTUNES WILHELM et al., 2013). Além disso, foi observado que a atividade controlada de Na^+/K^+ ATPase leva a uma redução significativa no consumo de glicose pelo cérebro (KURITA et al., 2015). Isso sugere que a atividade da enzima é um fator limitante para o metabolismo da glicose no cérebro.

Os astrócitos, por sua vez, desempenham um papel fundamental na regulação do metabolismo da glicose e no fornecimento de energia para os neurônios. Essas células possuem processos ramificados que envolvem os capilares aéreos e estão em

contato direto com neurônios e vasos sanguíneos (DIENEL, 2019). Sendo assim, os astrócitos captam glicose através do transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1), que está expresso em alta densidade nas membranas dessas células que cercam os capilares. Dentro dos astrócitos, a glicose pode ser metabolizada pela glicólise, gerando lactato, que pode ser lançada nos espaços extracelulares e captada pelos neurônios para ser utilizada como fonte energética (ZHANG et al., 2021).

A via de sinalização Akt-GSK3B desempenha um papel crucial no metabolismo da glicose no cérebro (LONG et al., 2021). Essa via está sujeita na regulação do transporte de glicose através da BHE, na captação de glicose pelas células radiais e na fosforilação de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose (ZHANG et al., 2021). A Serina/Treonina quinase B (Akt) participa da regulação do transporte de glicose através da barreira sangue-cérebro, (LONG et al., 2021). A ativação da Akt promove a translocação do GLUT1 para a membrana plasmática das células endoteliais da BHE, aumentando assim o transporte de glicose para o cérebro (LÓPEZ-GAMBERO et al., 2019). Essa ativação é estimulada por fatores de crescimento, como o fator de crescimento insulina-símile 1 e fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), que se ligam aos seus receptores específicos (SEEGER; PALLER, 2015). Além disso, ativação da Akt promove a translocação do GLUT 3 para a membrana plasmática das células neuronais, facilitando a entrada de glicose nas células (ZHANG et al., 2021). A Akt também influencia o metabolismo da glicose no cérebro por meio da fosforilação da glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β), uma vez fosforilada Akt fosforila GSK3 β , gerando a inativação dessa enzima. A GSK3 β é uma quinase que regula o armazenamento de glicogênio e glicólise (KAUR; SHARMA; DESHMUKH, 2019). Portanto, a inativação da GSK3 β pela Akt promove uma síntese de glicogênio e a utilização da glicose como

suplementos energéticos no cérebro.

1.7 Memória e motricidade

A relação entre memória e motricidade tem sido amplamente investigada, uma vez que a memória desempenha um papel crucial na aquisição, retenção e execução de habilidades motoras (MOUMDJIAN et al., 2017). Através da prática e repetição, as habilidades motoras são gradualmente consolidadas na memória procedural, permitindo sua execução de forma automática e sem esforço consciente (SAVION-LEMIEUX; PENHUNE, 2005).

Além dos estudos comportamentais, a neurociência tem contribuído para a compreensão dos controles neurais subjacentes à relação entre memória e motricidade (MAXWELL; MASTERS; EVES, 2003). Diversas pesquisas têm demonstrado uma interação íntima entre esses dois processos cognitivos. Por exemplo, estudos comportamentais têm mostrado consistentemente que a prática de habilidades motoras está associada a melhorias na memória de longo prazo (MOUMDJIAN et al., 2017). Um estudo revelou que um único episódio de exercício físico pode melhorar a consolidação da memória motora (THOMAS et al., 2016a). Sendo assim, a motricidade desempenha um papel crucial no armazenamento e recuperação eficaz da memória.

A plasticidade neural também desempenha um papel crucial na relação entre memória e motricidade. Estudos têm mostrado que a prática de habilidades motoras induz mudanças neuroplásticas no cérebro, que são fundamentais para a aquisição e retenção de memórias motoras (GREENE; SIMPSON; BENNION, 2012). Um estudo investigou os efeitos do momento do exercício físico na consolidação da memória motora e descobriram que o exercício imediatamente após a aprendizagem

melhorou a retenção da memória motora (ROIG et al., 2012). Esses achados ressaltaram a importância da plasticidade sináptica na interação entre memória e motricidade. Além disso, pesquisas demonstraram a influência da plasticidade sináptica e da neurogênese na relação entre memória e motricidade. A neurogênese no hipocampo está envolvida tanto na formação de memórias quanto na aprendizagem de habilidades motoras, isso destaca a interação complexa entre os sistemas de memória e motricidade no nível celular (DUPRET et al., 2008).

Além das influências da motricidade na memória, também foi observado que a memória pode afetar a motricidade. Estudos mostram que a memória de habilidades motoras influencia a aprendizagem e a execução de movimentos (DOYON et al., 2009). O desempenho em tarefas motoras é afetado pela memória de trabalho, o que é mais pronunciada em indivíduos mais velhos (ANGUERA et al., 2013). Isso destaca a importância de considerar a interação bidirecional entre memória e motricidade.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Considerando que: a) o aumento nos níveis séricos de Hcy está relacionado a danos cerebrais b) níveis aumentados desse aminoácido são um fator de risco relevante para doenças neurodegenerativas c) os efeitos neurotóxicos do aumento de Hcy em longo prazo no SNC não são totalmente compreendidos, acreditamos ser de extrema importância avaliar os mecanismos bioquímicos, moleculares e celulares envolvidos na toxicidade da Hcy, em um modelo quimicamente induzido de HHcy leve crônica, em ratos machos Wistar. Em paralelo, avaliar também o papel neuroprotetor do ibuprofeno e rivastigmina sobre à toxicidade da HHcy leve. Baseado nisso, nossa hipótese é que a HHcy leve crônica poderá causar alterações comportamentais e bioquímicos-moleculares, as quais estão relacionadas ao desenvolvimento de

doenças, o que pode estar associado ao fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurogedenerativas na população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral da tese foi avaliar os efeitos da HHcy leve crônica e os efeitos neuroprotetores do ibuprofeno e rivastigmina, em ratos sobre: parâmetros comportamentais (memória e motricidade), bem como parâmetros bioquímicos, moleculares e neuroinflamatórios no hipocampo desses animais.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram subdivididos em três (3) capítulos, os quais correspondem a 3 artigos científicos, respectivamente:

3.2.1 Capítulo I

Avaliar os efeitos causados pela HHcy leve crônica, bem como os efeitos neuroprotetores do ibuprofeno e rivastigmina, em ratos Wistar, sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e moleculares no hipocampo de ratos machos, analisando:

- a memória de trabalho espacial utilizando o teste do labirinto Y;
- o comportamento exploratório e locomotor por meio do teste de campo aberto;
- a motricidade pelos testes da trave de equilíbrio, *rotarod* e *pole teste vertical*;
- parâmetros de estresse oxidativo, tais como: oxidação de 2',7'-dihidroclorofluorsceína (DCFH), substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e teor de sulfidrilas;

- atividades das defesas enzimáticas antioxidantes, como atividade das enzimas: SOD e CAT;
- parâmetros de estresse nitrativo, a saber: níveis de nitritos e a expressão do gene que codifica para enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS);
- a expressão dos genes que codificam para citocinas inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10, bem como o conteúdo proteico da molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1 (Iba1);
- plasticidade sináptica por meio do conteúdo proteico da sinapsina I;
- a via colinérgica por meio da atividade da enzima AChE e o conteúdo proteico da AChE e ChAT.

3.2.2 Capítulo II

Avaliar os efeitos neurotóxicos de 30 μM de Hcy, bem como os efeitos neuroprotetores do ibuprofeno e rivastigmina, em um modelo *ex vivo* de fatias de hipocampo de ratos Wistar, determinando:

- a viabilidade celular por ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e necrose pelo ensaio de lactato desidrogenase (LDH);
- os níveis de lactato e glicose;
- a captação de glicose;
- a homeostase redox, sobre: oxidação de DCFH, níveis de nitritos, conteúdo de GSH e atividade da glutamina sintetase (GS);

- a excitabilidade neuronal por meio da atividade da enzima Na⁺/K⁺ATPase;
- a ativação astrocitária e quantidade de neurônios por meio do conteúdo proteico da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e proteína nuclear específica do neurônio (NeuN);
- O conteúdo proteico da Akt, GSK3β e GLUT1.

3.2.3 Capítulo III

Avaliar os efeitos causados pela HHcy leve crônica, bem como os efeitos neuroprotetores do ibuprofeno e rivastigmina, em ratos Wistar, sobre parâmetros morfológicos e moleculares no hipocampo de ratos machos, analisando:

- a produção de agentes pró-inflamatórios, por meio da expressão dos genes que codicam para os receptores *toll-like*: o receptor do tipo *toll-like* 2 (TRL2) e o receptor do tipo *toll-like* 4 (TRL4);
- a morfologia do hipocampo, por meio da análise de imuno-histoquímica das proteínas GFAP e Iba1, bem como a densidade neuronal;
- o conteúdo proteico do receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), do receptor de tropomiosina quinase B (TrkB) e do fator de crescimento nervoso;
- o perfil inflamatório por meio dos níveis de quimiocinas como as CCL1, CCL5/RANTES e CX3CL1/fractalquina, via ensaio multiplex;
- os níveis de fatores de crescimento como: o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

PARTE II

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados serão apresentados em 3 capítulos. Os capítulos I, II e III correspondem a artigos científicos que serão apresentados posteriormente. Nos artigos científico do capítulo I e III foi utilizado o modelo experimental de HHcy leve crônica quimicamente induzida. Já no artigo científico do capítulo II, utilizamos o modelo experimental *ex vivo*, realizado em fatias de hipocampo de ratos adultos.

Os artigos apresentam como base os modelos experimentais descritos abaixo.

4.1 Modelo crônico de HHcy leve e tratamento com rivastigmina e ibuprofeno

Ratos Wistar machos, com 30 dias de idade, foram tratados por um período de 30 dias (30 a 60 dias de vida), duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas entre as injeções. Nos animais tratados com homocisteína, 30 µM DL-HCY (Sigma Aldrich®, nº de catálogo H4628) (4,055 mg/kg de peso corporal) foi administrada por via subcutânea (sc). Esta dose foi escolhida pois a concentração plasmática atinge níveis semelhantes aos encontrados em pacientes com hiper-homocisteinemia, conforme descrito por Scherer et al., (SCHERER et al., 2011a), sendo o grupo controle tratado apenas com soro fisiológico (solução de cloreto de sódio 0,9%). Já os animais tratados com ibuprofeno (Sigma Aldrich®, nº de catálogo I4883) receberam 40 mg/kg de peso corporal de acordo com Naeem et al. (NAEEM et al., 2017) e os animais tratados com rivastigmina (Scientific Sanbio, catálogo nº R541000) receberam 0,5 mg/kg de peso corporal de acordo com Comim et al. (COMIM et al., 2009). Ambos os grupos receberam uma única injeção intraperitoneal (ip) diária, e o controle recebeu solução salina (veículo). Assim, os animais foram divididos em quatro grupos: controle

(solução de cloreto de sódio), hiper-homocisteinêmicos (HHcy + salina), tratados com HHcy e ibuprofeno (HHcy + IB), tratados com HHCy leve e rivastigmina (HHcy + RVT). No dia de cada teste, os animais receberam 30 minutos antes uma das doses diárias de Hcy ou salina. Os ratos foram decapitados 12 h após a última injeção de Hcy. O hipocampo foi utilizado para análises bioquímicas (figura 3).

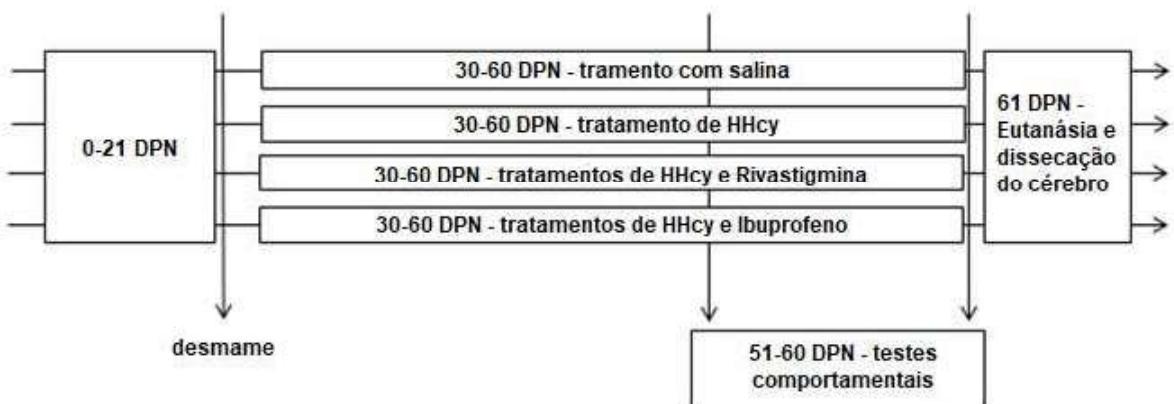


Figura 3: Linha do tempo experimental. Ratos Wistar foram desmamados aos 21 dias pós-natal. Após completar 30 dias, foram iniciados os tratamentos de acordo com os diferentes grupos até os 60 dias de vida desses animais. Esses roedores foram submetidos a diferentes testes comportamentais dos 51 aos 60 dias de vida. Após completar 61 dias, todos os animais dos diferentes grupos de tratamento foram sacrificados e o cérebro dissecado para análise posterior. Dias pós-natais, DPN; HHcy, hiper-homocisteinemia.

