

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

**Alterações bioquímicas e comportamentais em ratos submetidos ao  
modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia.**

EMILIO LUIZ STRECK

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Angela Terezinha de Souza Wyse

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial  
à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2003

*Às três pessoas mais importantes da minha vida,*

*Gisela, minha mãe e incentivadora,  
Edson, meu pai e grande companheiro,*

*e  
Cuca, minha namorada, que Deus colocou na minha vida  
e com quem eu quero, em breve, construir uma família.*

## Desconstrução

Suspendo o cerebelo  
com dois andaimes de ar;  
por baixo meu escalpelo  
vai cortando devagar.  
Ouço o cérebro gritar  
inconsistentes promessas:  
hipocampos são peças  
de um simples jogo de armar.  
Hipotálamo dissecado,  
esfera de luz amarela  
deixa vazio o seu lar  
e o corpo estriado revela.  
E tudo está separado,  
cada órgão isolado,  
limpo, medido e pesado.  
Memória, emoção, pensamento,  
procuro a cada momento.  
Encontro alguns compostos,  
muitos restos decompostos.  
Vida ceifada tristemente  
procurando inutilmente  
na matéria inútil, a mente.

Clovis Wannmacher

## *Agradecimentos*

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Angela, pela amizade, ajuda, compreensão e sabedoria com que orientou esse trabalho.

Ao Prof. Clóvis, pela amizade e pelas longas conversas sobre a vida e sobre futebol.

Ao Prof. Moacir, pela amizade e pelo apoio fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dutra “campeão”, pelo convívio e pela amizade.

Aos Profs. Sarkis, Alex, Carmen e a Fernanda, pela colaboração, disponibilidade, amizade e paciência.

Às minhas bolsistas de iniciação científica, Cuca, Barbara, Cris e Paula, pela ajuda constante e incansável.

Aos colegas do laboratório “34A”, Dani, Débora, Renata, Franci, Siomara, Caren, Cris, Fábria, Thiago e Marcelo, pelo convívio, amizade e apoio.

À Sonja, Zilda e Eleonora, pelo coleguismo.

Aos colegas e amigos do laboratório “34C”, em especial à Virgínia, Luciane, Andrea (e Augusto) e Carmen, pelo excelente ambiente de trabalho e pela amizade.

Aos colegas do laboratório 36, em especial à Cláudia, Angela, Carla e Karina, e aos colegas do laboratório 38, em especial ao César, Patrícia, Karina, Guilhian, Vânia, Alethea, Rafael, Dênis, Vilson, Leticia e Alexandra, pela parceria e pelos momentos de descontração.

À Cleide, minha primeira “chefe”, pela amizade e incentivo constantes.

Aos meus amigos e colegas de longa data, Eddie, Jesus, Diogo e Tiagão.

À Carol, minha irmãzinha, por estar sempre ao meu lado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela formação e pela possibilidade de realizar esse trabalho de pesquisa.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

A toda minha família, Oma, Vô Lindolfo (que me cuida lá de cima), Vô Nelson, Vô Arlanda, Tia Marli, Tio Jonas, Tio Chico, Tia Gleci, Tio Ruy, Tia Dargite, Tio Hugo e Tia Carmen, aos primos Douglas, Thiago, Mateus, Lucas, Jonathas, Rafael, Samuel e às primas Aline (e Rogério), Pupi e Ane.

À família da Cuca, por ter me recebido tão bem.

Aos meus pais, meus primeiros orientadores, meus maiores torcedores e a quem eu devo tudo o que eu sou hoje.

À Cuca, meu maior amor, pela alegria que ela coloca na minha vida todos os dias, pelo carinho, compreensão e amor.

A Deus, por tornar tudo isso possível.

## Resumo

A homocistinúria é uma doença metabólica hereditária causada pela deficiência severa na atividade da enzima cistationina  $\beta$ -sintase e é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual de homocisteína e metionina. Retardo mental, deficiência cognitiva, isquemia, convulsões e aterosclerose são achados clínicos comuns em pacientes homocistinúricos. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos da doença são pouco conhecidos.

Modelos animais experimentais de erros inatos do metabolismo são úteis para compreender a fisiopatologia dessas doenças em humanos. No nosso laboratório, já foram criados alguns modelos animais de algumas doenças metabólicas hereditárias, como, por exemplo, fenilcetonúria e hiperprolinemia tipo II.

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é uma enzima fundamental responsável pela manutenção do gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal e consome de 40 a 60% do ATP formado no cérebro. Essa enzima é inibida por radicais livres e sua atividade está diminuída na isquemia cerebral, epilepsia e em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.

A diminuição de energia cerebral e o estresse oxidativo têm sido associados com algumas doenças que afetam o sistema nervoso central, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington e isquemia cerebral. Por outro lado, a homocisteína tem sido considerada um fator de risco para o aparecimento dessas doenças.

No sentido de ampliar o conhecimento das alterações bioquímicas envolvidas na gênese da disfunção neurológica característica da homocistinúria, esse trabalho teve como principal objetivo desenvolver um modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia em ratos. Utilizando esse modelo, verificamos a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e alguns parâmetros de metabolismo energético (produção de  $\text{CO}_2$ , captação de glicose, produção de lactato e atividades das enzimas succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase) em hipocampo de ratos. A aprendizagem e a memória na tarefa do labirinto aquático de Morris foram avaliadas em ratos submetidos ao modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia. Nesse trabalho, também estudamos o efeito *in vitro* dos metabólitos acumulados na homocistinúria, homocisteína e metionina, sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e sobre alguns parâmetros de metabolismo energético (produção de  $\text{CO}_2$ , captação de glicose, produção de lactato e atividade da enzima citocromo *c* oxidase). Além disso, o efeito *in vitro* da homocisteína sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (potencial antioxidante total (TRAP), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) em hipocampo de ratos foi investigado.

O tratamento crônico foi realizado do 6º ao 28º dia de vida, através de administrações subcutâneas de homocisteína, duas vezes ao dia, com intervalos de 8 horas. As doses de homocisteína administradas foram escolhidas com o objetivo de induzir concentrações plasmáticas de 0,4 a 0,5 mM, semelhantes às aquelas encontradas em pacientes homocistinúricos. Através desse tratamento, também foram induzidas concentrações elevadas de homocisteína no cérebro de ratos. Os controles receberam solução salina em volumes semelhantes.

Os resultados mostram que a administração crônica de homocisteína inibiu a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica, a produção de  $\text{CO}_2$  e a captação de glicose, assim como as atividades das enzimas succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase em hipocampo de ratos. Os animais tratados com homocisteína também apresentaram diminuição de memória na tarefa do labirinto aquático de Morris. Além disso, a homocisteína e a metionina inibiram a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de hipocampo de ratos *in vitro*. Estudos cinéticos sobre a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, causada pela homocisteína, também foram realizados. Os resultados mostraram que a homocisteína inibe a enzima de forma não-competitiva com o ATP como substrato. Também foi verificado que a incubação de homogeneizados de hipocampo com homocisteína diminuiu a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e que a incubação simultânea com alguns antioxidantes, tais como glutathione, ditiotreitol, cisteína e a enzima antioxidante superóxido dismutase preveniram esse efeito. Os metabólitos acumulados na homocistinúria também alteraram alguns parâmetros de metabolismo energético cerebral (produção de  $\text{CO}_2$  e lactato, captação de glicose e atividades das enzimas succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase) *in vitro*. Além disso, verificou-se que a homocisteína *in vitro* diminuiu o TRAP e aumentou a quantidade de TBARS, um marcador de lipoperoxidação, mas não alterou as atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase.

Os achados sugerem que a inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, a diminuição do metabolismo energético e o aumento do estresse oxidativo podem estar relacionados com as disfunções neurológicas características dos pacientes homocistinúricos.

## *Abstract*

Homocystinuria is an inherited metabolic disease caused by severe deficiency of cystathionine  $\beta$ -synthase activity and is biochemically characterized by tissue accumulation of homocysteine and methionine. Mental retardation, cognitive deficiency, ischemia, seizures and atherosclerosis whose mechanisms are not clearly understood are common symptoms in homocystinuric patients.

Animal experimental models of inborn errors of metabolism are useful to better understand the physiopathology of human diseases. We have developed, in our laboratory, animal models for some inherited metabolic disorders, such as phenylketonuria and hyperprolinemia type II.

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is a fundamental enzyme responsible for maintaining the ionic gradient necessary for neuronal excitability, which consumes 40-60% of the ATP generated in the brain. The enzyme is inhibited by free radicals and its activity is decreased in cerebral ischemia, in epilepsy and in various neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease.

Impairment of brain energy metabolism and oxidative stress were found to be associated to some diseases that affect the central nervous system, such as Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases and brain ischemia. Homocysteine is also considered a strong risk factor for the development of these diseases.

In order to better understand the mechanisms underlying the neurological dysfunction characteristic of homocystinuric patients, the main objective in this work was to develop a chemically-induced experimental model of hyperhomocysteinemia in rats. By using this model, we verified  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity and some parameters of brain energy metabolism ( $\text{CO}_2$  production, glucose uptake, lactate release and the activities of succinate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase) in hippocampus of rats. Learning and memory on Morris water maze task were evaluated in rats subjected to chemically-induced experimental model of hyperhomocysteinemia. In this work, we also studied the *in vitro* effect of metabolites accumulating in homocystinuria, homocysteine and methionine, on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity and some parameters of brain energy metabolism ( $\text{CO}_2$  production, glucose uptake, lactate release and the activity of cytochrome *c* oxidase) in hippocampus of rats. Besides, the *in vitro* effect of homocysteine on some parameters of oxidative (total radical antioxidant potential (TRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the activities of antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) in hippocampus of rats was investigated.

Chronic treatment was performed from the 6<sup>th</sup> to the 28<sup>th</sup> day of life, by subcutaneous administration of Hcy, twice a day, at 8 h intervals. Doses of homocysteine administered to the rats were chosen in order to induce plasma levels of 0.4-0.5 mM, similar to those described in homocystinuric patients. By this treatment, we also produced high sustained levels of homocysteine in brain of rats. Control rats received saline in the same volumes.