4.2 Modelo ex vivo em fatias hipocampais e incubação com Hcy, ibuprofeno e rivastigmina

Ratos machos Wistar, com 90 dias de idade, foram sacrificados por decapitação e seus cérebros foram removidos e colocados em solução salina gelada com a seguinte composição: NaCl 120-mM; KC1 2 mM; CaCl2 1 mM; MgSO4 1 mM; HEPES 25 mM; KH2PO4 1 mM e D-glicose 10 mM, ajustados para pH 7,4. Os hipocampos foram dissecados e cortes transversais (0,3 mm) foram preparados usando um *McIlwain Tissue Chopper* (Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., Inglaterra) e separados em tampão a 4°C. Imediatamente após o corte, as fatias foram transferidas para o tampão por 15 min para recuperação do trauma do corte, antes de iniciar os experimentos. Em seguida, as fatias foram imediatamente transferidas para placas de cultura de 24 poços, cada poço contendo 0,3 ml de meio fisiológico e apenas uma fatia. O meio foi substituído a cada 15 minutos por um meio salino fresco. Após um período de equilíbrio de 60 minutos, o meio foi removido e substituído por tratamentos basais (grupo controle) ou específicos por 60 minutos a 37 °C (FERREIRA et al., 2018; VIZUETE et al., 2019).

As fatias foram pré-tratadas por 30 minutos (meio salino ou Hcy), depois os outros tratamentos foram adicionados ao meio por mais 30 minutos (IB, RVT ou IB+RVT) de acordo com o método descrito em Morrone et al., (DA SILVA MORRONE et al., 2013). A dose de Hcy utilizada foi de 30 µM por ser uma concentração relacionada com fator de risco para doença neurodegenerativa de acordo com o estudo realizado por Longoni et al., (LONGONI et al., 2018) já demonstraram que Hcy (10, 30 e 100 µM) não afeta a integridade da membrana ou a viabilidade celular por 24 horas. Assim, as fatias foram incubadas com os seguintes tratamentos e divididas nos

seguintes grupos experimentais: (1) Controle em que a solução continha apenas o meio salino; (2) Tratamento apenas com Hcy (30 μ M); (3) um grupo somente IB (100 μ M); (4) Tratamento apenas com RVT (0,5 μ M); (5) Hcy durante o período de pré-tratamento, após o qual foi adicionado IB (Hcy+IB); (6) um grupo que foi pré-tratado com Hcy, após adição de RVT (Hcy+RVT); aquele em que foi pré-tratado com Hcy, após adição de IB e RVT (Hcy+IB/RVT). As doses foram otimizadas após a realização de estudos dose-resposta usando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e o ensaio de lactato desidrogenase (LDH) e a viabilidade celular não foi afetada (dados não mostrado). Após a realização do pré-tratamento e tratamento, o sobrenadante da cultura e as fatias do hipocampo foram imediatamente coletados para realizar as análises neuroquímicas.

4.3 Capítulo I

Rivastigmine reverses the decrease in synapsin and memory caused by homocysteine: Is there relation to inflammation?

Osmar Vieira Ramires Junior, Tiago Marcon dos Santos, Josiane Silva Silveira, Raíssa Leite-Aguiar, Robson Coutinho-Silva, Luiz Eduardo Baggio
Savio and Angela T. S. Wyse

**Artigo publicado na revista *Molecular Neurobiology*, 2022 jul;59(7):4517-4534.
doi: 10.1007/s12035-022-02871-x.**

Fator de impacto: 5,682 (2021), Qualis CAPES A1

4.4 Capítulo II

Homocysteine may decrease glucose uptake and alter the Akt/GSK3 β /GLUT1 signaling pathway in hippocampal slices: Neuroprotective effects of rivastigmine and ibuprofen

Osmar Vieira Ramires Junior, Josiane Silva Silveira, Tiago Marcon dos Santos, Fernanda Silva Ferreira, Adriana Fernanda K. Vizuete, Carlos Alberto Gonçalves, and Angela T. S. Wyse.

**Artigo publicado na revista *Molecular Neurobiology*, 2023 jun.
doi: 10.1007/s12035-023-03408-6.**

Fator de impacto: 5,682 (2021), Qualis CAPES A1

4.5 Capítulo III

Mild hyperhomocysteinemia compromises growth factors and neurotrophins in the hippocampus of rats: Neuroprotective effects of rivastigmine and ibuprofen

Osmar Vieira Ramires Júnior, Josiane Silva Silveira, Darlan Gusso, Gustavo Ricardo Krupp Prauchner, Wellington de Almeida, Lenir Orlandi Pereira and Angela TS Wyse

Artigo submetido no periódico *Brain, Behavior and immunity*, 2023.

Fator de impacto: 19,227 (2021), Qualis CAPES A1

PARTE III

5 DISCUSSÃO

Na presente tese, demonstramos que o modelo quimicamente induzido de HHcy leve crônica, causou prejuízos comportamentais e neuroquímicos no hipocampo de ratos machos, confirmando nossa hipótese inicial. Os níveis aumentados desse aminoácido são um fator de risco relevante para doenças neurodegenerativas (MOUSTAFA et al., 2014; PRICE; WILCOCK; WEEKMAN, 2018). Além disso, também demonstramos que os tratamentos com rivastigmina e ibuprofeno possuem um potencial efeito neuroprotetor, uma vez que modularam alguns parâmetros dos efeitos neurotóxicos dos níveis aumentados de Hcy.

No artigo I, demonstramos que mecanismos comportamentais, bioquímicos, moleculares e celulares estão envolvidos na toxicidade da Hcy. Para investigarmos tais parâmetros utilizamos o modelo de HHcy leve crônica e, avaliamos ainda, o efeito neuroprotetor da rivastigmina e do ibuprofeno sobre os efeitos causados por este aminoácido.

Embora o comprometimento cognitivo seja a principal característica clínica da DA, a patogênese dessa doença neurodegenerativa está associada a comprometimentos motores, como bradicinesia, rigidez extrapiramidal e distúrbios da marcha (BELLO-MEDINA et al., 2021; NYUL-TOTH et al., 2021; TOSTO et al., 2015). Além disso, diferentes estudos mostraram que o dano motor pode ser usado como um biomarcador precoce da DA para identificar o risco de progressão para demência completa, uma vez que o dano motor pode se manifestar em um estágio inicial da doença (BELGHALI et al., 2017; PIERUCCINI-FARIA et al., 2021; RUCCO et al., 2017). Portanto, primeiro verificamos o comportamento exploratório e a atividade locomotora dos animais tratados por meio do teste de campo aberto. Neste teste comportamental,

não encontramos diferença significativa nos parâmetros avaliados, embora tenha sido identificada uma tendência de redução exploratória de roedores com HHcy leve crônica. Nesse contexto, um período maior de tratamento e exposição desses animais a altos níveis de Hcy possivelmente seria suficiente para comprometer significativamente a exploração desses animais. Além disso, quando a coordenação motora foi avaliada pelo teste da trave de equilíbrio e pelo teste de aceleração do *rotarod*, os animais com HHcy leve apresentaram redução no cruzamento da trave na trave de equilíbrio e menor latência para a primeira queda, no *rotarod*, em comparação aos controles, evidenciando um prejuízo da atividade motora induzida pelo aumento dos níveis de homocisteína com o estudo de Jadavji et al. (JADAVJI et al., 2019).

Diferentes estudos clínicos demonstraram a forte associação do declínio cognitivo com níveis aumentados de homocisteína (ANNERBO; WAHLUND; LÖKK, 2006; BLASKO et al., 2008; GABRYELEWICZ et al., 2007; MATTSSON et al., 2009). Portanto, avaliamos através do labirinto em Y a memória de trabalho espacial. Observamos uma redução da memória de trabalho nos animais hiperhomocisteinêmicos quando comparados ao grupo controle. Em um estudo recente de Wyse et al. (WYSE et al., 2020a) foram encontrados déficits de memória aversiva de curto prazo em ratos com HHcy leve no teste de esquiva inibitória, bem como redução do volume do hipocampo nesses animais (CHAI et al., 2013; RICHTER-LEVIN; SEGAL, 1991). Está bem estabelecido que a mudança na plasticidade sináptica é um requisito para a memória e o aprendizado (WYSE et al., 2020a) assim como a sinapsina 1 é reconhecida como um marcador de plasticidade sináptica em redes neurais (GREENGARD et al., 1993; SLUTSKY et al., 2010). Paralelamente aos nossos resultados encontrados no labirinto em Y, o conteúdo proteico da proteína pré-sináptica sinapsina 1 diminuiu no grupo HHcy leve. Segundo Polydoro et al. (POLYDORO et al.,

2009), a presença de tau está associada ao comprometimento da função cognitiva, por meio da interrupção da função sináptica. Um estudo recente em um modelo de camundongo de tauopatia demonstrou que o aumento dos níveis de Hcy aumenta a fosforilação da tau e a patologia sináptica (DI MECO et al., 2019). Assim, o comprometimento da memória e da integridade sináptica observado neste estudo pode estar associado a um possível aumento da fosforilação e acúmulo da proteína tau. Além disso, também observamos um processo neuroinflamatório no hipocampo de ratos hiperhomocisteinêmicos. O processo neuroinflamatório está envolvido com o comprometimento cognitivo e morte neuronal (DE ARAÚJO BOLETI et al., 2020; GERMOLEC et al., 2018).

Nossos resultados também demonstraram que tanto o tratamento com ibuprofeno quanto o tratamento com rivastigmina foram capazes de reverter os danos causados pela HHcy leve, em termos de memória e integridade sináptica. Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), incluindo o ibuprofeno, inibem não seletivamente a COX-1 e a COX-2 (KOTILINEK et al., 2008). Essas enzimas catalisam a formação de prostaglandinas, incluindo a PGE2, a partir do ácido araquidônico (TEGEDER; PFEILSCHIFTER; GEISSLINGER, 2001). Na DA, os níveis de PGE2 estão aumentados (HO et al., 2000). Nos neurônios, a COX-2 é expressa durante processos fisiológicos e patológicos, sendo observada em altos níveis basais no hipocampo e no córtex cerebral, e está concentrada nas espinhas dendríticas (KAUFMANN et al., 1996). Além disso, a expressão de COX-2 é induzida em neurônios por β -amilóide (β A), glutamato e citocinas inflamatórias (BAZAN, 2001; TOCCO et al., 1997). Estudos recentes mostraram que HHcy induz a formação de peptídeos β A (ANDRA et al., 2021; LI et al., 2014; SADE YAZDI et al., 2021). É reconhecido que os peptídeos β A inibem a plasticidade sináptica hipocampal de longa duração (WANG et al., 2004). Um estudo

realizado em modelos *in vitro* e *in vivo* avaliou o efeito do ibuprofeno na inibição mediada por β A, plasticidade sináptica e memória. Os resultados deste estudo demonstraram que o ibuprofeno impediu a supressão da plasticidade a longo prazo do hipocampo por β A. Além disso, o ibuprofeno foi capaz de restaurar a função de memória de camundongos transgênicos Tg2576 (que superexpressam a proteína precursora amilóide) e também bloqueou a inibição de plasticidade a longo prazo mediada por β A. A função de memória aprimorada foi inversamente relacionada aos níveis de PGE2 (KOTILINEK et al., 2008). Portanto, propomos em nosso estudo que o mecanismo pelo qual o ibuprofeno restaura a memória e a integridade sináptica que foram comprometidas pela HHcy leve está relacionado à sua função de inibir a produção de COX-2 e subsequente PGE2 em espinhas dendríticas. Desta forma, os possíveis efeitos nocivos de β A, mais HHcy, na plasticidade sináptica e na função de memória podem ser evitados. Além disso, sabe-se que os AINEs reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio da inibição da COX ou da ativação do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (COMBS et al., 2000), o que justificaria a redução da IL-1 β e o aumento da IL-10 pelo ibuprofeno também observados neste estudo.

O sistema colinérgico desempenha papel fundamental nos processos fisiológicos relacionados à biossíntese do neurotransmissor ACh pela enzima ChAT (ROCHA-DIAS et al., 2020). Nosso trabalho avaliou o conteúdo protéico de AChE e ChAT, bem como a atividade da enzima AChE. Nossos resultados demonstraram que a HHcy leve aumentou a atividade da AChE. No entanto, seu conteúdo de proteína foi diminuído no hipocampo. Tais resultados reproduzem os achados de outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (SCHERER et al., 2014), o que permite reforçar o possível efeito compensatório na atividade da AChE diante da diminuição de seu

conteúdo protéico, uma vez que os níveis de AChE são controlados pela regulação pós-transcricional (KAUFER et al., 1998; SHOHAMI et al., 2000). Além disso, no presente estudo, também podemos observar que os animais tratados com HHcy + RVT e os tratados com HHcy + IB tiveram um efeito oposto aos ratos hiperhomocisteinêmicos em relação ao conteúdo e atividade da proteína AChE, bem como uma atenuação de IL-1 β e o aumento de IL-10 por esses grupos quando comparados a roedores tratados apenas com HHcy leve. É reconhecido que a via anti-inflamatória colinérgica consiste em sinais neurais transmitidos através do nervo vago que inibem a liberação de citocinas por meio de um mecanismo que requer o α 7nAChR (PAVLOV et al., 2009). Portanto, a interrupção da produção de citocinas em doenças inflamatórias é a principal tarefa dessa via (POHANKA, 2019). Assim, sugere-se que a rivastigmina mantenha sua função de inibir a atividade da AChE revertendo os danos causados pela HHcy leve. Essa ação é necessária para manter os níveis de ACh e sua subsequente ação anti-inflamatória, reduzindo a produção de IL-1 β e aumentando os níveis de IL-10, corroborando com outros estudos feitos no hipocampo e córtex de ratos (AKHTAR; BISHNOI; SAH, 2020a; LIANG; TANG, 2004). O tratamento com ibuprofeno também foi eficaz na regulação da atividade da AChE no nível de controle durante a HHcy, provavelmente por meio de mecanismos pós-transcricional. Além disso, esse tratamento também resultou em redução subsequente dos níveis de IL-1 β e aumento de IL-10. Esses resultados corroboram com um estudo que demonstrou que o ibuprofeno, por meio da via anti-inflamatória colinérgica, foi capaz de aumentar a expressão do α 7nAChR, sendo também identificado um aumento nos níveis de ACh em um modelo de sepse realizado em ratos (LIU et al., 2017). No entanto, não observamos alterações no conteúdo da proteína ChAT entre os grupos tratados, o que sugere que não há comprometimento na síntese de ACh, reforçando a hipótese de que

o comprometimento da via anti-inflamatória colinérgica pela HHcy leve se deve à aumento da atividade da AChE (pelo excesso de hidrólise da ACh) e com desregulação de citocinas pró e anti-inflamatórias.

A microglia ativada em sua forma clássica M1 ativa o fator nuclear κB, que pode desempenhar um papel crítico na produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a resultados neurotóxicos e apoptose neuronal (KAUR; SHARMA; DESHMUKH, 2019). Assim, o fenótipo M1 pode contribuir para a disfunção do sistema neurotrófico expressando citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (MICHELUCCI et al., 2009; WANG et al., 2019b). O fenótipo M2 com sua função neuroprotetora libera mediadores, incluindo IL-10, para antagonizar os danos induzidos pela inflamação no sistema nervoso central (PARK et al., 2015; WANG et al., 2019b; ZHAO et al., 2015). No presente estudo, os animais tratados apenas com HHcy leve, quando comparados ao grupo controle, demonstraram um aumento na expressão dos genes que codificam para as citocinas pró-inflamatórias IL- β , IL-6 e TNF- α , bem como uma redução significativa para citocina anti-inflamatória IL-10. Tais resultados de citocinas pró-inflamatórias estão de acordo com os achados de outros estudos realizados por nosso grupo, onde os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e quimiocina CCL2 (MCP-1) estavam aumentados no hipocampo de roedores com HHcy crônica leve (DA CUNHA et al., 2012; SCHERER et al., 2014). Essa evidência reforça o envolvimento da Hcy no processo inflamatório que pode contribuir para o comprometimento comportamental. Sugerimos a participação desse aminoácido na neurotoxicidade associada à morte neuronal, que promove distúrbios neurodegenerativos, semelhantes aos da patogênese da DA (ZHANG et al., 2013). Associado a essa evidência, um estudo recente demonstrou uma diminuição do volume hipocampal após a indução de HHcy crônica leve, resultando na perda da integridade estrutural do tecido em condições de

aumento dos níveis de Hcy (WYSE et al., 2020a) .

Nossos dados mostram que ambos os tratamentos com HHcy + IB e HHcy + RVT não revertem a expressão do gene que codifica para as citocinas IL-6 e TNF-alfa. No entanto, ambos os tratamentos são significativamente diferentes apenas do grupo controle e não são significativamente diferentes do grupo tratado apenas com HHcy. Um estudo que os AINEs aumentam a produção de TNF- α em monócitos in vitro e in vivo (PAGE et al., 2010). Acredita-se que o aumento da produção de TNF- α se deva à propriedade antiinflamatória parcial da PGE2. Ao inibir a COX-2 através do IB, a formação de PGE2 é suprimida. A PGE2 tem efeitos imunossupressores significativos, afetando a produção de citocinas. Serve como *feedback* negativo sobre os macrófagos, inibindo a produção de TNF- α e limitando a atividade inflamatória (KUNKEL et al., 1988; TRÖGER et al., 2020). Além disso, a PGE2 promove a produção de IL-10 (STOLINA et al., 2000) como observamos em nosso estudo no grupo tratado com HHcy + IB. Ao inibir a síntese de PGE2 com IB, a falta de um mecanismo de *feedback* negativo resulta em aumento da produção de TNF- α . Ao adicionar PGE2, o efeito do IB pode ser revertido na produção de TNF- α (HÄRTEL et al., 2004; PAGE et al., 2010). Ao induzir o aumento da produção de TNF- α , o IB tem um efeito inflamatório no sistema imunológico (TRÖGER et al., 2020). Além disso, o TNF- α é frequentemente induzido junto com a IL-6, que desempenha um importante papel regulador nas respostas inflamatórias (HÄRTEL et al., 2004; PAGE et al., 2010). Acredita-se que a IL-6 tenha efeitos pró e anti-inflamatórios (SUABJAKYONG et al., 2015; XING et al., 1998). No contexto da obesidade e resistência à insulina, um nível baixo e persistente de inflamação crônica pode ser encontrado com IL-6 como um dos mediadores sugeridos (EDER et al., 2009; SUABJAKYONG et al., 2015). Paralelamente, a IL-10 é uma citocina antiinflamatória capaz de inibir a expressão de IL-6 e TNF- α em

macrófagos (SAIKI et al., 2018). Além disso, foi relatado em um estudo que o equilíbrio IL-6/IL-10 diminui o risco de inflamação crônica e resulta em distúrbios metabólicos e doenças autoimunes (EDER et al., 2009; SUABJAKYONG et al., 2015).

Também avaliamos o conteúdo de proteína do marcador de ativação microglial Iba-1, pois esta é uma proteína citosólica de ligação ao cálcio e um marcador confiável de microglia ativada (DRAGO et al., 2014). Um estudo recente demonstrou um aumento significativo nos níveis de mRNA e conteúdo proteico de Iba-1, tanto no córtex quanto no hipocampo de ratos submetidos a um modelo de HHcy crônica leve. Além disso, o mesmo estudo revelou um aumento significativo de células Iba1 positivas com morfologia hiper-ramificada nas estruturas desses animais (KUMAR; SANDHIR, 2019). Esses achados corroboram nossos resultados e nossa hipótese de que níveis aumentados de Hcy promovem a proliferação e ativação da microglia. Outro estudo de Braun et al. (2020) em um modelo de camundongo de amilóides *knock-in* confirmaram que a HHcy induzida por dieta aumentou a carga de placa amilóide. Este efeito foi causado pela ativação microglial, uma vez que houve um aumento na expressão de múltiplos genes associados a danos e microgliais (BRAUN et al., 2020). Além disso, sabe-se também que a ativação da microglia e dos astrócitos está associada ao aumento do NO. Esse mecanismo contribui para a excitotoxicidade neuronal, que pode estar associada à patogênese de doenças neurodegenerativas (YUSTE et al., 2015). No entanto, nossos resultados não mostraram alterações no conteúdo da proteína iNOS no hipocampo nos diferentes grupos de tratamento. Apesar disso, um estudo do nosso grupo mostrou anteriormente que a HHcy crônica leve aumenta significativamente os níveis de nitritos no hipocampo de ratos 1 h e 12 h após a última injeção de Hcy (DA CUNHA et al., 2012). A enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS) e iNOS produzem NO no processo

de conversão de arginina em citrulina (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). O aumento de nitritos observado no hipocampo de animais tratados com HHcy leve pode estar relacionado à atividade de uma dessas enzimas.

O estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas. Causa um desequilíbrio celular entre os processos bioquímicos das defesas antioxidantes e a produção de EROs (NIEDZIELSKA et al., 2016; POHL; LIN, 2018). Assim, avaliamos alguns parâmetros de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. Nossos resultados demonstraram diminuição da atividade da enzima antioxidante CAT e aumento da relação CAT/SOD em animais tratados com HHcy crônica leve, quando comparados ao grupo controle, sem diferença significativa nos demais parâmetros, corroborando com os achados de Wyse et al. (WYSE et al., 2020a). A enzima antioxidante SOD dismuta O_2^{*-} , gerando H_2O_2 neste processo, que é reduzido por CAT (NIEDZIELSKA et al., 2016). Nesse contexto, a redução da atividade da CAT e o desequilíbrio entre as atividades da SOD e da CAT, identificados neste estudo, sugerem que a HHcy no hipocampo não altera a atividade da SOD, que continua gerando H_2O_2 , possivelmente encontrado em quantidades excessivas, uma vez que a CAT tem sua atividade comprometida, tornando o H_2O_2 disponível para reagir com metais de transição e formar o OH^* , o radical livre mais prejudicial. Embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada nos outros parâmetros de estresse oxidativo, reconhece-se que a Hcy causa estresse oxidativo, e alterações nas defesas antioxidantes em outras estruturas cerebrais, Scherer et al. (SCHERER et al., 2011a) encontraram níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no córtex de ratos com HHcy crônica leve. Essa região é responsável por várias funções cognitivas, como memória, aprendizado e função motora (VAN ESSEN; DONAHUE; GLASSER, 2018) Recentemente, um estudo do

nosso grupo revelou que no córtex pré-frontal de ratos com HHcy leve, observa-se alteração na glutationa peroxidase, catalase e dano ao DNA, e também foram identificadas alterações no metabolismo energético na amígdala desses animais (DOS SANTOS et al., 2019a).

Em relação ao artigo II, demonstramos os mecanismos agudos da toxicidade de 30 µM de Hcy, em fatias do hipocampo. Investigamos o estresse oxidativo/nitrosativo, a homeostase cerebral e a disfunção do metabolismo da glicose no hipocampo, avaliando também a via de sinalização Akt/GSK3 β /GLUT1 e a lesão hipocampal. Além disso, até o momento, não existem terapias neuroprotetoras padronizadas contra os efeitos tóxicos da Hcy. Portanto, investigamos os efeitos protetores dos tratamentos com IB e RVT, visando abordagens neuroprotetoras por meio de vias bioquímicas que levam à lesão e morte celular.

Alterações induzidas por Hcy no estresse oxidativo têm sido amplamente estudadas em culturas de células neurais e modelos animais de doenças neurodegenerativas, como DA e Parkinson (BHATTACHARJEE; BORAH, 2016; BUKHARAeva et al., 2015; CURRÒ et al., 2014; HO et al., 2001). Uma vez produzidas em excesso, as EROs são altamente reativas com todas as macromoléculas biológicas (por exemplo, proteínas, DNA e lipídios) (ATAIE et al., 2010). As mitocôndrias são consideradas as principais fontes intracelulares de EROs, bem como alvos de estresse oxidativo (CHEN et al., 2017a). Diferentes estudos mostraram que níveis aumentados de Hcy causam um declínio nas atividades dos complexos mitocondriais (CHEN et al., 2017a; FOLBERGROVÁ et al., 2007; TIMKOVA et al., 2016). A auto-oxidação de Hcy, que causa a formação de homocistina, é a principal fonte de formação de EROs na HHcy e pode estar relacionada a deficiências mitocondriais celulares em cérebros de ratos (DOS SANTOS et al., 2019b). Em nosso estudo, observamos aumento de DCF

e diminuição de GSH, no tratamento com 30 μ M de Hcy. O metabolismo da glicose também está envolvido na modulação do estresse oxidativo (DIENEL, 2019). A glicação é uma reação espontânea envolvendo a ligação da glicose aos seus metabólitos, que resulta em produtos finais de glicação avançada (KAUR; KAMALOV; BRIMBLE, 2016). O agente glicante metilgioxal (MGO) é gerado a partir de derivados de metabólitos glicolíticos e é catabolizado pela glioxalase dependente de GSH (VICENTE MIRANDA; EL-AGNAF; OUTEIRO, 2016). Um estudo recente demonstrou que o MGO pode glicar a SOD 1 e aumentar o estresse oxidativo celular. O sistema glutationa glicosilase é responsável pela eliminação do MGO. A inibição de GSH resulta no acúmulo de MGO, levando ao aumento da glicação, que demonstrou aumentar o estresse oxidativo (POLYKRETIS et al., 2020). Esses fatores contribuem para uma melhor compreensão dos nossos resultados. Ao contrário do tratamento com 30 μ M de Hcy, o IB demonstrou atenuar os efeitos de 30 μ M de Hcy reduzindo o DCFH e aumentando os níveis basais de GSH. Um estudo realizado no hipocampo e estriado de ratos em modelo rotenona mostrou que o tratamento com IB foi capaz de restaurar as atividades das enzimas SOD e CAT em ambas as estruturas. Além disso, foi demonstrado que o IB aumenta os níveis basais de GSH, corroborando nossos resultados (ZAMINELLI et al., 2014). Esse efeito antioxidante do IB pode ser atribuído à sua possível ação necrófaga de espécies reativas ou mecanismos que induzem a síntese de GSH e/ou reduzem sua degradação. Também é possível sugerir que o IB pode atuar no controle do metabolismo da Hcy, mantendo os níveis de N-acetilcisteína via cisteína, uma vez que pode mediar a glicação, aumentando a eliminação de MGO dependente de GSH (WANG; YEE AW; STOKES, 2018). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essas possibilidades.

Além do aumento de EROs devido à auto-oxidação de Hcy, sua capacidade de

homocisteinilação de proteínas e S-nitrosilação está correlacionada com níveis aumentados de ERNs (JAKUBOWSKI, 2017; WANG; YEE AW; STOKES, 2018). No presente estudo, foi observado um aumento nos níveis de nitritos no tratamento com 30 µM de Hcy. O ONOO⁻ é uma ERN extremamente perigosa para as células, e o aumento de seus níveis pode ser inibido pela ação da SOD (citoplasmática e mitocondrial) e da GSH (reduzida pelo tratamento com 30 µM de Hcy) (RAMDIAL; FRANCO; ESTEVEZ, 2017). Além disso, a disfunção mitocondrial causa um aumento no influxo de Ca²⁺, que promove um aumento na produção de NO via ativação da NO sintase (COBB; COLE, 2015; LIU et al., 2018; SINHA et al., 2013). No entanto, o excesso de NO pode levar a uma diminuição na síntese de ATP por ação nas enzimas da respiração celular (COBB; COLE, 2015; MORRIS; BERK, 2015). Da mesma forma, um estudo mostrou que a inibição da produção de ATP pela exposição ao ONOO⁻ afeta a glicólise e a fosforilação oxidativa, o que leva à disfunção celular (URIBE et al., 2017). Paralelamente, o estresse oxidativo prejudica as enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e diminui a utilização de glicose para a biossíntese de ATP (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019a). Nosso grupo demonstrou anteriormente que HHcy leve aumentou os níveis de nitritos e diminuiu os níveis de ATP na amígdala de ratos (DOS SANTOS et al., 2019b).