Our results showed that chronic administration of homocysteine inhibited  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity from synaptic plasma membrane,  $\text{CO}_2$  production and glucose uptake, as well as succinate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase activities in hippocampus of rats. Homocysteine-treated rats also presented impaired performance on

Morris water maze task. Besides, homocysteine and methionine inhibited  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity from synaptic plasma membrane of rat hippocampus *in vitro*. Kinetic studies on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition by homocysteine were also performed. Our results showed that homocysteine inhibits the enzyme in a non-competitive type with ATP as substrate. We also verified that incubation of homogenates of hippocampus with homocysteine diminished  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity and that simultaneous incubation with some antioxidants such as glutathione, dithiothreitol, cysteine and the antioxidant enzyme superoxide dismutase prevented this effect. Both metabolites accumulated in homocystinuria also affected brain energy metabolism parameters ( $\text{CO}_2$  production, lactate release, glucose uptake and succinate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase activities) *in vitro*. Finally, we verified that homocysteine *in vitro* also diminished TRAP and increased TBARS, an index of lipid peroxidation, but did not alter the activities of antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase.

Our findings suggest that  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition, impairment of brain energy metabolism and increased oxidative stress may be related to the neurological dysfunction characteristic of homocystinuric patients.

## *Lista de Abreviaturas*

- AdoHcy – S-adenosil homocisteína  
AdoMet – S-adenosil metionina  
ATP – adenosina trifosfato  
CAT – catalase  
CBS – cistationina  $\beta$ -sintase  
CO<sub>2</sub> – gás carbônico  
Cu-Zn-SOD – superóxido dismutase que contém cobre e zinco  
DNA – ácido desoxirribonucléico  
EC-SOD – superóxido dismutase extracelular  
EIM – erros inatos do metabolismo  
ERO – espécies reativas de oxigênio  
ERN – espécies reativas de nitrogênio  
FADH<sub>2</sub> – flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)  
GABA – ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GPX – glutaciona peroxidase  
GR – glutaciona redutase  
GSH – glutaciona reduzida  
GSSG – glutaciona oxidada  
GTP – guanosina trifosfato  
H<sup>+</sup> - próton  
H<sub>2</sub>O – água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
ITP – inosina trifosfato  
LDL – lipoproteína de baixa densidade (low density lipoprotein)  
LOOH – lipoperóxidos  
LPO – lipoperoxidação  
Mn-SOD – superóxido dismutase que contém manganês  
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NMDA – *N*-metil-D-aspartato

O<sub>2</sub> – oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – ânion superóxido

SDH – succinato desidrogenase

SOD – superóxido dismutase

UTP – uridina trifosfato

## ***Lista de Figuras***

Figura 1.1. Bloqueio de uma rota metabólica .....	17
Figura 2.1. Metabolismo da homocisteína .....	21
Figura 2.2. Distribuição da homocisteína no plasma .....	23
Figura 3.1. Deficiência da enzima cistationina β-sintase .....	27
Figura 4.1. Estrutura da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	40
Figura 4.2. Mecanismo de reação da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	42
Figura 5.1. Destinos da glicose .....	47
Figura 5.2. Ciclo de Krebs .....	48
Figura 5.3. Cadeia respiratória mitocondrial .....	50
Figura 6.1. Estresse oxidativo .....	59

## ***Lista de Tabelas***

Tabela 1. Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo afetada ....	18
--	----

## Sumário

I. INTRODUÇÃO .....	15
1. Erros Inatos do Metabolismo .....	16
1.1. Histórico .....	16
1.2. Conceito .....	16
1.3. Classificação e frequência .....	17
1.4. Sintomatologia .....	18
2. Homocisteína .....	19
2.1. Metabolismo da homocisteína .....	19
2.2. Controle do metabolismo da homocisteína .....	20
2.3. Distribuição da homocisteína no plasma .....	22
2.4. Auto-oxidação da homocisteína .....	23
2.5. Homocisteína em doenças que afetam o sistema nervoso central .....	24
3. Homocistinúria .....	25
3.1. Histórico .....	25
3.2. Conceito e frequência .....	26
3.3. Aspectos bioquímicos .....	26
3.4. Aspectos genéticos .....	28
3.5. Achados clínicos .....	28
3.6. Aspectos fisiopatológicos .....	29
3.7. Diagnóstico .....	33
3.8. Tratamento .....	34
4. Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	36
4.1. Histórico .....	36
4.2. Conceito, função e estrutura .....	37
4.3. Mecanismo de reação .....	41
4.4. Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase e disfunção cerebral .....	42
5. Metabolismo energético .....	45
5.1. Histórico .....	45
5.2. Destinos da glicose e Ciclo de Krebs .....	46
5.3. Cadeia respiratória .....	49
5.4. Metabolismo energético e doenças neurodegenerativas .....	50
6. Radicais Livres .....	51
6.1. Histórico .....	51
6.2. Definição .....	52
6.3. Efeito dos radicais livres em sistemas biológicos .....	53
6.4. Defesas antioxidantes .....	53
6.4.1. Superóxido dismutase (SOD) .....	54
6.4.2. Catalase (CAT) .....	55
6.4.3. Glutathiona peroxidase (GPX) .....	56
6.4.4. Glutathiona reduzida (GSH) .....	56
6.4.5. α-Tocoferol (vitamina E) .....	57
6.4.6. Ácido ascórbico (vitamina C) .....	57
6.5. Estresse oxidativo .....	58
6.6. Radicais livres e doenças neurodegenerativas .....	60

7. Memória .....	61
7.1. Conceito .....	61
7.2. Homocisteína e memória .....	62
7.3. Labirinto Aquático de Morris .....	62
II. OBJETIVOS .....	64
III. RESULTADOS .....	67
<b>Artigo 1:</b> Reduction of Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. ....	68
<b>Artigo 2:</b> Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia .....	69
<b>Artigo 3:</b> Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. ....	70
<b>Artigo 4:</b> Inhibition of Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. ....	71
<b>Artigo 5:</b> Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. ....	72
<b>Artigo 6:</b> In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. ....	73
<b>Artigo 7:</b> On the mechanism of the inhibition of Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity caused by homocysteine. ....	74
<b>Artigo 8:</b> Inhibition of rat brain Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. ....	75
IV. DISCUSSÃO .....	76
V. CONCLUSÕES .....	95
VI. PERSPECTIVAS .....	98
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100

## **I. INTRODUÇÃO**

## **1. Erros Inatos do Metabolismo**

### *1.1. Histórico*

Em 1908, Archibald Garrod verificou que irmãos, filhos de pais normais e consangüíneos, excretavam quantidades elevadas de ácido homogentísico e que essa “condição” tinha uma distribuição familiar. Esses casos poderiam ser explicados por defeitos hereditários e de herança autossômica recessiva, baseado nas leis de Mendel. A partir de suas observações, Garrod desenvolveu o conceito de que algumas doenças ocorriam por causa da deficiência de uma enzima responsável por uma rota metabólica. A alcaptonúria, por exemplo, acontece por uma deficiência na oxidação do ácido homogentísico, um metabólito da tirosina. Além da alcaptonúria, Garrod estudou casos de cistinúria, pentosúria e albinismo.

Em 1945, Beadle desenvolveu a teoria “um gene – uma enzima”, onde um gene específico está relacionado à síntese de uma cadeia polipeptídica específica. Assim, um defeito genético levaria a um defeito enzimático, esclarecendo a causa dos erros inatos do metabolismo (EIM), como, por exemplo, defeitos em genes que codificam as enzimas envolvidas em determinadas rotas metabólicas (SCRIVER et al., 2001).

### *1.2. Conceito*

Os EIM são doenças hereditárias causadas por uma deficiência parcial ou total de uma proteína, geralmente uma enzima. A deficiência ou ausência na atividade dessa enzima pode causar bloqueio de uma rota metabólica, causando acúmulo tóxico de substâncias e/ou falta de produtos essenciais. O bloqueio metabólico pode, ainda,

originar outras substâncias tóxicas por rotas metabólicas alternativas (Figura 1.1) (SCRIVER et al., 2001).

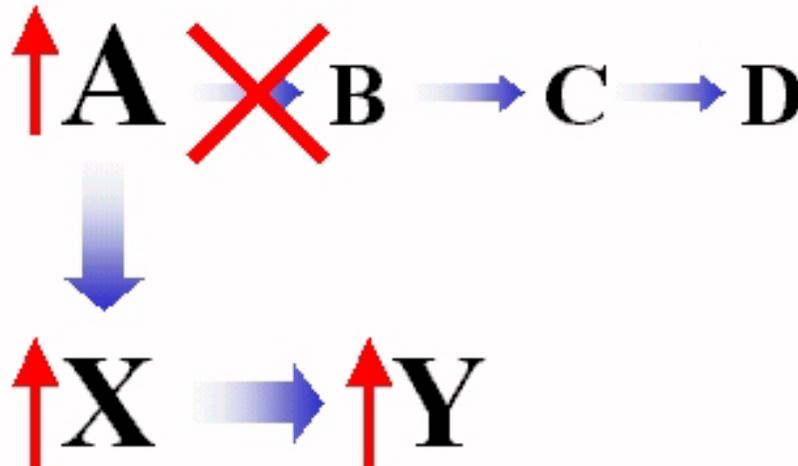


Figura 1.1. Bloqueio de uma rota metabólica.

Em condições normais, o substrato A é convertido ao produto D através de uma série de reações. Em um EIM, a deficiência na atividade da enzima que converte A em B causa um bloqueio metabólico, resultando em acúmulo do substrato A, que pode ser metabolizado em uma rota metabólica alternativa e formar outros produtos, X e Y. As causas fisiopatológicas dos EIM podem ocorrer pelo acúmulo do substrato A ou dos produtos alternativos X e Y (que podem ser tóxicos) e/ou pela ausência dos produtos B, C e D (Adaptado de SCRIVER et al., 2001).

### 1.3. Classificação e frequência

Os EIM são divididos de acordo com a área do metabolismo afetada (Tabela 1) (SCRIVER et al., 2001).

Tabela 1. Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo afetada.