Níveis reduzidos de ATP comprometem a excitabilidade neuronal via prejuízo na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase (enzima transmembrana altamente dependente de ATP), uma vez que esta enzima é responsável pela homeostase dos íons sódio e potássio (DOS SANTOS et al., 2019b). Além disso, a estimulação do receptor N-metil-d-aspartato (NMDAR) via ON pode causar um aumento na atividade de Na⁺, K⁺-ATPase (LAVINSKY; ARTENI; NETTO, 2003). Neste estudo, também observamos um aumento na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase no tratamento com 30 µM de Hcy. Esse

aumento da atividade enzimática pode levar a uma maior demanda de ATP e diminuição dos níveis de ATP, o que promove o comprometimento de outras funções celulares. Nesse contexto, reconhece-se que a Hcy pode atuar como um agonista de NMDAR, o que causa aumento da estimulação e toxicidade dos neurônios pós-sinápticos (BOLDYREV, 2005; CHOUDHURY; BORAH, 2015; GANAPATHY et al., 2011). Portanto, essa ligação Hcy-NMDAR pode estar associada ao aumento da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, observado neste estudo. Além disso, foi previamente identificado que quantidades crescentes de α2-Na⁺, K⁺-ATPase se correlacionam com um aumento de astrócitos reativos, em amostras de cérebro humano com DA e no modelo de camundongo tauopatia PS19 (YOSHIYAMA et al., 2007). Em seguida, foi demonstrado que α2-Na⁺, K⁺-ATPase é um regulador chave da neurotoxicidade de astrócitos reativos (GALLARDO; BAROWSKI; BONNI, 2016). Recentemente, foi evidenciado que a inibição farmacológica de α2-Na⁺, K⁺-ATPase suprimiu fortemente a neuroinflamação e a neurodegeneração, reduziu a atrofia cerebral e interrompeu o acúmulo de tau (MANN et al., 2022).

A via de sinalização Akt/GSK3β está envolvida na regulação do metabolismo da glicose no cérebro (ZHANG et al., 2022). A ativação de Akt pode induzir a fosforilação de GSK3β, uma alteração que inativa GSK3β (FENG et al., 2021). Observamos que o tratamento com RVT+IB aumentou a expressão da proteína p-Akt nas fatias de hipocampo de ratos tratados com 30 μM de Hcy. Além disso, RVT+IB inibiu a ativação de GSK3β induzida por 30 μM de Hcy aumentando a expressão da proteína p-GSK3β. Os níveis aumentados de Hcy causa a elevação de muitos metabólitos, como a tiolactona de homocisteína, que pode inibir a via de sinalização do receptor de insulina que inclui Akt e GSK3β (JAKUBOWSKI, 2018; NAJIB, 2001). A ligação molecular entre Hcy e a via de sinalização GSK3β foi evidenciada por um estudo que mostrou que a

tiolactona de homocisteína reduz a fosforilação induzida por insulina de GSK3 β em Ser21/9 (MANUSCRIPT, 2014; NAJIB, 2003). Além disso, outro estudo demonstrou que o estresse oxidativo ativa consideravelmente a GSK3 β no hipocampo, com diminuição dos níveis hipocampais dos componentes de sinalização Wnt (ABBAH et al., 2022). No presente estudo, demonstramos que 30 μ M de Hcy promove estresse oxidativo em fatias de hipocampo.

A investigação do papel do RVT na via Akt/GSK3 β é recente e escassa. Dois estudos realizados em modelo de camundongo com estreptozotocina intracerebroventricular demonstram que o tratamento com RVT administrado isoladamente não foi capaz de atenuar a regulação da via Akt/GSK3 β . Por outro lado, estudos demonstraram que o RVT melhorou o aprimoramento da memória mediado pela redução da disfunção mitocondrial e da neuroinflamação (AKHTAR et al., 2020; AKHTAR; BISHNOI; SAH, 2020b). Da mesma forma, o IB não produziu nenhuma melhora em camundongos superexpressando GSK3 β , sendo este um modelo de inflamação cerebral grave. Esta observação foi atribuída aos diferentes fenótipos microgliais induzidos pelo tratamento com IB (HERNÁNDEZ; RÁBANO; ÁVILA, 2014). No entanto, em células SW480 após o tratamento com IB, foi demonstrado que aumenta a fosforilação de GSK3 β , bem como aumentos concomitantes na forma ativa e fosforilada de Akt, consistente com seu papel estabelecido na inibição de GSK3 (GREENSPAN et al., 2012). Portanto, nossos resultados sugerem que o co-tratamento com RVT+IB pode induzir um efeito farmacológico sinérgico, que pode ser promissor na regulação da via Akt/GSK3 β , contra os efeitos de 30 μ M Hcy. A inativação de GSK3 (seguindo a fosforilação por Akt), além de estimular a captação de glicose, também permite a ativação da glicogênio sintase e, portanto, a síntese de glicogênio (BULLER et al., 2008; OREÑA; TORCHIA; GAROFALO, 2000). Na DA, a inibição da via cerebral

PI3K/Akt/GSK3 β mediada por insulina pode bloquear a desfosforilação da tau e exacerbar a degeneração neuronal (DUARTE et al., 2018; GIBBS et al., 2016; KLEINRidders et al., 2014).

Anormalidades no metabolismo da glicose cerebral são evidentes na patogênese de doenças neurodegenerativas, como a DA (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019b; KELLAR; CRAFT, 2020). Observamos que a captação hipocampal de glicose foi diminuída pelo grupo 30 μ M Hcy e que os níveis de glicose tenderam a diminuir. Esses resultados estão de acordo com o comprometimento da via Akt/GSK3 β /Glut1, também observado com o tratamento com 30 μ M de Hcy. Distúrbios metabólicos sistêmicos podem diminuir a captação de glicose no cérebro ao regular negativamente a expressão de GLUT1 em células endoteliais vasculares (JAIS et al., 2016). Akt ativado leva à inibição de GSK3 β por fosforilação que resulta na promoção do transporte de glicose (ALI et al., 2019; LIU et al., 2015). A inibição dessa via compromete a regulação do metabolismo e captação de glicose, o que contribui para o desenvolvimento de doenças neurológicas. Além disso, GSK3 β também está relacionado à síntese de glicogênio (LIU et al., 2015). O metabolismo do glicogênio também pode desempenhar papéis na plasticidade sináptica, aprendizado e memória (ALBERINI et al., 2018; HACKETT et al., 2016). A interrupção do metabolismo do glicogênio nos astrócitos pode ocorrer em doenças como epilepsia e DA (BAK; WALLS, 2018; ZHANG et al., 2022).

Algumas limitações devem ser consideradas neste estudo. Primeiro, observamos apenas o efeito da toxicidade da homocisteína durante a fase aguda. Este efeito neurotóxico deve ser investigado em fases posteriores deste modelo em estudos posteriores. Em segundo lugar, este estudo demonstra que o tratamento com rivastigmina 0,5 μ M e ibuprofeno 100 μ M apresenta claros efeitos neuroquímicos na

fase aguda, sob alguns parâmetros avaliados. No entanto, outras doses de tratamentos com rivastigmina e ibuprofeno poderiam ser testadas para avaliar o potencial efeito protetor de ambas as drogas sobre esses e outros parâmetros neuroquímicos, que podem ser melhor explorados. Além disso, outros protocolos seriam úteis para definir a melhor “janela” e a dose para proteção contra efeitos tóxicos com aumento dos níveis de Hcy. Por fim, além dos fatores neuroquímicos, outros parâmetros, principalmente morfológicos e eletrofisiológicos, poderiam ser avaliados para compreender a neuroproteção conferida pelas drogas utilizadas neste estudo. Como perspectiva para este estudo, sugere-se o papel da avaliação do MicroRNA (miRNA) e do RNA longo não codificante (lncRNA) na via Akt/GSK3 β /GLUT1. Sugere-se que os lncRNAs possam modular os níveis de expressão gênica por meio de diferentes mecanismos moleculares e, assim, estar associados a várias doenças (ABEDPOOR; TAGHIAN; HAJIBABAIE, 2022).

No artigo III, foi proposto para investigar os efeitos da HHcy leve crônica nos parâmetros neuroquímicos e o efeito neuroprotetor do tratamento com RVT e tratamento com IB no hipocampo de ratos machos adultos. Os resultados demonstraram que a HHcy causou aumento nos níveis de CCL5/RANTES e esta quimiocina está envolvida no processo neuroinflamatório. Uma redução nos níveis de VEGF, EGF e TrkB foi observada no hipocampo de ratos hiperhomocisteinêmicos, o que pode comprometer a neurogênese e a formação de sinapses. O tratamento com RVT demonstrou um efeito neuroprotetor ao aumentar os níveis de VEGF e TrkB contra o efeito neurotóxico da HHcy. Além disso, o IB atenuou os níveis de CCL5/RANTES contra o efeito neurotóxico da HHcy, reduzindo significativamente os níveis dessa quimiocina.

A ativação de TrkB pelo BDNF desencadeia a ativação de diferentes vias importantes envolvidas no processo de atividade sináptica e consolidação da memória (BEKINSCHTEIN et al., 2008; MINICIELLO, 2009; WANG et al., 2019c). Portanto, a via de sinalização TrkB/BDNF pode atuar como um modulador chave na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas. Diferentes estudos anteriores já mostraram que níveis aumentados de Hcy reduzem a quantidade de BDNF (BALOULA et al., 2018; MATTÉ et al., 2009; WEI et al., 2014). Além disso, há evidências de que um aumento no nível plasmático de hcy e uma diminuição significativa no nível sérico de BDNF, em pacientes com comprometimento cognitivo leve que desenvolvem doença de Alzheimer (ZHENG et al., 2016). Demonstramos pela primeira vez que níveis aumentados de Hcy diminuem os níveis de TrkB. Recentemente, estudos revelaram que a hiper-homocisteinemia leve crônica pode gerar déficits cognitivos que podem estar associados a plasticidade sináptica prejudicada e neuroinflamação exacerbada no hipocampo (RAMIRES JUNIOR et al., 2022). Assim, os resultados do presente estudo sugerem que a Hcy *in vivo* causa efeitos pró-amnésticos no hipocampo de ratos, diminuindo a disponibilidade de seu receptor e dos receptores TrkB. Também observamos que o tratamento com RVT demonstrou um efeito protetor contra o estresse induzido por Hcy, com aumento dos níveis de TrkB. Estudos com agentes anticolinesterásicos já demonstraram um aumento na fosforilação da proteína de ligação do elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina e um aumento no número de neurônios BDNF-positivos (ZHOU et al., 2016). Portanto, o RVT pode estar associado à regulação positiva da via de sinalização TrkB.

A microglia e os astrócitos são os principais reguladores das respostas inflamatórias no SNC. A ativação dessas células é categorizada como neurotóxica ou

neuroprotetora (KWON; KOH, 2020). No presente estudo, não encontramos diferenças significativas nos marcadores Iba-1 e GFAP entre os tratamentos. No entanto, outros estudos demonstram que a coloração imuno-histoquímica revelou um aumento significativo de células Iba1 e GFAP positivas com morfologia hiper-ramificada no hipocampo de animais tratados com Hcy (KUMAR; SANDHIR, 2019). Além disso, um aumento na expressão gênica e no conteúdo proteico desses marcadores também foi observado no hipocampo de animais com HHcy (CHEN et al., 2017b; KUMAR; SANDHIR, 2019; RAMIRES JUNIOR et al., 2022). O aumento da expressão de Iba-1 foi relatado em várias doenças neurodegenerativas através da produção de moléculas citotóxicas, radicais livres, citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas (SMITH et al., 2012). Paralelamente, a GFAP é uma proteína específica de astrócitos e confiável para astrogliose reativa (KAMPHUIS et al., 2012). Estudos demonstraram um aumento na gliose reativa em modelos de HHcy, em cultura de astrócitos, hipocampo e córtex frontal (BAYDAS et al., 2006; LONGONI et al., 2018). Sugerimos que no presente estudo não identificamos diferenças na coloração imuno-histoquímica porque analisamos uma região muito específica do hipocampo dorsal. Possivelmente uma análise mais ampla nos permitiria encontrar outros achados.

A quimiocina CCL5/RANTES pode contribuir para a atividade neuronal e crescimento de neuritos (CHOU et al., 2008) Esta quimiocina pode regular fisiologicamente a plasticidade sináptica do hipocampo, a cognição e a memória espacial (AJOY et al., 2021). No entanto, CCL5/RANTES tem sido identificada em doenças neurodegenerativas e é demonstrado por sua elevada expressão na microcirculação cerebral de pacientes com DA (AZIZI; KHANNAZER; MIRSHAFIEY,

2014). Em astrócitos e células endoteliais cerebrais, o estresse oxidativo pode resultar em expressão elevada de CCL5/RANTES, o que contribui para o recrutamento de células imunes e perda neuronal (BAGYINSZKY et al., 2017). Foi demonstrado que a auto-oxidação da Hcy gera o O₂⁻ (SEO et al., 2010). Nosso estudo é o primeiro a demonstrar um aumento nos níveis de CCL5/RANTES no hipocampo de ratos hiperhomocisteinêmicos. Corroborando com nosso resultado, um estudo clínico demonstrou o aumento de CCL5/RANTES no plasma de pacientes com HHcy, bem como, esta quimiocina demonstrou ser regulada positivamente nos monócitos desses pacientes com HHcy (SUN et al., 2005). Outro estudo *in vitro* recentemente indicou que, na presença de Hcy, a secreção de IL-1, IL-6 e CCL5/RANTES é aumentada por células mononucleares do sangue periférico estimuladas pelo mitógeno humano, enquanto a concentração de IL-10 é reduzida (BOROWSKA et al., 2021). Já foi demonstrado que o CCL5/RANTES induz um perfil pró-inflamatório na microglia, pois essa quimiocina aumenta a secreção de ON e atenua a produção de IL-10 e fator de crescimento de insulina 1 na microglia ativada (ŠKULJEC et al., 2011). Nós demonstramos anteriormente que o tratamento com HHcy ativa a microglia, aumenta a expressão de genes que codificam IL-1 β , IL-6 e TNF- α e reduz IL-10 (RAMIRES JUNIOR et al., 2022). Esses estudos fornecem evidências diretas da estreita relação entre o aumento dos níveis de Hcy e a intensidade da inflamação. Portanto, sugerimos que o aumento dos níveis de CCL5/RANTES no hipocampo de ratos com HHcy, encontrado neste estudo, pode ser causado pelo estresse oxidativo decorrente da auto-oxidação da Hcy. Com o aumento de CCL5/RANTES, o perfil pró-inflamatório da microglia pode ser ativado, com secreção de citocinas e atenuação de IL-10. Tais efeitos são evidenciados na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas e podem

potencializar o processo neurodegenerativo.

IB é um AINE amplamente utilizado que supostamente reduz o risco de desenvolver doenças neurodegenerativas (DONG et al., 2014). No presente estudo, identificamos que o tratamento com IB atenuou os níveis de CCL5/RANTES contra o efeito neurotóxico da HHcy. Tem sido sugerido que CCL5/RANTES atua no processo inflamatório através da via da COX, dependente da síntese de prostaglandinas (TAVARES; MIÑANO, 2000). O IB atua inibindo COX-1 e COX-2, bloqueando assim a produção de prostaglandinas (DURANKUŞ et al., 2020). Portanto, sugerimos que o efeito neuroprotetor do IB na atenuação dos níveis de CCL5/RANTES pode ser mediado pelo bloqueio da produção de prostaglandinas.

Tanto no SNC em desenvolvimento quanto no maduro, o VEGF atua como um modulador chave em vários tipos de doenças neurológicas (RELIGA et al., 2013; ZHU et al., 2020). Na DA, foi demonstrado que o efeito neuroprotetor do VEGF é potencializado na presença de biomarcadores da doença, sugerindo que essa proteína pode ser benéfica como marcador precoce da DA. Além disso, o VEGF também foi associado ao volume basal do hipocampo (HOHMAN; BELL; JEFFERSON, 2015). Recentemente, um estudo realizado por nosso grupo demonstrou que a HHcy causa atrofia hipocampal em ratos, com diminuição dos volumes hipocampais (WYSE et al., 2020b). No presente estudo, observou-se redução dos níveis de VEGF em animais com HHcy. O VEGF é um fator de crescimento multifuncional que desempenha um papel no aumento da angiogênese, aumenta a permeabilidade vascular, o que leva ao aumento na migração de macrófagos (BAGYINSZKY et al., 2017; MAASS et al., 2016). A Hcy inibe a proliferação e migração celular, resultando em diminuição da angiogênese (KIM et al., 2011; NAGAI et al.,

2001). Um estudo realizado em células endoteliais de veia umbilical humana e embriões de peixe-zebra demonstrou que o aumento dos níveis de Hcy reduziu os níveis de expressão de VEGF mRNA, VEGFR-1, VEGFR-2 e atenuou os níveis de proteína VEGF, cinase regulada por sinal extracelular (ERK)1/2 e serina/treonina quinase B (Akt) (ZHANG et al., 2012). O processo angiogênico é aprimorado pela ativação de mediadores de sinal angiogênico, como ERK e Akt, bem como pela regulação positiva da expressão de genes pró-angiogênicos, incluindo VEGF (ADYA et al., 2008; CHUNG et al., 2008; ZHANG et al., 2012). Estudos recentes mostraram que níveis aumentados de Hcy diminuem os níveis de ERK e Akt (BALOULA et al., 2018; WANG et al., 2019a; ZHOU et al., 2023). Portanto, o mecanismo de ação antiangiogênica da Hcy pode ser por inibição de VEGF, Akt e ERK. Na DA, já foi demonstrado que há desregulação da angiogênese (LAU et al., 2020).

Também examinamos o efeito do tratamento com RVT em ratos com HHcy e observamos que o RVT atenuou os efeitos do HHcy com o aumento dos níveis de VEGF. Além de inibir a atividade das colinesterases e reduzir a degradação da ACh (KUMAR; KUMAR, 2009; MÄURER et al., 2013), a RVT aumenta o fluxo sanguíneo cerebral (ROMÁN, 2005). Foi demonstrado que as colinesterases aumentam a expressão do fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α) e VEGF em um modelo de membro posterior isquêmico e promovem a angiogênese através da ativação da via de sinalização HIF-1 α /VEGF (KAKINUMA et al., 2010). Ainda mais recentemente, foi demonstrado que os efeitos do RVT na angiogênese e na circulação sanguínea parecem estar relacionados à regulação do HIF-1 α e VEGF (LIU et al., 2022). O HIF-1, uma molécula chave na regulação da homeostase do oxigênio, é um regulador vital da transcrição nuclear que promove a angiogênese (SHAFIGHI et al., 2011). Em

condições de hipóxia, acumula-se o HIF-1 α , que se liga ao HIF-1 β , que irá migrar para o núcleo e interagir com elementos de resposta à hipóxia nos promotores de genes sensíveis ao oxigênio, como o VEGF, induzindo sua transcrição (PATEL et al., 2005; WANG et al., 2014). Um estudo demonstrou que a ACh regula positivamente o HIF-1 α , induz a expressão do VEGF, promovendo assim a angiogênese para melhorar os efeitos destrutivos da isquemia e hipóxia nos cardiomiócitos (KAKINUMA et al., 2013). Esses estudos permitem sugerir que o mecanismo pelo qual o RVT atenuou os níveis de VEGF pode estar relacionado ao aumento da atividade da ACh, para regulação da via HIF-1 α /VEGF.

Aumentos sutis nos níveis cerebrais de EGF podem induzir uma resposta benéfica em pericitos, astrócitos, micróglia ou neurônios. O EGF também pode prevenir o declínio cognitivo e promover a neurogênese (THOMAS et al., 2016b). No presente estudo, foi observada a redução do EGF no hipocampo de ratos hiperhomocisteinêmicos. O EGF é eficaz na proliferação de células cerebrais, sendo este mecanismo para melhoria da memória (FIORE et al., 2002). Além disso, sugere-se que o EGF pode exercer sua ação em neurônios danificados ou não, melhorando assim as respostas comportamentais (WU; BRADSHAW, 1996). Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a HHcy leve causava déficits cognitivos na memória de trabalho e prejuízo na coordenação motora, bem como redução do volume do hipocampo. Esses achados podem estar associados à redução do EGF e sua ação na proliferação celular e na redução do dano celular, contra o efeito neurotóxico da Hcy.

6 CONCLUSÕES

Os resultados da presente tese permitem concluir que:

CAPÍTULO I:

A hiper-homocisteinemia leve crônica pode causar comprometimento da coordenação motora e gerar déficits cognitivos. Essas mudanças comportamentais podem estar associadas com plasticidade sináptica prejudicada e neuroinflamação exacerbada no hipocampo. Além disso, conseguimos mostrar um comprometimento na via anti-inflamatória colinérgica causada pelo aumento dos níveis de Hcy, o qual está envolvido no declínio da memória e aprendizado na doença de Alzheimer. Paralelamente, o tratamento com rivastigmina, medicamento já utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer, assim como o ibuprofeno, demonstram equivalências na mitigação desses danos causados pela HHcy crônica leve.

CAPÍTULO II:

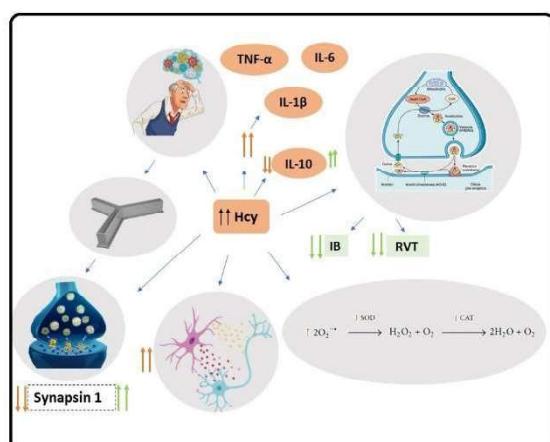
Os resultados do estudo mostraram que a toxicidade da Hcy em fatias de hipocampo pode causar prejuízos neuroquímicos no metabolismo da glicose o que pode promover doenças neurológicas. Nossos achados revelaram que níveis elevados de Hcy causa um aumento do estresse oxidativo/nitrativo, desequilíbrio na homeostase de Na⁺, K⁺-ATPase e astrogliose em fatias de hipocampo de ratos. De forma inédita, 30 µM de Hcy prejudicou a captação de glicose e reduziu os níveis do transportador GLUT1. Tais efeitos podem estar associados ao comprometimento do metabolismo da glicose pela desregulação da via de sinalização Akt/GSK3β/GLUT1, o que também foi demonstrado. O estudo apresentou novas evidências sobre os efeitos protetores de RVT e IB em fatias de hipocampo submetidas a tratamento com 30 µM de Hcy. Pela primeira vez, nossos resultados mostram que o co-tratamento RVT+IB pode modular o metabolismo da glicose celular em fatias de 30 µM Hcy do hipocampo, aumentando a

regulação da via Akt/GSK3 β /GLUT1.

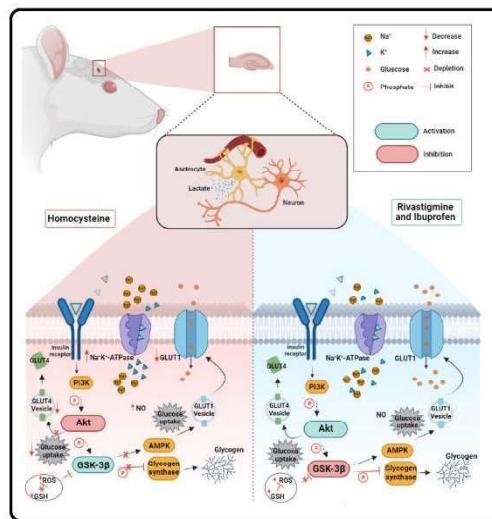
CAPÍTULO III:

Os resultados do presente estudo mostraram que a toxicidade da Hcy no hipocampo causa danos neuroquímicos à função das neurotrofinas, os quais têm sido associados à fisiopatologia de doenças neurológicas. Nossos achados revelaram que a HHcy causou um aumento significativo em CCL5/RANTES que desencadeia o aumento da neuroinflamação. De forma inédita, também foi observado que níveis aumentados de Hcy prejudicaram a angiogênese e a neurogênese com níveis reduzidos de VEGF e EGF no hipocampo. Paralelamente, também apresentamos novas evidências dos efeitos protetores do RVT e do IB sobre o efeito neurotóxico da Hcy. O RVT reverteu o efeito neurotóxico da HHcy com aumento dos níveis de TrkB e VEGF. A IB atenuou o aumento dos níveis de CCL5/RANTES causado pela HHcy.

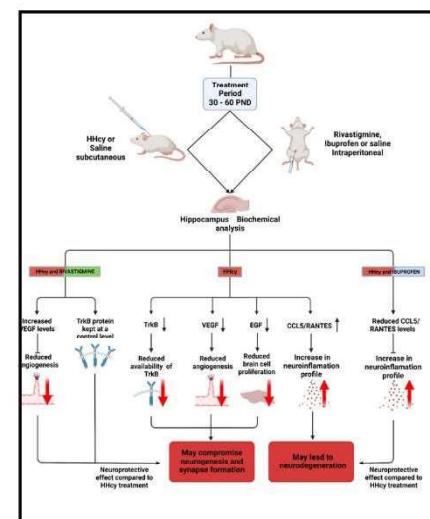
Em conjunto, nossos resultados demonstram que níveis aumentos de Hcy causa prejuízos comportamentais e neuroquímicos no hipocampo de ratos adultos



Capítulo I



Capítulo II



Capítulo III

machos. Existe uma forte associação da HHcy leve com o declínio cognitivo e atrofia cerebral, sendo essa condição um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Os mecanismos bioquímico-moleculares pelos quais a Hcy é considerada um fator de risco para essas doenças, podem estar associados aos resultados obtidos nessa tese. Sendo assim, esses resultados nos permitem sugerir que reduzir os níveis de Hcy, ou interferir nos mecanismos neuroquímicos envolvidos em sua toxicidade, podem representar potenciais estratégias terapêuticas para prevenir danos cerebrais causados por esse aminoácido. Esse estudo lança uma luz sobre os processos pelos quais HHcy pode ser reconhecido como um biomarcador de doenças neurodegenerativas. Além disso, sugere-se que RVT e IB tenham um potencial efeito neuroprotetor quando comparados ao efeito causado pelo aumento dos níveis de Hcy.

Figura 4: Resumo dos resultados do capítulo I, II e III (figuras dos artigos).

7 PERSPECTIVAS

Avaliar o efeito neurotóxico da HHcy leve em ratos macho e fêmeas, com 12 meses pós-natal, visando investigar se o fator envelhecimento potencializa os tóxicos do aumento dos níveis de Hcy:

1. avaliação das modificações epigenéticas;
2. avaliação de diferentes vias de sinalização;
3. o metabolismo da glicose;
4. níveis de aminóacidos;
5. avaliar se as alterações observadas nesta tese persistem nos animais idosos com os níveis aumentados de Hcy.