*EIM de aminoácidos*  
*EIM de ácidos orgânicos*  
*EIM de glicídios*  
*EIM de lipídios*  
*EIM de glicosaminoglicanos*  
*EIM de glicoproteínas*  
*EIM de purinas e pirimidinas*  
*EIM de enzimas eritrocitárias*  
*EIM de metais*  
*EIM de lipoproteínas*  
*EIM de hormônios*  
*EIM de proteínas plasmáticas*

Os EIM são doenças raras, de forma individual, mas como grupo apresentam uma frequência relativamente alta, podendo ocorrer 1 caso em aproximadamente cada 1.000 nascimentos (GIUGLIANI, 1988). Além disso, o desenvolvimento de novas técnicas para o diagnóstico dos EIM tem ajudado na descoberta de novas doenças e tende a aumentar a sua frequência, uma vez que mais investigações são realizadas e mais casos são diagnosticados. Os EIM de aminoácidos estão entre os mais comuns e pode-se citar como exemplo a homocistinúria, onde ocorre acúmulo de dois aminoácidos, homocisteína e metionina (SCRIVER et al., 2001).

#### *1.4. Sintomatologia*

Os EIM apresentam manifestações clínicas muito variadas e inespecíficas. A variação ocorre por diferenças no grau da deficiência enzimática, área do metabolismo e tecido afetados. No entanto, algumas manifestações clínicas ocorrem com mais frequência nos EIM, de modo geral, como deficiências no crescimento, vômitos, diarreia, letargia, coma, convulsões, dificuldade alimentar, hipotonia, dificuldades respiratórias, apnéia, hepatomegalia, odor anormal na urina ou na pele, anormalidades

oculares, atraso no desenvolvimento psicomotor e neurodegeneração progressiva (BURTON, 1987).

## **2. Homocisteína**

### *2.1. Metabolismo da homocisteína*

A homocisteína é formada a partir da metionina, através dos derivados *S*-adenosil (Figura 2.1). A metionina, provinda da dieta ou da degradação de proteínas endógenas, é convertida em *S*-adenosil metionina (AdoMet) em uma reação catalisada pela enzima metionina adenosil transferase. A AdoMet é doadora de grupos metila em várias reações de transmetilação, formando importantes compostos metilados, como creatinina e DNA metilado. Nas reações de transmetilação da AdoMet ocorre a produção de *S*-adenosil homocisteína (AdoHcy), por metiltransferases dependentes de AdoMet. A AdoMet também pode sofrer descarboxilação e entrar na rota de síntese de espermina e espermidina. O próximo passo é a hidrólise de AdoHcy em adenosina e homocisteína, através da enzima adenosil homocisteína hidrolase. A homocisteína pode então ser metabolizada pela via da remetilação ou da transsulfuração (FOWLER, 1997; MUDD et al., 2001).

Na primeira via metabólica, a homocisteína é remetilada e forma metionina, reação catalisada pela enzima metionina sintase, cujo cofator é a vitamina B<sub>12</sub> (cobalamina). Nessa reação o grupo metila é doado pelo ciclo dos folatos. O ácido fólico é convertido em tetrahydrofolato, que é metabolizado a 5,10-metileno-tetrahydrofolato. A enzima metileno tetrahydrofolato redutase converte 5,10-metileno-tetrahydrofolato em 5-

metil tetrahidrofolato, que doa o grupo metila na reação de formação de metionina a partir da homocisteína. A homocisteína também pode receber um grupo metila da betaína, através da enzima betaína homocisteína metiltransferase, formando dimetil glicina (FOWLER, 1997; MUDD et al., 2001).

O primeiro passo da rota de transsulfuração é a condensação da homocisteína com serina pela enzima cistationina  $\beta$ -sintase (CBS, E.C. 4.2.1.22), que usa como cofator a vitamina B<sub>6</sub> (piridoxal fosfato). Posteriormente, a cistationina forma cisteína e  $\alpha$ -oxobutirato pela enzima cistationina  $\gamma$ -liase, que utiliza o mesmo cofator da CBS. A cisteína pode então participar da formação da glutathiona reduzida (GSH), um antioxidante não-enzimático muito importante, ou ter o seu átomo de enxofre oxidado até a formação de sulfato, através de várias reações. Sabe-se que 70% do enxofre administrado ao organismo através da metionina é excretado na forma de sulfato inorgânico, mostrando a importância dessa via metabólica em humanos (FOWLER, 1997; MUDD et al., 2001).

## *2.2. Controle do metabolismo da homocisteína*

O metabolismo da homocisteína é regulado por vários fatores, como, por exemplo, proteínas e metionina da dieta, hormônios, deficiências nutricionais e idade (FOWLER, 1997). Estudos mostram que o controle do metabolismo da homocisteína ocorre em três pontos metabólicos: 1) a competição pela metionina para formar AdoMet ou para síntese de proteínas, 2) a competição da AdoMet para sofrer transmetilação e formar AdoHcy ou sofrer descarboxilação e 3) a disposição da homocisteína para formar metionina, cistationina ou AdoHcy (FINKELSTEIN, 1998). Sabe-se também que o

excesso de AdoMet favorece a rota da transsulfuração, ativando a enzima CBS e inibindo as enzimas metileno tetrahydrofolato redutase e betaína homocisteína metiltransferase, provocando uma diminuição da formação de 5-metileno-tetrahydrofolato e diminuindo a atividade da metionina sintase. A metionina também inibe a atividade das enzimas betaína homocisteína metiltransferase e metionina sintase (FOWLER, 1997; FINKELSTEIN, 1998).

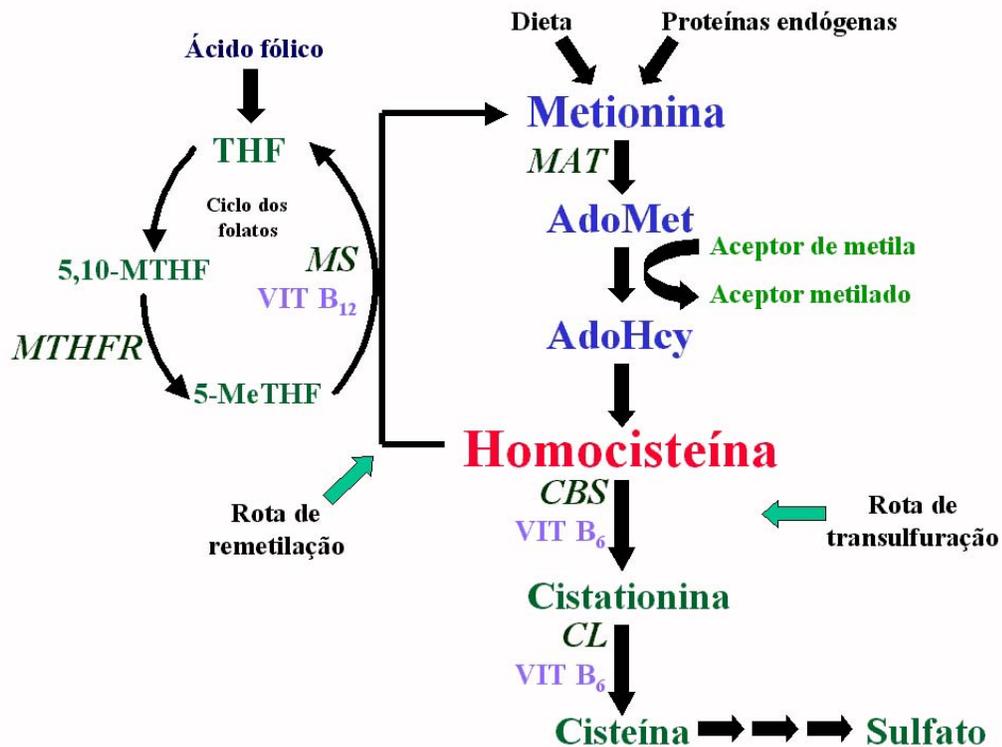


Figura 2.1. Metabolismo da homocisteína (Adaptado de MUDD et al., 2001).

MAT – metionina adenosil transferase; CBS – cistationina  $\beta$ -sintase; CL – cistationina  $\gamma$ -liase; MS – metionina sintase; MTHFR – metileno tetrahydrofolato redutase; AdoMet – S-adenosil metionina; AdoHcy – S-adenosil homocisteína; THF – tetrahydrofolato; 5,10-MTHF – 5,10-metileno-tetrahydrofolato; 5-MeTHF – 5-metil-tetrahydrofolato.

O metabolismo da homocisteína também é afetado por hormônios. Estudos demonstram que os estrógenos ativam a rota de transsulfuração e, conseqüentemente, diminuem os níveis plasmáticos desse aminoácido. Essa propriedade dos estrógenos justifica o fato das mulheres apresentarem concentrações plasmáticas de homocisteína menores do que os homens. Além disso, sabe-se que, após a menopausa, a concentração plasmática de homocisteína tende a aumentar, provavelmente pela diminuição nos níveis de estrógenos (DIMITROVA et al., 2002).

Deficiências nutricionais também provocam anormalidades no metabolismo da homocisteína. Níveis insuficientes de ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> provocam aumento dos níveis de homocisteína, uma vez que a falta dessas substâncias provoca diminuição na atividade do ciclo dos folatos e diminuição da atividade das enzimas CBS e metionina sintase, respectivamente. Acredita-se que, com o avanço da idade, podem ocorrer problemas na absorção dessas substâncias e também maiores deficiências nutricionais, causando diminuição no metabolismo da homocisteína e aumentando a sua concentração nos tecidos (SCHNEEDE et al., 2000).

### *2.3. Distribuição da homocisteína no plasma*

A homocisteína está presente no plasma em quatro formas diferentes (Figura 2.2). Aproximadamente 70 a 80% da homocisteína total plasmática está ligada a proteínas plasmáticas, principalmente albumina, como dissulfetos mistos com resíduos de cisteína das proteínas. A homocisteína também está ligada à cisteína, através de uma ponte dissulfeto, em proporção de 5 a 10%. Na mesma proporção está a forma oxidada da homocisteína, denominada homocistina, quando duas moléculas de homocisteína

estão ligadas por uma ponte dissulfeto. A forma livre e reduzida, homocisteína, está presente em 1 a 2% no plasma humano (WELCH e LOSCALZO, 1998).