8 REFERÊNCIAS

- ABBAH, J. et al. Oxidative Stress-Induced Damage to the Developing Hippocampus Is Mediated by GSK3 β . **The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 42, n. 24, p. 4812–4827, 2022.
- ABEDPOOR, N.; TAGHIAN, F.; HAJIBABAIE, F. Cross Brain–Gut Analysis Highlighted Hub Genes and LncRNA Networks Differentially Modified During Leucine Consumption and Endurance Exercise in Mice with Depression-Like Behaviors. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 7, p. 4106–4123, 2022.
- ADYA, R. et al. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: Novel insights into visfatin-induced angiogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 78, n. 2, p. 356–365, 2008.
- AJOY, R. et al. CCL5 promotion of bioenergy metabolism is crucial for hippocampal synapse complex and memory formation. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 11, p. 6451–6468, 2021.
- AKHTAR, A. et al. Chromium picolinate attenuates cognitive deficit in ICV - STZ rat paradigm of sporadic Alzheimer ' s - like dementia via targeting neuroinflammatory and IRS - 1 / PI3K / AKT / GSK - 3 β pathway. **Inflammopharmacology**, n. 0123456789, 2020.
- AKHTAR, A.; BISHNOI, M.; SAH, S. P. Sodium orthovanadate improves learning and memory in intracerebroventricular-streptozotocin rat model of Alzheimer's disease through modulation of brain insulin resistance induced tau pathology. **Brain Research Bulletin**, v. 164, n. June, p. 83–97, 2020a.
- AKHTAR, A.; BISHNOI, M.; SAH, S. P. Sodium orthovanadate improves learning and memory in intracerebroventricular-streptozotocin rat model of Alzheimers disease through modulation of brain insulin resistance induced tau pathology. **Brain Research Bulletin**, n. July, 2020b.
- ALBERINI, C. M. et al. Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. **Glia**, v. 66, n. 6, p. 1244–1262, 2018.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.
- ALFADLY, E. D. et al. Tackling neuroinflammation and cholinergic deficit in Alzheimer's disease: Multi-target inhibitors of cholinesterases, cyclooxygenase-2 and 15-lipoxygenase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 161–186, 2019.
- ALI, M. Y. et al. Didymin, a dietary citrus flavonoid exhibits anti-diabetic complications and promotes glucose uptake through the activation of PI3K/Akt signaling pathway in insulin-resistant HepG2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 305, p. 180–194, 2019.
- ANDRA, A. et al. Effects of vitamin b12 deficiency on amyloid- β toxicity in caenorhabditis elegans. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 1–11, 2021.
- ANGUERA, J. A. et al. Video game training enhances cognitive control in older adults. **Nature**, v. 501, n. 7465, p. 97–101, 2013.
- ANNERBO, S.; WAHLUND, L. O.; LÖKK, J. The significance of thyroid-stimulating hormone

and homocysteine in the development of Alzheimer's disease in mild cognitive impairment: A 6-year follow-up study. **American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias**, v. 21, n. 3, p. 182–188, 2006.

ANTUNES WILHELM, E. et al. Correlations between behavioural and oxidative parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: Protective effect of melatonin. **European Journal of Pharmacology**, v. 701, n. 1–3, p. 65–72, 2013.

ATAIE, A. et al. Curcumin exerts neuroprotective effects against homocysteine intracerebroventricular injection-induced cognitive impairment and oxidative stress in rat brain. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 821–826, 2010.

AZIZI, G.; KHANNAZER, N.; MIRSHAFIEY, A. The potential role of chemokines in alzheimer's disease pathogenesis. **American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias**, v. 29, n. 5, p. 415–425, 2014.

BACHSTETTER, A. D. et al. Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. **Neurobiology of aging**, v. 32, n. 11, p. 2030–44, nov. 2011.

BAGYINSZKY, E. et al. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 376, p. 242–254, 2017.

BAK, L. K.; WALLS, A. B. Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 19, p. 7108–7116, 2018.

BALOULA, V. et al. Homocysteine-lowering gene therapy rescues signaling pathways in brain of mice with intermediate hyperhomocysteinemia. **Redox Biology**, v. 19, n. August, p. 200–209, 2018.

BAYDAS, G. et al. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. **Biochemistry (Moscow)**, v. 71, n. SUPPL. 1, 2006.

BAZAN, N. G. COX-2 as a multifunctional neuronal modulator. **Nature Medicine**, v. 7, n. 4, p. 414–415, 2001.

BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 49–59, 2017.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Reviews: BDNF and memory formation and storage. **Neuroscientist**, v. 14, n. 2, p. 147–156, 2008.

BELGHALI, M. et al. Loss of gait control assessed by cognitive-motor dual-tasks: pros and cons in detecting people at risk of developing Alzheimer's and Parkinson's diseases. **GeroScience**, v. 39, n. 3, p. 305–329, 2017.

BELLO-MEDINA, P. C. et al. Spatial Memory and Gut Microbiota Alterations Are Already Present in Early Adulthood in a Pre-clinical Transgenic Model of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, n. April, p. 1–18, 2021.

BESSLER, H. et al. The effect of ibuprofen on cytokine production by mononuclear cells from schizophrenic patients. **Folia Biologica (Czech Republic)**, v. 63, n. 1, p. 13–19, 2017.

BHATTACHARJEE, N.; BORAH, A. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are the underlying events of dopaminergic neurodegeneration in homocysteine rat model of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 101, p. 48–55, 2016.

BLASKO, I. et al. Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 1, p. 1–11, 2008.

BOLDYREV, A. A. Homocysteinic acid causes oxidative stress in lymphocytes by potentiating toxic effect of NMDA. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 140, n. 1, p. 33–37, 2005.

BONETTI, F.; BROMBO, G.; ZULIANI, G. The relationship between hyperhomocysteinemia and neurodegeneration. **Neurodegenerative disease management**, v. 6, n. 2, p. 133–145, 2016.

BOROVKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458–462, 2000.

BOROWSKA, M. et al. The effect of homocysteine on the secretion of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 and rantes by peripheral blood mononuclear cells—an in vitro study. **Molecules**, v. 26, n. 21, 2021.

BRAUN, D. J. et al. Microglial-associated responses to comorbid amyloid pathology and hyperhomocysteinemia in an aged knock-in mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2020.

BUKHARAeva, E. et al. Homocysteine aggravates ROS-induced depression of transmitter release from motor nerve terminals: Potential mechanism of peripheral impairment in motor neuron diseases associated with hyperhomocysteinemia. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. OCT, p. 1–8, 2015.

BULLER, C. L. et al. A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 295, n. 3, p. 836–843, 2008.

BUTTERFIELD, D. A.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 148–160, 2019a.

BUTTERFIELD, D. A.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 148–160, 2019b.

CALSOLARO, V.; EDISON, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. **Alzheimer's and Dementia**, v. 12, n. 6, p. 719–732, 2016.

CESARI, M. et al. Is homocysteine important as risk factor for coronary heart disease? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 2, p. 140–147, 2005.

CHAI, G. S. et al. Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 3, p. 388–396, 2013.

CHEN, S. et al. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction involving the crosstalk between oxidative stress and mitochondrial pSTAT3 in rat ischemic brain. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017a.

CHEN, S. et al. Homocysteine exaggerates microglia activation and neuroinflammation through microglia localized STAT3 overactivation following ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2017b.

CHOU, S. Y. et al. Expanded-polyglutamine Huntingtin protein suppresses the secretion and production of a chemokine (CCL5/RANTES) by astrocytes. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 13, p. 3277–3290, 2008.

CHOUDHURY, S.; BORAH, A. Activation of NMDA receptor by elevated homocysteine in chronic liver disease contributes to encephalopathy. **Medical Hypotheses**, v. 85, n. 1, p. 64–67, 2015.

CHUNG, B. H. et al. Icariin stimulates angiogenesis by activating the MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways in human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, n. 2, p. 404–408, 2008.

COBB, C. A.; COLE, M. P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 84, p. 4–21, 2015.

COMBS, C. K. et al. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: Inhibition of β -amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR γ agonists. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 558–567, 2000.

COMIM, C. M. et al. Rivastigmine reverses habituation memory impairment observed in sepsis survivor rats. **Shock**, v. 32, n. 3, p. 270–271, 2009.

CURRÒ, M. et al. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 8, p. 1485–1495, 2014.

DA CUNHA, A. A. et al. Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 8, p. 1660–1669, 2012.

DA SILVA MORRONE, M. et al. Passiflora manicata (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation in vitro and ex vivo models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 45–51, 2013.

DANTZERA, R. et al. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, p. 60–65, 2000.

DE ARAÚJO BOLETI, A. P. et al. Neuroinflammation: An overview of neurodegenerative and metabolic diseases and of biotechnological studies. **Neurochemistry International**, v. 136, n. November 2019, p. 104714, 2020.

DE LOS RÍOS, C. Cholinesterase inhibitors: A patent review (2007 - 2011). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, n. 8, p. 853–869, 2012.

DI MECO, A. et al. Elevated levels of brain homocysteine directly modulate the pathological phenotype of a mouse model of tauopathy. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 11, p. 1696–1706, 2019.

DIENEL, G. A. Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 949–1045, 2019.

DONG, Z. et al. Ibuprofen partially attenuates neurodegenerative symptoms in presenilin conditional double-knockout mice. **Neuroscience**, v. 270, p. 58–68, 2014.

DOS SANTOS, T. M. et al. Chronic mild Hyperhomocysteinemia impairs energy metabolism, promotes DNA damage and induces a Nrf2 response to oxidative stress in rats brain.

Cellular and Molecular Neurobiology, v. 39, n. 5, p. 687–700, 2019a.

DOS SANTOS, T. M. et al. Chronic mild Hyperhomocysteinemia impairs energy metabolism, promotes DNA damage and induces a Nrf2 response to oxidative stress in rats brain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 39, n. 5, p. 687–700, 2019b.

DOYON, J. et al. Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 1, p. 61–75, 2009.

DRAGO, F. et al. Microglia of medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) express a specific activation marker homologous to vertebrate ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1/alias aif-1). **Developmental Neurobiology**, v. 74, n. 10, p. 987–1001, 2014.

DUARTE, A. I. et al. **Brain insulin signalling, glucose metabolism and females' reproductive aging: A dangerous triad in Alzheimer's disease**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018. v. 136

DUPRET, D. et al. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, 2008.

DURANKUŞ, F. et al. Beneficial Effects of Ibuprofen on Pentylenetetrazol-induced Convulsion. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 10, p. 2409–2416, 2020.

EDER, K. et al. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. **Inflammation Research**, v. 58, n. 11, p. 727–736, 2009.

FENG, J. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications GSK-3 b / Nrf2-mediated suppression of apoptosis , oxidative stress , and inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 544, p. 22–30, 2021.

FERREIRA, F. S. et al. Kynurenic Acid Restores Nrf2 Levels and Prevents Quinolinic Acid-Induced Toxicity in Rat Striatal Slices. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 11, p. 8538–8549, 2018.

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377–388, 2015.

FOIRE, M. et al. Brain NGF and EGF administration improves passive avoidance response and stimulates brain precursor cells in aged male mice. **Physiology and Behavior**, v. 77, n. 2–3, p. 437–443, 2002.

FOLBERGROVÁ, J. et al. Mitochondrial complex I inhibition in cerebral cortex of immature rats following homocysteic acid-induced seizures. **Experimental Neurology**, v. 204, n. 2, p. 597–609, 2007.

FRISO, S. et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5606–5611, 2002.

GABRYELEWICZ, T. et al. The rate of conversion of mild cognitive impairment to dementia: Predictive role of depression. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 22, n. 6, p. 563–567, 2007.

GALLARDO, G.; BAROWSKI, J.; BONNI, A. An alpha2 Na/K ATPase/alpha-adducine

complex in astrocytes triggers non-cell autonomous neurodegeneration. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 49, n. 1, p. 48–56, 2016.

GANAPATHY, P. S. et al. The role of N-methyl-D-aspartate receptor activation in homocysteine-induced death of retinal ganglion cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 52, n. 8, p. 5515–5524, 2011.

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v. 1803, p. 57–79, 2018.

GIBBS, P. E. M. et al. Nanoparticle Delivered Human Biliverdin Reductase-Based Peptide Increases Glucose Uptake by Activating IRK/Akt/GSK3 Axis: The Peptide Is Effective in the Cell and Wild-Type and Diabetic Ob/Ob Mice. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.

GOEHLER, L. E. et al. Vagal immune-to-brain communication: A visceral chemosensory pathway. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, n. 1–3, p. 49–59, 2000.

GREENE, H. H.; SIMPSON, D.; BENNION, J. The perceptual span during foveally-demanding visual target localization. **Acta Psychologica**, v. 139, n. 3, p. 434–439, 2012.

GREENGARD, P. et al. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science**, v. 259, n. 5096, p. 780–785, 1993.

GREENSPAN, E. J. et al. NIH Public Access. v. 4, n. 1, p. 161–171, 2012.

GUZMAN-MARTINEZ, L. et al. Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. SEP, 2019.

HACKETT, M. J. et al. Concurrent glycogen and lactate imaging with FTIR spectroscopy to spatially localize metabolic parameters of the glial response following brain ischemia. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 22, p. 10949–10956, 2016.

HALASSA, M. M.; HAYDON, P. G. Integrated brain circuits: Astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 335–355, 2009.

HALDER, N.; LAL, G. Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. April, 2021.

HALLIWELL, B. Biochemistry of Oxidative Stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058–1071, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

HALLIWELL, B.; CHEAH, I. K.; TANG, R. M. Y. Ergothioneine – a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. **FEBS Letters**, v. 592, n. 20, p. 3357–3366, 2018.

HAN, B.; LI, X.; HAO, J. **The cholinergic anti-inflammatory pathway: An innovative treatment strategy for neurological diseases.** [s.l.] Elsevier Ltd, 2017. v. 77

HANNIBAL, L.; BLOM, H. J. Homocysteine and disease: Causal associations or epiphenomenons? **Molecular Aspects of Medicine**, v. 53, p. 36–42, 2017.

HÄRTEL, C. et al. Dose-dependent immunomodulatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in human whole blood: Potential role of cyclooxygenase-2 inhibition.

Scandinavian Journal of Immunology, v. 60, n. 4, p. 412–420, 2004.

HAYDON, P. G.; NEDERGAARD, M. How do astrocytes participate in neural plasticity? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 3, p. 1–16, 2015.

HENEKA, M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.

HERNÁNDEZ, F.; RÁBANO, A.; ÁVILA, J. Peripherally triggered and GSK-3 β -driven brain inflammation differentially skew adult hippocampal neurogenesis, behavioral pattern separation and microglial activation in response to ibuprofen. n. August, 2014.

HO, L. et al. Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD [4] (multiple letters). **Neurology**, v. 55, n. 2, p. 323, 2000.

HO, P. I. et al. Homocysteine potentiates β -amyloid neurotoxicity: Role of oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 2, p. 249–253, 2001.

HOHMAN, T. J.; BELL, S. P.; JEFFERSON, A. L. The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: Exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. **JAMA Neurology**, v. 72, n. 5, p. 520–529, 2015.

JACOBS, A. H.; TAVITIAN, B. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1393–1415, 2012.

JADAVJI, N. M. et al. One-carbon metabolism supplementation improves outcome after stroke in aged male MTHFR-deficient mice. **Neurobiology of Disease**, v. 132, n. June, p. 1–8, 2019.

JAIS, A. et al. Myeloid-Cell-Derived VEGF Maintains Brain Glucose Uptake and Limits Cognitive Impairment in Obesity. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 882–895, 2016.

JAKUBOWSKI, H. Homocysteine editing, thioester chemistry, coenzyme a, and the origin of coded peptide synthesis. **Life**, v. 7, n. 1, p. 1–26, 2017.

JAKUBOWSKI, H. Symposium: Homocysteine, Aging and Geriatric Disease Homocysteine Thiolactone: Metabolic Origin and Protein. n. March, p. 377–381, 2018.

JAUL, E.; BARRON, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. December, p. 1–7, 2017.

KAKINUMA, Y. et al. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 4, p. 680–693, 2010.

KAKINUMA, Y. et al. Heart-specific overexpression of choline acetyltransferase gene protects murine heart against ischemia through hypoxia-inducible factor-1 α -related defense mechanisms. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2013.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013.

KAMPHUIS, W. et al. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. **PLoS ONE**, v. 7,

n. 8, 2012.

KAPLAN, P. et al. Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 1–19, 2020.

KAUFER, D. et al. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 373–377, 1998.

KAUFMANN, W. E. et al. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2317–2321, 1996.

KAUR, D.; SHARMA, V.; DESHMUKH, R. Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 4, p. 663–677, 2019.

KAUR, H.; KAMALOV, M.; BRIMBLE, M. A. Chemical Synthesis of Peptides Containing Site-Specific Advanced Glycation Endproducts. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 10, p. 2199–2208, 2016.

KELLAR, D.; CRAFT, S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 9, p. 758–766, 2020.

KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **Journal of neurology, neurosurgery and spine**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2016.

KIM, J. et al. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. **Archives of Pharmacal Research**, v. 41, n. 4, p. 372–383, 2018.

KIM, O. J. et al. Association between VEGF polymorphisms and homocysteine levels in patients with ischemic stroke and silent brain infarction. **Stroke**, v. 42, n. 9, p. 2393–2402, 2011.

KLEINRidders, A. et al. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. **Diabetes**, v. 63, n. 7, p. 2232–2243, 2014.

KNOUSE, L. E.; SAFREN, S. A. Current status of cognitive behavioral therapy for adult attention-deficit hyperactivity disorder. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, n. 3, p. 497–509, 2010.

KOTILINEK, L. A. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid- β -mediated suppression of memory and synaptic plasticity. **Brain**, v. 131, n. 3, p. 651–664, 2008.

KOWALCZYK, M. G. AND S. A study of free radical chemistry: Their role and pathophysiological significance. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 1, p. 1–16, 2013.

KRUKEWICZ, K. et al. In vitro attenuation of astrocyte activation and neuroinflammation through ibuprofen-doping of poly(3,4-ethylenedioxypyrrole) formulations. **Bioelectrochemistry**, v. 134, p. 107528, 2020.

KUMAR, M.; SANDHIR, R. Hydrogen sulfide suppresses homocysteine-induced glial activation and inflammatory response. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 90, n. April, p. 15–28, 2019.

KUMAR, P.; KUMAR, A. Protective effect of rivastigmine against 3-nitropropionic acid-

induced Huntington's disease like symptoms: Possible behavioural, biochemical and cellular alterations. **European Journal of Pharmacology**, v. 615, n. 1–3, p. 91–101, 2009.

KUNKEL, S. L. et al. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 11, p. 5380–5384, 1988.

KURITA, H. et al. Arcuate Na⁺,K⁺-ATPase senses systemic energy states and regulates feeding behavior through glucose-inhibited neurons. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 4, p. E320–E333, 2015.

KWON, H. S.; KOH, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2020.

LAMBETH, J. D.; NEISH, A. S. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: A double-edged sword revisited. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. September 2013, p. 119–145, 2014.

LAU, S. F. et al. Single-nucleus transcriptome analysis reveals dysregulation of angiogenic endothelial cells and neuroprotective glia in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 41, p. 25800–25809, 2020.

LAVINSKY, D.; ARTENI, N. S.; NETTO, C. A. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 141, n. 1, p. 19–24, 2003.

LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 3, p. 157–172, 2021.

LI, J. G. et al. Homocysteine exacerbates β-amyloid pathology, tau pathology, and cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer disease with plaques and tangles. **Annals of Neurology**, v. 75, n. 6, p. 851–863, 2014.

LIANG, Y. Q.; TANG, X. C. Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1–3, p. 56–59, 2004.

LIU, L. et al. Astragalus polysaccharides combined with ibuprofen exhibit a therapeutic effect on septic rats via an anti-inflammatory cholinergic pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 4, p. 3127–3130, 2017.

LIU, X. L. et al. Mitochondria-mediated damage to dopaminergic neurons in Parkinson's disease (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 2, p. 615–623, 2018.

LIU, Y. et al. Rivastigmine Regulates the HIF-1α/VEGF Signaling Pathway to Induce Angiogenesis and Improves the Survival of Random Flaps in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. January, p. 1–11, 2022.

LIU, Z. Q. et al. Fumosorinone, a novel PTP1B inhibitor, activates insulin signaling in insulin-resistance HepG2 cells and shows anti-diabetic effect in diabetic KKAY mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 285, n. 1, p. 61–70, 2015.

LONG, H. Z. et al. PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. April, p. 1–20, 2021.

LONG, Y.; NIE, J. Homocysteine in Renal Injury. **Kidney Diseases**, v. 2, n. 2, p. 80–87, 2016.

LONGONI, A. et al. Homocysteine Induces Glial Reactivity in Adult Rat Astrocyte Cultures. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 1966–1976, 2018.

LÓPEZ-GAMBERO, A. J. et al. Brain Glucose-Sensing Mechanism and Energy Homeostasis. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 769–796, 2019.

LYMAN, M. et al. Neuroinflammation: The role and consequences. **Neuroscience Research**, v. 79, n. 1, p. 1–12, 2014.

MAASS, A. et al. Relationships of peripheral IGF-1, VEGF and BDNF levels to exercise-related changes in memory, hippocampal perfusion and volumes in older adults. **NeuroImage**, v. 131, p. 142–154, 2016.

MANN, C. N. et al. model. v. 14, n. 632, p. 1–25, 2022.

MANUSCRIPT, A. NIH Public Access. v. 7, n. 2, p. 140–149, 2014.

MARTÍNEZ, Y. et al. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. **Amino Acids**, v. 49, n. 12, p. 2091–2098, 2017.

MASTRONIKOLIS, S. et al. medical sciences Antioxidant Defense and Pseudoexfoliation Syndrome : An Updated Review. 2022.

MATOUSEK, S. B. et al. Cyclooxygenase-1 mediates prostaglandin E2 elevation and contextual memory impairment in a model of sustained hippocampal interleukin-1 β expression. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 1, p. 247–258, 2010.

MATSUDA, T. et al. Glucose and oxygen deprivation induces a Ca $^{2+}$ -mediated decrease in (Na $^{+}$ + K $^{+}$)-ATPase activity in rat brain slices. **Brain Research**, v. 576, n. 2, p. 263–270, 1992.

MATTÉ, C. et al. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity: Prevention by folic acid treatment. **Neuroscience**, v. 163, n. 4, p. 1039–1045, 2009.

MATTSSON, N. et al. CSF Biomarkers and Incipient Alzheimer Disease. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 302, n. 4, p. 385–393, 2009.

MÄURER, M. et al. Randomised multicentre trial on safety and efficacy of rivastigmine in cognitively impaired multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 19, n. 5, p. 631–638, 2013.

MAXWELL, J. P.; MASTERS, R. S. W.; EVES, F. F. The role of working memory in motor learning and performance. **Consciousness and Cognition**, v. 12, n. 3, p. 376–402, 2003.

MCCULLY, K. S. Homocysteine metabolism, atherosclerosis, and diseases of aging. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 1, p. 471–505, 2016.

MEHRABADI, S. et al. Hypoxic-conditioned medium from adipose tissue mesenchymal stem cells improved neuroinflammation through alternation of toll like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in model of Alzheimer's disease rats. **Behavioural Brain Research**, v. 379, n. November, p. 112362, 2020.

- MENDONÇA, L. S. et al. Ibuprofen enhances synaptic function and neural progenitors proliferation markers and improves neuropathology and motor coordination in Machado-Joseph disease models. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 22, p. 3691–3703, 2019.
- MIAO, L. et al. No causal effects of plasma homocysteine levels on the risk of coronary heart disease or acute myocardial infarction: A Mendelian randomization study. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 28, n. 2, p. 227–234, 2021.
- MICHELUCCI, A. et al. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β . **Journal of Neuroimmunology**, v. 210, n. 1–2, p. 3–12, 2009.
- MINICIELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 850–860, 2009.
- MONTECINOS-OLIVA, C. et al. Hormetic-Like Effects of L-Homocysteine on Synaptic Structure , Function , and A β Aggregation. 2020.
- MORALES, I. et al. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 1 APR, p. 1–9, 2014.
- MORRIS, G.; BERK, M. The many roads to mitochondrial dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–24, 2015.
- MOUMDJIAN, L. et al. Effectiveness of music-based interventions on motricity or cognitive functioning in neurological populations: A systematic review. **European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 53, n. 3, p. 466–482, 2017.
- MOUSTAFA, A. A. et al. Homocysteine levels in schizophrenia and affective disorders—focus on cognition. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. OCT, p. 1–10, 2014.
- NAEEM, S. et al. NSAIDs ameliorate cognitive and motor impairment in a model of parkinsonism induced by chlorpromazine. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 3, p. 801–808, 2017.
- NAGAI, Y. et al. Homocysteine inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, n. 3, p. 726–731, 2001.
- NAJIB, S. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling , and glutathione has a protective effect. p. 85–91, 2001.
- NAJIB, S. Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis : possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. v. 3, 2003.
- NIEDZIELSKA, E. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4094–4125, 2016.
- NIZRI, E. et al. Suppression of neuroinflammation and immunomodulation by the acetylcholinesterase inhibitor rivastigmine. **Journal of Neuroimmunology**, v. 203, n. 1, p. 12–22, 2008.
- NYUL-TOTH, A. et al. Early manifestation of gait alterations in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **GeroScience**, n. 0123456789, 2021.

OREÑA, S. J.; TORCHIA, A. J.; GAROFALO, R. S. Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 21, p. 15765–15772, 2000.

OSTRAKHOVITCH, E. A.; TABIBZADEH, S. Homocysteine and age-associated disorders. **Ageing Research Reviews**, v. 49, p. 144–164, 2019.

PAGE, T. H. et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Increase TNF Production in Rheumatoid Synovial Membrane Cultures and Whole Blood. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 6, p. 3694–3701, 2010.

PARK, J. et al. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF-κB pathways. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 191–196, 2015.

PATEL, T. H. et al. Constitutively active HIF-1α improves perfusion and arterial remodeling in an endovascular model of limb ischemia. **Cardiovascular Research**, v. 68, n. 1, p. 144–154, 2005.

PAVLOV, V. et al. Levels Through the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 1, p. 41–45, 2009.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 6, p. 493–499, 2005.

PI, T.; LIU, B.; SHI, J. Abnormal Homocysteine Metabolism: An Insight of Alzheimer's Disease from DNA Methylation. **Behavioural Neurology**, v. 2020, 2020.

PIERUCCINI-FARIA, F. et al. Gait variability across neurodegenerative and cognitive disorders: Results from the Canadian Consortium of Neurodegeneration in Aging (CCNA) and the Gait and Brain Study. **Alzheimer's and Dementia**, n. October 2020, p. 1–12, 2021.

POHANKA, M. Inhibitors of Cholinesterases in Pharmacology: the Current Trends. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2019.

POHL, F.; LIN, P. K. T. The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: In vitro, in vivo and clinical trials. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.

POLYDORO, M. et al. Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of Tau pathology. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 34, p. 10741–10749, 2009.

POLYKRETIS, P. et al. Methylglyoxal interaction with superoxide dismutase 1. **Redox Biology**, v. 30, n. January, p. 101421, 2020.

POPA-WAGNER, A. et al. ROS and brain diseases: The good, the bad, and the ugly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. Figure 1, 2013.

PRADO, V. F. et al. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. **Neuroscience**, v. 345, n. September, p. 130–141, 2017.

PRICE, B. R.; WILCOCK, D. M.; WEEKMAN, E. M. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, n. October, 2018.

RAMAZANI, E.; TAYARANI-NAJARAN, Z.; FEREIDONI, M. Celecoxib, indomethacin and ibuprofen prevent 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell death through the inhibition of NF κ B and SAPK/JNK pathways. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 5, p. 477–484, 2019.

RAMDIAL, K.; FRANCO, M. C.; ESTEVEZ, A. G. Cellular mechanisms of peroxynitrite-induced neuronal death. **Brain Research Bulletin**, v. 133, p. 4–11, 2017.