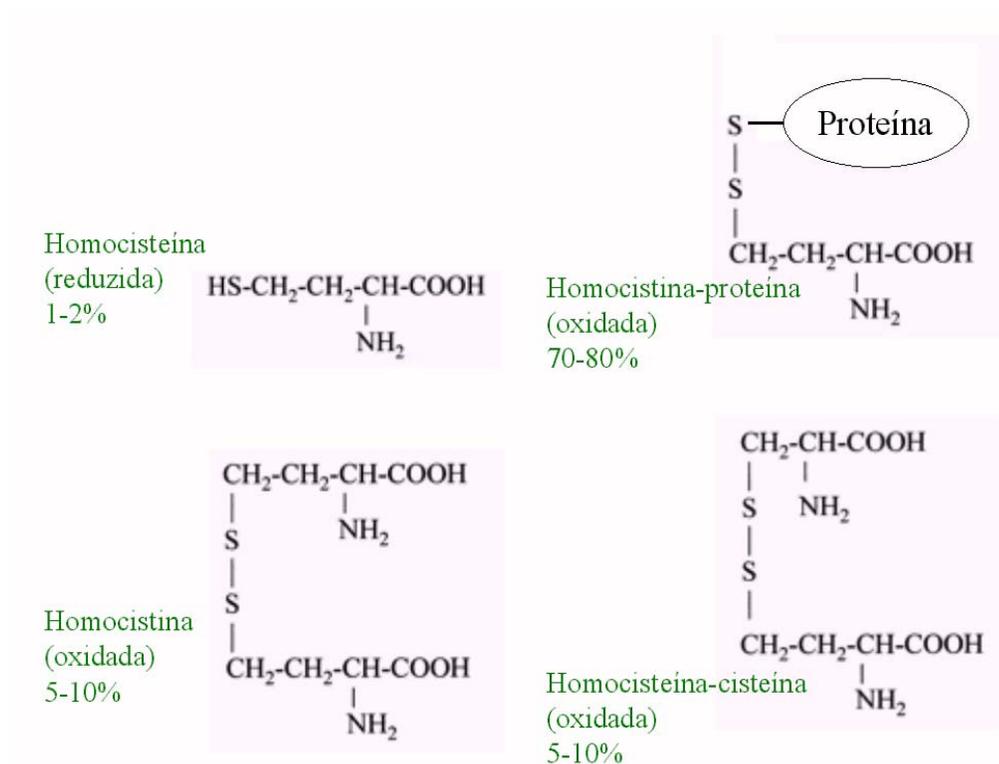


Figura 2.2. Distribuição da homocisteína no plasma.

#### 2.4. Auto-oxidação da homocisteína

Quando a homocisteína é liberada pelas células para a corrente sanguínea, o equilíbrio entre as formas da homocisteína é reestabelecido. Ocorre auto-oxidação da homocisteína, formando homocistina, dissulfetos mistos ou outros compostos, como a homocisteína tiolactona. Durante o processo de auto-oxidação também são formadas espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. O radical hidroxila, também formado pela oxidação da homocisteína,

juntamente com o ânion superóxido, estão envolvidos em processos de lipoperoxidação. Evidências experimentais sugerem que essas espécies reativas de oxigênio provavelmente estejam diretamente envolvidas na patogênese de complicações vasculares e neurológicas características dos pacientes homocistinúricos (HOGG, 1999).

### *2.5. Homocisteína em doenças que afetam o sistema nervoso central*

Estudos recentes mostram uma relação entre a homocisteína e algumas doenças que afetam o sistema nervoso central, como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington e a isquemia cerebral. A homocisteína tem sido considerada um fator de risco para o aparecimento dessas doenças e evidências sugerem que essa substância possa participar da fisiopatologia das mesmas (BOUTELL et al., 1998; KUHN et al., 1998; MUDD et al., 2001; WHITE et al., 2001; MATTSON et al., 2002; SESHADRI et al., 2002). Por outro lado, estudos mostram que pacientes homocistinúricos frequentemente desenvolvem isquemia cerebral (MUDD et al., 2001).

Os níveis plasmáticos de homocisteína estão aumentados em pacientes com a doença de Parkinson (KUHN et al., 1998; YASUI et al., 2000). Além disso, os pacientes portadores dessa doença apresentam, em média, níveis plasmáticos de ácido fólico diminuídos (YASUI et al., 2000). Sabe-se também que o uso de levodopa, fármaco utilizado no tratamento da doença de Parkinson, pode provocar o aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína (MÜLLER et al., 1999). Por outro lado, um estudo realizado com um modelo animal da doença de Parkinson mostrou que uma dieta pobre em folato (que provocou aumento dos níveis de homocisteína nos ratos) provocou uma disfunção motora nos animais e aumentou a sensibilidade de neurônios dopaminérgicos na substância nigra (DUAN et al., 2002).

Na doença de Alzheimer, os níveis plasmáticos de homocisteína estão aumentados e os níveis de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> encontram-se diminuídos (LEVITT e KARLINSKY, 1992; CLARKE et al., 1998; SNOWDON et al., 2000; SESHADRI et al., 2002). Estudos recentes mostram que meio de cultura com deficiência em ácido fólico induz apoptose e aumenta a vulnerabilidade à morte neuronal causada pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide (KRUMAN et al., 2000; WHITE et al., 2001). Além disso, Ho e colaboradores (2001) verificaram que a homocisteína induz o influxo de cálcio nas células e o estresse oxidativo, aumentando a toxicidade neuronal e levando à apoptose.

A homocisteína também pode estar relacionada com outras doenças neurodegenerativas, como a esclerose amiotrófica lateral (YOSHINO, 1984). Outro fator importante para essa relação é o fato de que a idade é o principal fator de risco para esse tipo de doenças e que os níveis de homocisteína aumentam progressivamente com a idade (BRATTSTROM et al., 1994).

### **3. Homocistinúria**

#### *3.1. Histórico*

Em 1962, Carson e Neill detectaram a presença de homocist(e)ína no plasma de duas irmãs, de 5 e 7 anos, que apresentavam retardo mental severo, deslocamento da lente ocular e hepatomegalia. Dois anos depois, em 1964, Mudd e colaboradores mediram a atividade das enzimas CBS e metionina sintase em biópsias de fígado de indivíduos normais e indivíduos com presença de homocist(e)ína na urina. O resultado

encontrado foi a deficiência total da enzima CBS na paciente homocistinúrica, enquanto que a metionina sintase apresentou-se elevada, quando comparada com indivíduos normais. Esses resultados mostraram, pela primeira vez, a causa do aumento da concentração plasmática de homocist(e)ina, por deficiência da CBS, e de metionina, por aumento da metionina sintase. Em 1989, Mudd e colaboradores descreveram os principais achados clínicos característicos dos pacientes homocistinúricos.

### *3.2. Conceito e frequência*

A homocistinúria é um EIM de aminoácidos sulfurados, causado pela deficiência na atividade da enzima CBS (Figura 3.1). O bloqueio desta rota metabólica provoca acúmulo de homocisteína e metionina. A metionina é formada em condições de excesso de homocisteína, que sofre metilação e é convertida em metionina por ação da enzima metionina sintase. A frequência desta doença é de aproximadamente 1 caso para 200.000 nascimentos (MUDD et al., 2001). No entanto, outro estudo do mesmo ano mostra que a frequência estimada está em torno de 1 caso para 80.000 nascimentos (SOKOLOVA et al., 2001). A herança é do tipo autossômica recessiva (MUDD et al., 2001).

### *3.3. Aspectos bioquímicos*

As concentrações plasmáticas normais de homocisteína variam de 5 a 15  $\mu\text{mol/L}$ , enquanto que as de metionina são de aproximadamente 35  $\mu\text{mol/L}$ . Pacientes com deficiência de CBS apresentam concentrações plasmáticas de homocisteína acima de 200  $\mu\text{mol/L}$ , podendo alcançar até 500  $\mu\text{mol/L}$ ; e de metionina, até 2.000  $\mu\text{mol/L}$  (MUDD et al., 2001). As concentrações elevadas dos metabólitos acumulados na

homocistinúria não ocorrem somente no plasma, mas também no líquido cefalorraquidiano (TADA et al., 1967) e no humor aquoso (CURTIUS et al., 1968). Os pacientes homocistinúricos também apresentam concentrações diminuídas de cisteína, uma vez que a rota de síntese desse aminoácido está bloqueada. A diminuição da produção de cisteína pode, conseqüentemente, levar à redução de GSH nos pacientes afetados (MUDD et al., 1985).

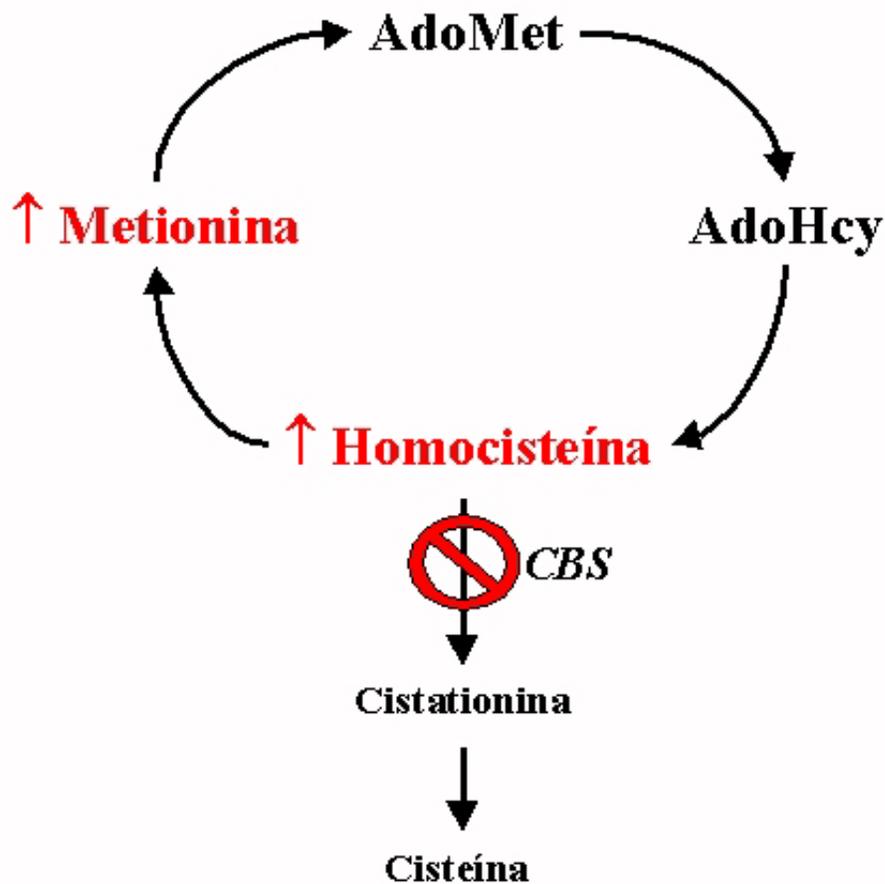


Figura 3.1. Deficiência da enzima cistationina  $\beta$ -sintase.

**CBS** – cistationina  $\beta$ -sintase; **AdoMet** – S-adenosil metionina; **AdoHcy** – S-adenosil homocisteína.

### *3.4. Aspectos genéticos*

A CBS é uma proteína com massa molecular de 63.000 kD, contém 551 aminoácidos e ocorre na forma de homotetrâmero (MUDD et al., 2001). O gene que codifica a enzima está localizado na região 21q22.3 do cromossomo 21 (MÜNKE et al., 1988). Recentemente, o gene para CBS humana foi completamente seqüenciado e verificou-se que ele contém 28,04 kb e 23 exons (KRAUS et al., 1998). Dados recentes mostram que o número de mutações encontradas no gene que codifica a CBS é de 92, e que mais de 300 alelos mutantes já foram detectados (KRAUS et al., 1999). Além disso, estudos mostram que indivíduos heterozigotos apresentam de 22 a 47% de atividade da CBS em fígado e de 0 a 45% em fibroblastos, quando comparados com a atividade média da enzima em indivíduos normais (MUDD et al., 1989).

Estudos mostraram a distribuição da CBS no corpo humano. A enzima está amplamente distribuída no organismo e está presente, em maior quantidade, no fígado e no pâncreas. A enzima também é encontrada nos rins, cérebro (principalmente cerebelo), próstata, estômago, ovários, tireóide e pulmões. Os mesmos investigadores também mostraram que a CBS é encontrada no coração, cérebro, rins e fígado de fetos (BAO et al., 1998).

### *3.5. Achados clínicos*

Os pacientes homocistinúricos apresentam sinais e sintomas que envolvem principalmente quatro sistemas: nervoso central, vascular, ocular e ósseo. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos da homocistinúria ainda são pouco conhecidos. Estudos epidemiológicos mostram que o risco de aparecimento dos sinais e sintomas aumenta com a idade dos pacientes (MUDD et al., 2001).

O achado neurológico mais freqüente é o retardo mental, refletido por deficiência no desenvolvimento nos primeiros anos de vida. Diminuição de capacidade cognitiva e distúrbios psiquiátricos também ocorrem freqüentemente. Convulsões, eletroencefalograma anormal e distúrbios extrapiramidais são achados clínicos menos freqüentes de pacientes homocistinúricos (MUDD et al., 2001; DE FRANCHIS et al., 1998).

O sistema vascular também é bastante comprometido nos pacientes com homocistinúria. O tromboembolismo é a maior causa de mortalidade entre esses pacientes. Dentre os eventos resultantes do tromboembolismo, pode-se citar a oclusão de veias e artérias periféricas, que pode resultar em embolismo pulmonar, acidentes vasculares cerebrais e infarto do miocárdio (McCULLY, 1996; DE FRANCHIS et al., 1998; MUDD et al., 2001).

O sistema ocular tem como principal complicação o deslocamento da lente, sendo que a miopia também é freqüente. A osteoporose é a principal anormalidade óssea e é encontrada em mais de 50% dos pacientes até os 20 anos de idade. A escoliose também pode ocorrer, provavelmente devido à osteoporose precoce (DE FRANCHIS et al., 1998; MUDD et al., 2001).

### *3.6. Aspectos fisiopatológicos*

A exata etiopatogenia dos danos cerebrais da homocistinúria permanece incerta, e muitos estudos estão sendo feitos na tentativa de elucidá-la. Tal problema tem impulsionado, nas últimas décadas, a associação entre as pesquisas básica e clínica, ampliando o entendimento dos mecanismos envolvidos na disfunção cerebral da homocistinúria.

Parsons e colaboradores (1998) mostraram que a homocisteína tem efeitos tóxicos sobre linhagens celulares de neurônios humanos. Além disso, muitos estudos têm sido realizados com animais. Kubová e colaboradores (1995) mostraram que a administração intraperitoneal de homocisteína provoca convulsões em ratos de diferentes idades. Estudos realizados com dois metabólitos encontrados na urina de pacientes homocistinúricos, homocisteato e sulfinato de homocisteína, mostraram que esses são potentes agonistas de receptores de glutamato do subtipo NMDA e exercem efeitos citotóxicos em culturas de células neuronais de ratos (FLOTT-RAHMEL et al., 1998). Além disso, Kim e Pae (1996) demonstraram que a homocisteína provoca morte neuronal por estimulação excessiva de receptores NMDA e por produção de radicais livres. Sabe-se que a ativação excessiva de receptores glutamatérgicos provoca morte neuronal (BEAL, 1992). A ação excitotóxica da homocisteína por estimulação de receptores glutamatérgicos também foi verificada por Lipton e colaboradores (1997).

Acredita-se que o óxido nítrico também esteja envolvido na patogênese da homocistinúria e de doenças como Alzheimer e Huntington, além da isquemia cerebral (BOUTELL et al., 1998). A ativação de receptores NMDA leva ao influxo de cálcio na célula e ativação da enzima óxido nítrico sintase, que produz óxido nítrico a partir de arginina. O excesso de produção de óxido nítrico pode ser prejudicial, já que aumenta a possibilidade de dano oxidativo, pois o óxido nítrico conjuga-se com ânion superóxido e forma peroxinitrito, um agente oxidante muito potente (LIPTON et al., 1997).

Estudos também mostram que a homocisteína conjuga-se com adenosina e forma AdoHcy, levando à diminuição de adenosina, que parece ter ação depressora no sistema nervoso central. Por isso, acredita-se que as convulsões características da homocisteína

podem ser causadas pela diminuição das concentrações de adenosina no cérebro (McILWAIN e POLL, 1985; CHEN et al., 2002).

É provável que as alterações no sistema glutamatérgico, estresse oxidativo e produção excessiva de óxido nítrico, entre outros fatores, estejam relacionadas com a disfunção neurológica característica da homocistinúria (MUDD et al., 2001).

O mecanismo exato de ação da homocisteína quanto às alterações vasculares características da homocistinúria ainda não foi completamente elucidado. No entanto, sabe-se que, durante a auto-oxidação da homocisteína, ocorre a formação de ERO, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. Acredita-se que o dano oxidativo ao endotélio, principalmente pelo peróxido de hidrogênio, seja o início do processo de disfunção endotelial e toxicidade vascular provocada pela homocisteína (HARKER et al., 1974; WELCH et al., 1997; HOGG, 1999). O radical hidroxil, outra ERO muito potente, também é formada na auto-oxidação da homocisteína. Além disso, sabe-se que o ânion superóxido e o radical hidroxil estão envolvidos em reações de lipoperoxidação (LPO), onde ocorre ataque oxidativo às células endoteliais da parede vascular (ROWLEY e HALLIWELL, 1982; HOGG, 1999).

A homocisteína cria um ambiente pró-trombótico (facilita a formação de trombos) por alterar alguns fatores de coagulação (WELCH e LOSCALZO, 1998), como o aumento das atividades dos fatores XII (RATNOFF, 1968) e V (RODGERS e KANE, 1986) e a diminuição da ativação da proteína C (RODGERS e CONN, 1990). Além disso, a homocisteína diminui a expressão de trombomodulina (LENTZ e SADLER, 1991), heparan sulfato (NISHINAGA et al., 1992) e induz a expressão de fator tecidual (FRYER et al., 1993).

A formação de homocisteína tiolactona, um composto altamente reativo, também ocorre na auto-oxidação da homocisteína. Esse composto combina-se com colesterol LDL e forma agregados que são fagocitados por macrófagos e formam as células espumosas, desenvolvendo a placa de ateroma (NARUSZEWICZ et al., 1994). Outros estudos mostram que a homocisteína provoca diminuição do metabolismo oxidativo de células musculares lisas, levando à fibrose das mesmas, além de aumento excessivo de ERO (McCULLY, 1993; McCULLY, 1994). Além disso, a homocisteína provoca proliferação das células musculares lisas, auxiliando no processo de aterogênese (TSAI et al., 1994).

Alguns estudos mostram que a homocisteína também altera a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais (STAMLER et al., 1993). O óxido nítrico combina-se com a homocisteína e forma *S*-nitroso-homocisteína, um composto vasodilatador e inibidor da ativação plaquetária (STAMLER et al., 1992). Com o dano às células endoteliais, o óxido nítrico é produzido em menor quantidade e a homocisteína em excesso sofre auto-oxidação e produz mais ERO, causando maior dano às células (STAMLER et al., 1993). Outro trabalho mostrou que a homocisteína altera a expressão da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPX) em células endoteliais (UPCHURCH et al., 1997).

Sugere-se um mecanismo geral para a ação da homocisteína sobre o sistema vascular: a homocisteína causa complicações vasculares devido à disfunção e injúria endotelial provocada por dano oxidativo seguida de ativação plaquetária e de formação de trombos (WELCH e LOSCALZO, 1998).

O deslocamento da lente é a principal manifestação clínica no sistema ocular em pacientes homocistinúricos. Acredita-se que essa alteração ocorra por causa de

mudanças na estrutura da fibrilina, uma glicoproteína localizada na zona ocular. A fibrilina é rica em resíduos de cisteína e as pontes dissulfeto são importantes para manter a integridade na estrutura dessa proteína. Devido a essa característica, a fibrilina participa de muitas reações com compostos sulfurados. A oxidação dos resíduos de cisteína modifica a estrutura da proteína e pode causar o rompimento de fibras oculares e o deslocamento da lente ocular (MUDD et al., 2001).

Quanto às alterações ósseas, como osteoporose e escoliose, Lubec e colaboradores (1996) constataram que elas ocorrem provavelmente por alterações provocadas pelas altas concentrações de homocisteína no metabolismo do colágeno. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entender essas complicações nos pacientes homocistinúricos.

### *3.7. Diagnóstico*

A suspeita clínica de homocistinúria ocorre com o aparecimento de sinais e sintomas clínicos característicos da doença. Geralmente o primeiro achado clínico encontrado em pacientes homocistinúricos é o retardo mental. Outros achados clínicos também são importantes para o diagnóstico precoce da homocistinúria (MUDD et al., 2001). Miopia e deslocamento da lente ocular (CRUYSSBERG et al., 1996), além de alterações vasculares e anormalidades esqueléticas são sinais e sintomas importantes para o diagnóstico de pacientes com deficiência de CBS (MUDD et al., 2001).

O achado laboratorial mais característico em pacientes homocistinúricos é a presença de altas concentrações de homocist(e)ína na urina (ISHERWOOD, 1996). Como os exames para detecção de homocist(e)ína urinária apresentam alguns interferentes, a dosagem de homocisteína plasmática é de fundamental importância para

o diagnóstico. Por isso, alta concentração de homocisteína no plasma é um indicativo da deficiência de atividade da CBS. Também pode ocorrer diminuição de cisteína e aumento de metionina no plasma desses pacientes (MUDD et al., 2001).

O ensaio enzimático direto da CBS é o exame utilizado para a confirmação de homocistinúria. A determinação da atividade da enzima é realizada em amostras de biópsia de fígado, fibroblastos e/ou linfócitos (UHLENDORF e MUDD, 1968; GOLDSTEIN et al., 1972; MUDD et al., 2001). O diagnóstico pré-natal pode ser realizado nos dois primeiros trimestres da gestação, através da determinação da atividade da CBS em fluido amniótico (MUDD et al., 2001).

### *3.8. Tratamento*

O objetivo geral do tratamento da homocistinúria é controlar e eliminar as alterações bioquímicas características da doença com a finalidade de prevenir ou amenizar as alterações clínicas e impedir complicações mais graves e, além disso, tratar os sinais e sintomas nos pacientes (MUDD et al., 2001).

O tratamento da hiperhomocisteinemia é realizado através da administração de vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico e de betaína. Além disso, dietas com restrição de metionina são amplamente utilizadas. As vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> são cofatores das enzimas CBS e metionina sintase, respectivamente, e podem aumentar as atividades das mesmas, aumentando a degradação da homocisteína. O ácido fólico participa do ciclo dos folatos, cuja função no metabolismo da homocisteína é doar um grupo metila para a mesma, formando metionina, por ação da enzima metionina sintase. A betaína também doa grupos metila para a homocisteína e, através da enzima betaína homocisteína metiltransferase, forma dimetilglicina e também aumenta a degradação desse

aminoácido. A dieta restrita em metionina tem o objetivo de diminuir os níveis de homocisteína no organismo dos pacientes homocistinúricos, pois diminui a formação da homocisteína a partir da metionina (JACQUES et al., 1999; MUDD et al., 2001).

Os pacientes homocistinúricos podem ser responsivos ou não-responsivos à vitamina B<sub>6</sub>. Confirmado o diagnóstico da doença, são realizadas análises com o objetivo de verificar a responsividade do paciente à vitamina B<sub>6</sub>, através da administração da mesma e da dosagem de homocisteína (MUDD et al., 2001).

Antes de iniciar o tratamento, os pacientes homocistinúricos são divididos em três grupos, com o objetivo de melhor alcançar os resultados esperados e o menor grau de efeitos colaterais. Os grupos são divididos em (1) pacientes responsivos à vitamina B<sub>6</sub> e com diagnóstico realizado após o período neonatal, (2) pacientes diagnosticados como neonatos e (3) pacientes não-responsivos à vitamina B<sub>6</sub> e diagnosticados após o período neonatal (MUDD et al., 2001).

O primeiro grupo de pacientes, aqueles que respondem à vitamina B<sub>6</sub> e foram diagnosticados após o período neonatal, apresentam até 90% de redução nos níveis de homocisteína no plasma após o tratamento com a vitamina B<sub>6</sub>, sendo que a concentração de homocisteína plasmática nesses pacientes pode atingir valores normais (KLUIJTMANS et al., 1999). A administração de vitamina B<sub>6</sub> ameniza os danos neurológicos e as alterações ósseas e oculares nos pacientes responsivos à mesma (MUDD et al., 1985). Além disso, Wilcken e colaboradores (1985) demonstraram que a betaína aumenta a resposta de diminuição de concentração plasmática de homocisteína em pacientes responsivos à vitamina B<sub>6</sub> e sugerem que a betaína deve ser adicionada ao tratamento com vitamina B<sub>6</sub> e ácido fólico nesses pacientes.

Os pacientes diagnosticados no período neonatal são, na maioria, não-responsivos à vitamina B<sub>6</sub>. Por isso, a maioria desses pacientes é tratada com uma dieta restrita em metionina (MUDD et al., 2001). As dietas são geralmente suplementadas com cisteína, o aminoácido que está reduzido na doença. Acosta e Elsas (1992) mostraram que a dieta restrita em metionina diminui os níveis plasmáticos de homocisteína e metionina enquanto que outros investigadores mostraram que essa dieta auxilia na prevenção do retardo mental, deslocamento da lente ocular e convulsões (MUDD et al., 1985). Também é relatado que os pacientes diagnosticados no período neonatal têm alterações clínicas mais amenas e que a reversão dessas complicações é mais fácil (MUDD et al., 2001).

O terceiro grupo, de pacientes não-responsivos à vitamina B<sub>6</sub> e diagnosticados após o período neonatal, é o que oferece mais dificuldades no tratamento. A dieta restrita em metionina (MUDD et al., 1985) e a administração de betaína (SMOLIN et al., 1981) e ácido fólico (MUDD et al., 2001) são amplamente utilizadas.

#### **4. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

##### *4.1. Histórico*

Até a década de 1930 achava-se que a membrana celular era impermeável ao sódio. No entanto, o uso de isótopos radioativos de sódio e potássio, a partir do final da década de 1930, permitiu monitorar o fluxo de íons através da membrana celular, onde Hevesy verificou, em 1938, que a membrana era permeável a esses íons (citado por SKOU e ESMANN, 1992). Dean, em 1941, introduziu a idéia de que poderia existir

uma bomba, possivelmente localizada na membrana celular, que poderia translocar os íons sódio e potássio contra seus gradientes de concentração e que essa reação necessitaria de energia (citado por SKOU e ESMANN, 1992).

A inibição do transporte ativo de sódio e potássio por glicosídeos cardiotônicos foi descoberta por Schatzmann, em 1953 (citado por SKOU e ESMANN, 1992). Em 1955, Hodgkin e Keynes mostraram que ésteres trifosfato eram os substratos energéticos para o transporte ativo de sódio e potássio (citado por SKOU e ESMANN, 1992). Em 1962, Hoffman mostrou que o substrato energético para o transporte ativo dos íons era somente o ATP, e não o ITP, UTP ou GTP (citado por SKOU e ESMANN, 1992). Glynn, em 1956, sugeriu uma ligação entre o efluxo ativo de sódio e o influxo ativo de potássio (citado por SKOU e ESMANN, 1992).

Em 1957, Skou propôs a idéia de que existiria uma proteína ligada à membrana celular com propriedades catalíticas, ou seja, uma ATPase (SKOU, 1957). A estequiometria da reação da enzima foi determinada por Sen e Post, em 1964. Foi verificado experimentalmente que três íons sódio eram trocados para cada dois íons potássio (citado por SKOU e ESMANN, 1992). Muitos estudos foram e ainda são realizados com o objetivo de melhor entender a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, sua estrutura, função e mecanismo de reação.

Em 1997, o cientista Jean Skou recebeu o Prêmio Nobel de Química, por sua descoberta em 1957.

#### *4.2. Conceito, função e estrutura*

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é uma proteína integral de membrana, encontrada na maioria das células de eucariotos, sendo responsável pela translocação de sódio e potássio contra

seus gradientes de concentração através da membrana celular, utilizando ATP como força motriz. São translocados três íons sódio para fora e dois íons potássio para dentro da célula, produzindo um gradiente eletroquímico através da membrana celular. Por isso, nos tecidos nervoso e muscular, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é responsável pela manutenção do potencial de repouso e da excitabilidade das células, além de regular o volume celular, o pH intracelular e o fluxo de íons. Através da manutenção do gradiente iônico, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase também regula o transporte de moléculas ligadas ao cotransporte de sódio, como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (GEERING, 1990; LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998; KAPLAN, 2002). Além disso, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase consome de 40 a 60% do ATP do cérebro (ERECINSKA e SILVER, 1994) e está presente em grande quantidade nesse tecido (HANSEN e CLAUSEN, 1988).

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pertence à classe de ATPases do tipo P, juntamente com  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de retículo sarcoplasmático e membrana plasmática e a  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase, encontrada no estômago e no cólon. Essa classe de ATPases caracteriza-se por apresentar um intermediário protéico fosforilado no seu ciclo catalítico. A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é a única enzima desse grupo que é inibida por glicosídeos cardiotônicos, como ouabaína e digoxina (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998; KAPLAN, 2002).

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é composta por três subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e está inserida na bicamada lipídica da membrana celular (GLYNN, 1993; BLANCO e MERCER, 1998; BLANCO et al., 2000; KAPLAN, 2002). A subunidade  $\alpha$  é composta por aproximadamente 1020 aminoácidos e tem um massa molecular de aproximadamente

113 kDa (SKOU e ESMANN, 1992; LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998; BLANCO et al., 2000; KAPLAN, 2002). Já foram descritas quatro isoformas da subunidade  $\alpha$ , chamadas de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ . A isoforma  $\alpha_1$  ocorre na maioria dos tecidos, enquanto que a isoforma  $\alpha_2$  é encontrada predominantemente em músculo esquelético, cérebro, coração e tecido adiposo. A isoforma  $\alpha_3$  ocorre somente no cérebro e no coração e a isoforma  $\alpha_4$  parece ocorrer especificamente em testículo e epidídimo (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998; BLANCO et al., 2000; KAPLAN, 2002). Na subunidade  $\alpha$  localizam-se os sítios de ligação para os íons sódio e potássio, ATP e glicosídeos cardiotônicos, inibidores específicos da enzima (GEERING, 1990; BLANCO e MERCER, 1998; KAPLAN, 2002). A subunidade  $\alpha$  é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima (BLANCO e MERCER, 1998; KAPLAN, 2002). Acredita-se que dez domínios da subunidade  $\alpha$  estão inseridos na membrana celular (FAMBROUGH et al., 1994; KAPLAN, 2002).

A subunidade  $\beta$  é formada por aproximadamente 300 aminoácidos e tem massa molecular de aproximadamente 55 kDa (SKOU e ESMANN, 1992; LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; KAPLAN, 2002). Essa subunidade é uma glicoproteína, está inserida na membrana celular uma única vez, possui três pontes dissulfeto e três sítios de *N*-glicosilação (FAMBROUGH et al., 1994; KAPLAN, 2002). Três isoformas da subunidade  $\beta$  foram descritas em células de mamíferos, onde a isoforma  $\beta_1$  ocorre em praticamente todos os tecidos e a isoforma  $\beta_2$  ocorre predominantemente em tecido nervoso e muscular esquelético. A subunidade  $\beta_3$ , por sua vez, ocorre em testículo, retina, fígado e pulmão (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO et al., 2000;

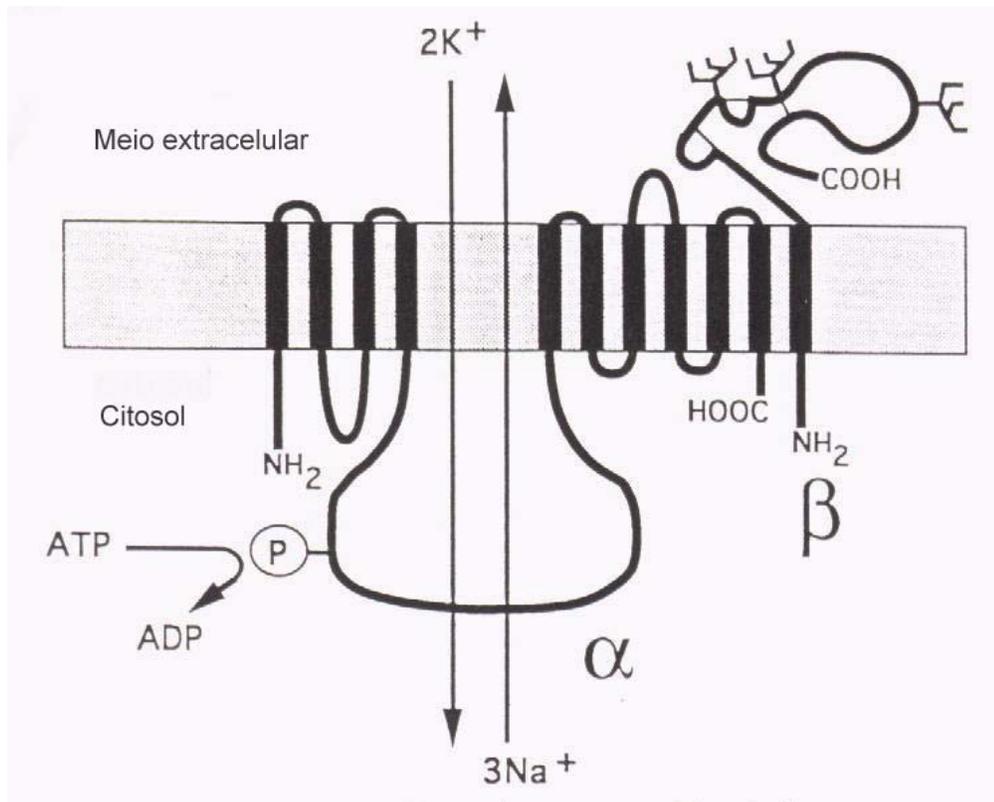


Figura 4.1. Estrutura da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase (Adaptado de FAMBROUGH et al., 1994).

KAPLAN, 2002). A subunidade  $\beta$  não possui atividade catalítica, mas apresenta uma função estrutural importante. Sabe-se que a subunidade  $\alpha$  perde a atividade catalítica quando é separada da subunidade  $\beta$ . Além disso, a redução de pontes dissulfeto na subunidade  $\beta$  leva à perda da atividade enzimática (SKOU e ESMANN, 1992). Estudos mostram similaridade entre a subunidade  $\beta_2$  da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase e a proteína de adesão da glia. Acredita-se que essas duas moléculas, associadas com a subunidade  $\alpha$  da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase, são elementos de reconhecimento para adesão, ligação e transporte iônico entre as células (GLOOR et al., 1990; LECUONA et al., 1996).

A subunidade  $\gamma$  tem peso molecular de aproximadamente 12 kDa e ainda não tem a sua função completamente elucidada. Acredita-se que essa subunidade não é essencial

para a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase, já que ela é encontrada somente nos rins. A subunidade  $\gamma$  provavelmente atua como moduladora da atividade da enzima. Além disso, a subunidade  $\gamma$  pertence a uma família de pequenas proteínas de membrana envolvidas na passagem de íons pela membrana (THERIEN et al., 1997; BLANCO e MERCER, 1998; KAPLAN, 2002).

#### *4.3. Mecanismo de reação*

Além da translocação de íons sódio e potássio contra seus gradientes de concentração, a enzima utiliza ATP como substrato, e tem como produtos ADP e fosfato inorgânico. A  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase apresenta um mecanismo de ação complexo, que divide-se em quatro etapas. Durante seu ciclo catalítico, a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase apresenta-se sob duas formas conformacionais: uma desfosforilada, com alta afinidade por sódio e baixa afinidade por potássio (E1), e outra fosforilada, com alta afinidade por potássio e baixa afinidade por sódio (E2). O mecanismo de reação da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase está esquematizado na Figura 4.2 (GLYNN, 1993; LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998; KAPLAN, 2002).

Primeiramente, três íons sódio ligam-se à  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase no citoplasma. A enzima é, então, fosforilada pelo ATP (a fosforilação por ATP é dependente de sódio), ocorre mudança conformacional e os sítios de ligação de sódio ficam expostos à superfície extracelular. A mudança conformacional provocada pela fosforilação diminui a afinidade da enzima por sódio, e três íons sódio são então liberados no meio extracelular. Dois íons potássio ligam-se em sítios de alta afinidade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase, e o fosfato inorgânico é liberado. A desfosforilação da enzima causa outra mudança

conformacional, a afinidade por potássio é reduzida e os dois íons são liberados no meio intracelular (GLYNN, 1993; LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998; KAPLAN, 2002). A ouabaína, glicosídeo cardiotônico e inibidor específico da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, liga-se na enzima na etapa em que ela está fosforilada, impedindo a desfosforilação (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; KAPLAN, 2002).

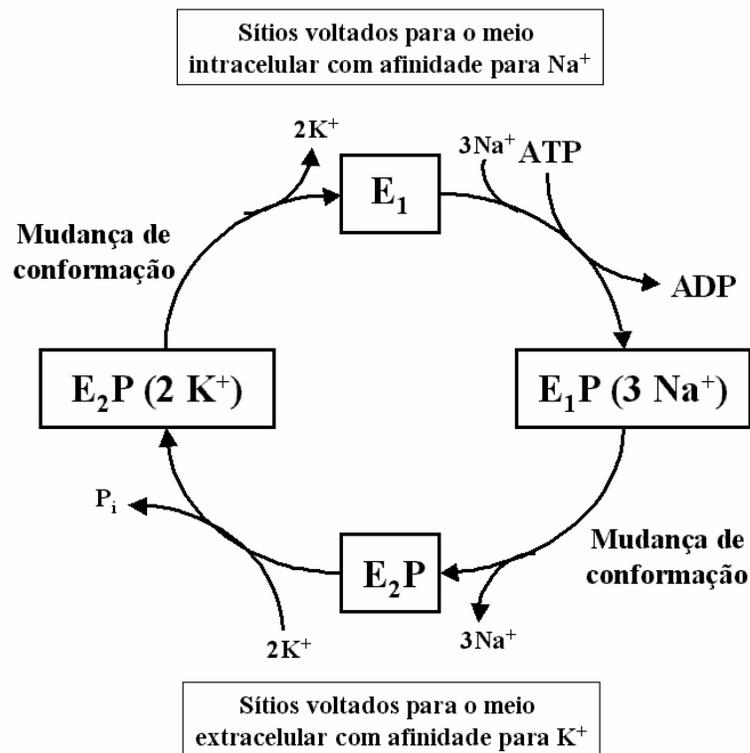


Figura 4.2. Mecanismo de reação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Adaptado de GLYNN, 1993).

#### 4.4. $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e disfunção cerebral

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase desempenha um papel fundamental para o funcionamento normal do cérebro, sendo responsável pela manutenção de gradientes iônicos necessários para a propagação do impulso nervoso, além da regulação do volume celular e do pH

intracelular (GEERING, 1990; LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998).

A diminuição na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pode estar relacionada com disfunções neurológicas (LEES, 1993; ERECINSKA e SILVER, 1994). Considerando que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase utiliza de 40 a 60% do ATP produzido no cérebro, a inibição da enzima pode desempenhar um papel importante em doenças onde ocorre uma diminuição no metabolismo energético (LEES, 1991).

As modificações provocadas pela inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase são potencialmente tóxicas para as células. Neste contexto, a administração de baixas doses de ouabaína, um potente e específico inibidor da enzima, provoca morte neuronal “in vivo”, o que sugere a importância da enzima para o funcionamento normal do cérebro (LEES et al., 1990).

Acredita-se que a morte neuronal provocada pela inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pode ocorrer por vários mecanismos, como excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo (LEES, 1991). A recaptação de glutamato pelos astrócitos e pelo neurônio pré-sináptico (em menor quantidade) ocorre com co-transporte de sódio. Com a enzima inibida, a concentração extracelular de sódio diminui e a recaptação de glutamato pode ficar comprometida, resultando em estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos (LIPTON e ROSENBERG, 1994). Por outro lado, a estimulação excessiva de receptores de glutamato, incluindo o subtipo NMDA, provoca influxo de cálcio. O aumento intracelular excessivo de cálcio pode levar à produção de radicais livres, que pode levar a danos celulares (AVROVA et al., 1999). As alterações no transporte de neurotransmissores também podem estar relacionadas com a morte neuronal causada pela inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, já que a inibição da enzima está relacionada à liberação de neurotransmissores (JACOBSON et al., 1986).

A  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase também é um alvo muito freqüente para radicais livres e está diretamente envolvida com o estresse oxidativo (LEES, 1991; DOBROTA et al., 1999). No entanto, a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase apresenta sensibilidades diferentes para diferentes agentes oxidantes, sendo mais suscetível ao ataque do radical hidroxil e de hipoclorito, relativamente resistente ao peróxido de hidrogênio e menos sensível ao ânion superóxido (KUKREJA et al., 1990; HITSCHKE et al., 1994; BOLDYREV et al., 1995; DOBROTA et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que o  $\alpha$ -tocoferol protege a oxidação da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase, promovida por peróxido de hidrogênio, um potente formador de radicais hidroxil. O  $\alpha$ -tocoferol provavelmente protege a enzima pela neutralização ou prevenção da formação desses radicais (KURELLA et al., 1999).

A inibição da atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase tem sido associada a algumas neuropatologias. A  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase encontra-se inibida na epilepsia (GRISAR, 1984; GRISAR et al., 1992), em crises convulsivas (RENKAWEK et al., 1992), na doença de Alzheimer (LIGURI et al., 1990; HATTORI et al., 1998) e em modelos animais experimentais de isquemia cerebral (MATEJOVICOCA et al., 1996; WYSE et al., 2000a).

Estudos mostram que metabólitos acumulados em alguns EIM inibem a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase em cérebro de ratos. A fenilalanina, por exemplo, metabólito acumulado na fenilcetonúria, inibe a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase “in vitro” e “in vivo” (WYSE et al., 1995; WYSE et al., 1999). A administração crônica de prolina, de ácido propiônico e de ácido metilmalônico, acumulados na hiperprolinemia tipo II e nas acidemias propiônica e metilmalônica, respectivamente, provocou uma diminuição na atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase (WYSE et al., 1998a; PONTES et al., 1999; WYSE et al.,

2000b; PONTES et al., 2001). Por outro lado, a prolina, o ácido propiônico e o ácido metilmalônico inibiram a atividade da enzima “in vitro” (WYSE et al., 1998a; PONTES et al., 1999; WYSE et al., 2000b; PONTES et al., 2001). Silva e colaboradores (1999) verificaram que alguns compostos guanidínicos acumulados na hiperargininemia também inibem a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Além disso, verificou-se que a administração aguda de arginina inibe a atividade da enzima (WYSE et al., 2001).

## **5. Metabolismo Energético**

### *5.1. Histórico*

Hans Krebs propôs, em 1937, uma série de reações do metabolismo intermediário de carboidratos. Atualmente, o ciclo proposto por Krebs leva o seu nome. Há aproximadamente meio século, Kennedy e Lehninger descobriram que as mitocôndrias contêm as enzimas do ciclo de Krebs e as enzimas de oxidação dos ácidos graxos, além dos complexos respiratórios. Alguns anos depois, Palade e Sjöstrand, através de microscopia eletrônica, mostraram que a mitocôndria apresenta duas membranas, uma externa e uma interna, muito dobrada. Em 1961, Peter Mitchell propôs a teoria quimiosmótica, sugerindo que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão acoplados a um gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna. Mitchell sugeriu que bombas de prótons criariam esse gradiente de prótons, que seria a força motriz para a síntese de ATP (STRYER, 1996).

## 5.2. Destinos da glicose e Ciclo de Krebs

Os seres vivos precisam de energia para realizar várias funções, como, por exemplo, o transporte ativo de íons e moléculas, síntese de macromoléculas e outras biomoléculas a partir de precursores simples e para a contração muscular. A energia necessária para realizar essas funções é obtida com a oxidação de substâncias pela respiração celular. O ATP é o principal combustível da célula na maioria dos processos que precisam de energia. A energia é liberada pela hidrólise de ATP e serve para impulsionar uma série de reações (NELSON e COX, 2000).

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pela maioria das células e ocupa uma posição central no metabolismo. A glicose é transportada para dentro das células por proteínas transportadoras específicas. Ao entrar na célula, a glicose pode ser metabolizada em diferentes rotas metabólicas. A principal via de degradação da glicose é a glicólise, uma rota que envolve uma seqüência de reações que ocorre no citosol e forma como produto final o piruvato. Uma molécula de glicose gera duas moléculas de piruvato e de ATP. Além disso, a glicose pode participar do ciclo das pentoses, que tem como objetivo formar NADPH, um doador de elétrons de fundamental importância em biossínteses redutoras, e ribose-5-fosfato, precursor na biossíntese de nucleotídeos. Quando a célula está com elevados níveis de ATP, a glicose pode ser armazenada na forma de glicogênio, que pode ser liberado e utilizado rapidamente se a célula necessitar de energia, ou formar triacilglicerol (CLARK et al., 1993; MARKS et al., 1996; STRYER, 1996; NELSON e COX, 2000).

Em organismos superiores, o piruvato, formado na glicólise a partir de glicose, pode seguir duas rotas metabólicas distintas. Quando há baixa quantidade de oxigênio, como no trabalho muscular forçado ou na hipóxia, o piruvato pode ser convertido em

lactato pela enzima lactato desidrogenase, formando ATP e consumindo NADH. No entanto, só uma pequena quantidade da energia da glicose é liberada pela conversão de piruvato a lactato (MARKS et al., 1996; STRYER, 1996; NELSON e COX, 2000).



Figura 5.1. Destinos da glicose (Adaptado de NELSON e COX, 2000).

Em condições aeróbicas, o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria e sofre ação do complexo enzimático da piruvato desidrogenase, que forma acetil coenzima A (acetil-CoA). A acetil-CoA inicia o ciclo de Krebs. É importante salientar que a acetil-CoA pode ser formada também pela oxidação de ácidos graxos e aminoácidos (CLARK et al., 1993; MARKS et al., 1996; STRYER, 1996; NELSON e COX, 2000).

O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial e consiste de uma seqüência de reações onde, em cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de NADH, uma de FADH<sub>2</sub>, duas de CO<sub>2</sub> e uma de GTP. O NADH e FADH<sub>2</sub> produzidos no ciclo de Krebs

são carreadores de elétrons e são utilizados na cadeia respiratória para a produção de ATP na fosforilação oxidativa (MARKS et al., 1996; STRYER, 1996; NELSON e COX, 2000). Altos níveis de ATP inibem o ciclo de Krebs por mecanismos complementares em vários locais do ciclo. Um dos pontos de controle é a conversão de piruvato a acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase, inibida por ATP, acetil-CoA e NADH (WILLIAMSON e COOPER, 1980).

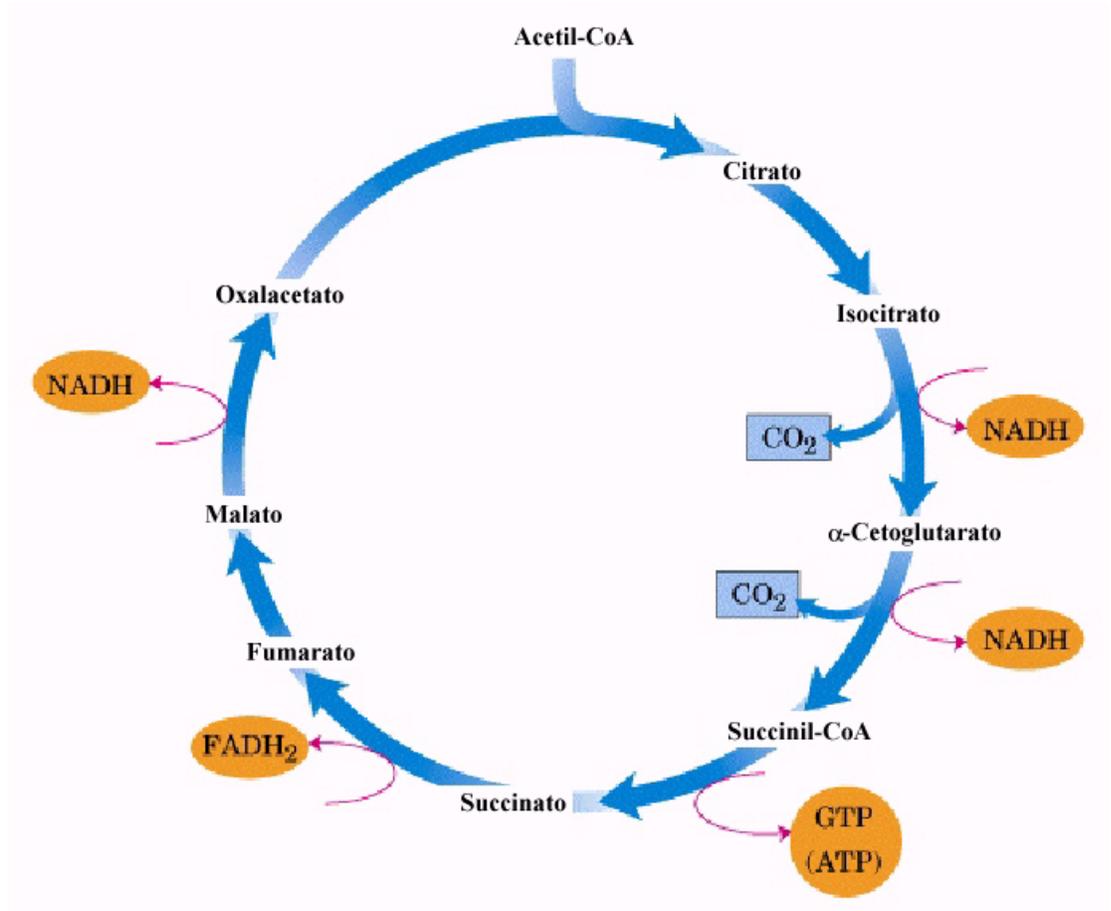


Figura 5.2. Ciclo de Krebs (Adaptado de NELSON e COX, 2000).

### 5.3. Cadeia respiratória

A cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, assim como o ciclo de Krebs, ocorrem nas mitocôndrias. A cadeia respiratória é formada por uma série de complexos protéicos, onde ocorre a transferência de elétrons doados por NADH e FADH<sub>2</sub>. A transferência de elétrons pela cadeia respiratória leva ao bombeamento de prótons da matriz para o lado citosólico da membrana mitocondrial interna. O gradiente de prótons é usado para impulsionar a síntese de ATP (ERECINSKA e DAGANI, 1990; HEALES et al., 1999; WALLACE, 1999; NELSON e COX, 2000).

A cadeia respiratória é composta de