RAMIRES JUNIOR, O. V. et al. Rivastigmine Reverses the Decrease in Synapsin and Memory Caused by Homocysteine: Is There Relation to Inflammation? **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 7, p. 4517–4534, 2022.

RELIGA, P. et al. VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. **Scientific Reports**, v. 3, 2013.

REN, C. et al. Sepsis-associated encephalopathy: A vicious cycle of immunosuppression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2020.

REVATHIKUMAR, P. et al. Immunomodulatory effects of nicotine on interleukin 1 β activated human astrocytes and the role of cyclooxygenase 2 in the underlying mechanism. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.

RICHTER-LEVIN, G.; SEGAL, M. The effects of serotonin depletion and raphe grafts on hippocampal electrophysiology and behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 1585–1596, 1991.

RINAMAN, L.; COMER, J. Antagonism of central glucagon-like peptide-1 receptors enhances lipopolysaccharide-induced fever. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, n. 1–3, p. 98–101, 2000.

ROCHA-DIAS, P. F. et al. Influence of a genetic variant of CHAT gene over the profile of plasma soluble ChAT in Alzheimer disease. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 4, p. 1–6, 2020.

ROIG, M. et al. A Single Bout of Exercise Improves Motor Memory. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 28–32, 2012.

ROMÁN, G. C. Rivastigmine for subcortical vascular dementia. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 5, n. 3, p. 309–313, 2005.

RUCCO, R. et al. Spatio-temporal and kinematic gait analysis in patients with Frontotemporal dementia and Alzheimer's disease through 3D motion capture. **Gait and Posture**, v. 52, p. 312–317, 2017.

SADE YAZDI, D. et al. Homocysteine fibrillar assemblies display cross-talk with Alzheimer's disease β -amyloid polypeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 24, 2021.

SAIKI, P. et al. Real-time monitoring of IL-6 and IL-10 reporter expression for anti-inflammation activity in live RAW 264.7 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 505, n. 3, p. 885–890, 2018.

SAVION-LEMIEUX, T.; PENHUNE, V. B. The effects of practice and delay on motor skill learning and retention. **Experimental Brain Research**, v. 161, n. 4, p. 423–431, 2005.

SCHERER, E. B. S. et al. Development of an animal model for chronic mild

hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 7, p. 693–699, 2011a.

SCHERER, E. B. S. et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 7, p. 693–699, 2011b.

SCHERER, E. B. S. et al. Mild hyperhomocysteinemia reduces the activity and immunocontent, but does not alter the gene expression, of catalytic α subunits of cerebral Na⁺,K⁺-ATPase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 378, n. 1–2, p. 91–97, 2013.

SCHERER, E. B. S. et al. Mild Hyperhomocysteinemia Increases Brain Acetylcholinesterase and Proinflammatory Cytokine Levels in Different Tissues. **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 2, p. 589–596, 2014.

SEEGER, M. A.; PALLER, A. S. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 4, p. 213–224, 2015.

SEO, H. et al. Contribution of dietary intakes of antioxidants to homocysteine-induced low density lipoprotein (LDL) oxidation in atherosclerotic patients. **Yonsei Medical Journal**, v. 51, n. 4, p. 526–533, 2010.

SHAFIGHI, M. et al. Dimethyloxalylglycine stabilizes HIF-1 α in cultured human endothelial cells and increases random-pattern skin flap survival in vivo. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 128, n. 2, p. 415–422, 2011.

SHOHAMI, E. et al. Antisense prevention of neuronal damages following head injury in mice. **Journal of Molecular Medicine**, v. 78, n. 4, p. 228–236, 2000.

SINHA, K. et al. Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1157–1180, 2013.

ŠKOVIEROVÁ, H. et al. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1–18, 2016.

ŠKULJEC, J. et al. CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in vitro. **Cellular Immunology**, v. 270, n. 2, p. 164–171, 2011.

SLUTSKY, I. et al. Enhancement of Learning and Memory by Elevating Brain Magnesium. **Neuron**, v. 65, n. 2, p. 165–177, 2010.

SMITH, J. A. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 1, p. 10–20, 2012.

SPANGENBERG, E. E.; GREEN, K. N. Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 61, p. 1–11, 2017.

STOLINA, M. et al. Specific Inhibition of Cyclooxygenase 2 Restores Antitumor Reactivity by Altering the Balance of IL-10 and IL-12 Synthesis. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 1, p. 361–370, 2000.

SUABJAKYONG, P. et al. Structural characterization and immunomodulatory effects of polysaccharides from Phellinus linteus and Phellinus igniarius on the IL-6/IL-10 cytokine

balance of the mouse macrophage cell lines (RAW 264.7). **Food and Function**, v. 6, n. 8, p. 2834–2844, 2015.

SUDDUTH, T. L. et al. Neurovascular astrocyte degeneration in the hyperhomocysteinemia model of vascular cognitive impairment and dementia (VCID). **Neuroscience**, v. 341, p. 42–51, 2017.

SUN, W. et al. Chemokine RANTES is upregulated in monocytes from patients with hyperhomocysteinemia. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 11, p. 1317–1321, 2005.

TARAFDAR, A.; PULA, G. The role of NADPH oxidases and oxidative stress in neurodegenerative disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

TAVARES, E.; MIÑANO, F. J. RANTES: A new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 12, p. 2505–2513, 2000.

TAWFIK, A. et al. Homocysteine and age-related central nervous system diseases: Role of inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2021.

TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISSLINGER, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2057–2072, 2001.

TESSARI, P. et al. Decreased homocysteine trans-sulfuration in hypertension with hyperhomocysteinemia: Relationship with insulin resistance. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 103, n. 1, p. 56–63, 2018.

THOMAS, R. et al. Acute Exercise and Motor Memory Consolidation: The Role of Exercise Timing. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016a.

THOMAS, R. et al. Epidermal growth factor prevents APOE4 and amyloid-beta-induced cognitive and cerebrovascular deficits in female mice. **Acta neuropathologica communications**, v. 4, n. 1, p. 111, 2016b.

TIMKOVA, V. et al. Effects of mild hyperhomocysteinemia on electron transport chain complexes, oxidative stress, and protein expression in rat cardiac mitochondria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 411, n. 1–2, p. 261–270, 2016.

TOCCO, G. et al. Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: Implications for Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, v. 144, n. 2, p. 339–349, 1997.

TOSTO, G. et al. Pattern of extrapyramidal signs in Alzheimer's disease. **Journal of Neurology**, v. 262, n. 11, p. 2548–2556, 2015.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–9, 2002.

TRAIFFORT, E. et al. Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. **Journal of Neurochemistry**, v. 92, n. 5, p. 1116–1125, 2005.

TRÖGER, B. et al. Modulation of *S. epidermidis*-induced innate immune responses in neonatal whole blood. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 2, p. 240–249, 2020.

URIBE, P. et al. Nitrosative stress by peroxynitrite impairs ATP production in human

spermatozoa. **Andrologia**, v. 49, n. 3, p. 1–8, 2017.

VAN ESSEN, D. C.; DONAHUE, C. J.; GLASSER, M. F. Development and evolution of cerebral and cerebellar cortex. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 91, n. 3, p. 158–169, 2018.

VEERANKI, S.; TYAGI, S. C. Defective homocysteine metabolism: Potential implications for skeletal muscle malfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 15074–15091, 2013.

VICENTE MIRANDA, H.; EL-AGNAF, O. M. A.; OUTEIRO, T. F. Glycation in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. **Movement Disorders**, v. 31, n. 6, p. 782–790, 2016.

VISRAM, M. et al. Homocysteine regulates fatty acid and lipid metabolism in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 15, p. 5544–5555, 2018.

VIZUETE, A. F. K. et al. GABA A Modulation of S100B Secretion in Acute Hippocampal Slices and Astrocyte Cultures. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 2, p. 301–311, 2019.

WALLENQUIST, U. et al. Ibuprofen attenuates the inflammatory response and allows formation of migratory neuroblasts from grafted stem cells after traumatic brain injury. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 9–19, 2012.

WANG, B.; YEE AW, T.; STOKES, K. Y. N-acetylcysteine attenuates systemic platelet activation and cerebral vessel thrombosis in diabetes. **Redox Biology**, v. 14, n. September 2017, p. 218–228, 2018.

WANG, C. et al. Local injection of deferoxamine improves neovascularization in ischemic diabetic random flap by increasing HIF-1 α and VEGF expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 3–10, 2014.

WANG, M. et al. Homocysteine enhances neural stem cell autophagy in in vivo and in vitro model of ischemic stroke. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 8, 2019a.

WANG, Q. et al. Block of Long-Term Potentiation by Naturally Secreted and Synthetic Amyloid β -Peptide in Hippocampal Slices Is Mediated via Activation of the Kinases c-Jun N-Terminal Kinase, Cyclin-Dependent Kinase 5, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase as well as M. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 13, p. 3370–3378, 2004.

WANG, Y. et al. Icariin Attenuates M1 Activation of Microglia and A β Plaque Accumulation in the Hippocampus and Prefrontal Cortex by Up-Regulating PPAR γ in Restraint/Isolation-Stressed APP/PS1 Mice. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. March, p. 1–16, 2019b.

WANG, Z. H. et al. Deficiency in BDNF/TrkB Neurotrophic Activity Stimulates δ -Secretase by Upregulating C/EBP β in Alzheimer's Disease. **Cell Reports**, v. 28, n. 3, p. 655–669.e5, 2019c.

WARREN, H. S. et al. Resilience to bacterial infection: Difference between species could be due to proteins in serum. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 2, p. 223–232, 2010.

WEBER, G. J. et al. **Homocysteine and hydrogen sulfide in epigenetic, metabolic and microbiota related renovascular hypertension**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 113

WEI, H. J. et al. Hydrogen sulfide inhibits homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal apoptosis in rat hippocampus via upregulation of the BDNF-TrkB pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 6, p. 707–715, 2014.

WINTER, A. N. et al. Two forms of CX3CL1 display differential activity and rescue cognitive deficits in CX3CL1 knockout mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2020.

WU, Y. Y.; BRADSHAW, R. A. Synergistic induction of neurite outgrowth by nerve growth factor or epidermal growth factor and interleukin-6 in PC12 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 22, p. 13033–13039, 1996.

WYSE, A. T. S. et al. Chronic mild hyperhomocysteinemia induces anxiety-like symptoms, aversive memory deficits and hippocampus atrophy in adult rats: New insights into physiopathological mechanisms. **Brain Research**, v. 1728, n. December 2019, p. 146592, 2020a.

WYSE, A. T. S. et al. Chronic mild hyperhomocysteinemia induces anxiety-like symptoms, aversive memory deficits and hippocampus atrophy in adult rats: New insights into physiopathological mechanisms. **Brain Research**, v. 1728, p. 146592, 2020b.

XING, Z. et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 311–320, 1998.

YAMADA, T. et al. Functional expression of choline transporter-like protein 1 (CTL1) in human neuroblastoma cells and its link to acetylcholine synthesis. **Neurochemistry International**, v. 58, n. 3, p. 354–365, 2011.

YE, Z. et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia and its association with target organ damage in chinese patients with chronic kidney disease. **Nutrients**, v. 8, n. 10, 2016.

YOSHIYAMA, Y. et al. Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. **Neuron**, v. 53, n. 3, p. 337–351, 2007.

YUSTE, J. E. et al. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. AUGUST, p. 1–13, 2015.

ZAMINELLI, T. et al. Antidepressant and Antioxidative Effect of Ibuprofen in the Rotenone Model of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, v. 26, n. 4, p. 351–362, 2014.

ZHANG, B. et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 707–720, 2013.

ZHANG, Q. et al. Homocysteine-impaired angiogenesis is associated with VEGF/VEGFR inhibition. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 10.2741/e563, 2012.

ZHANG, S. et al. Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. **Progress in Neurobiology**, v. 204, p. 102089, set. 2021.

ZHANG, S. et al. and diseases. p. 1–53, 2022.

ZHAO, Q. et al. Phenotypic dysregulation of microglial activation in young offspring rats with maternal sleep deprivation-induced cognitive impairment. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–9, 2015.

ZHENG, L. et al. Conversion from MCI to AD in patients with the APOE ε4 genotype: Prediction by plasma HCY and serum BDNF. **Neuroscience Letters**, v. 626, p. 19–24, 2016.

ZHENG, W. et al. Acetylcholine ameliorates colitis by promoting IL-10 secretion of monocytic myeloid-derived suppressor cells through the nAChR/ERK pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 11, p. 1–9, 2021.

ZHOU, D. et al. DL0410, a novel dual cholinesterase inhibitor, protects mouse brains against A β -induced neuronal damage via the Akt/JNK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 37, n. 11, p. 1401–1412, 2016.

ZHOU, Z. Y. et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate protects against hyperhomocysteine-induced vascular endothelial injury via activation of NNMT/SIRT1-mediated NRF2/HO-1 and AKT/MAPKs signaling in human umbilical vascular endothelial cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 158, n. December 2022, p. 114137, 2023.

ZHU, L. et al. Role of NDEL1 and VEGF/VEGFR-2 in Mouse Hippocampus After Status Epilepticus. **ASN Neuro**, v. 12, 2020.

ANEXO

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS (CEUA/UFRGS)



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

CEUA
UFRGS

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36991

Título: Investigação dos efeitos neurotóxicos da hiper-homocisteinemia leve experimental: possível papel neuroprotetor do ibuprofeno e da rivastigmina

Vigência: 30/05/2019 à 29/05/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANGELA TEREZINHA DE SOUZA WYSE - coordenador desde 30/05/2019
Osmar Vieira Ramires Júnior - Aluno de Doutorado desde 30/05/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 10/06/2019 - Sala 219 C do Prédio do Instituto de ciências Básicas da Saúde - ICBS - Campus Centro UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre/RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 404 ratos Wistar (Rattus norvegicus) machos, com 30 dias de idade, provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 25 de Junho de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética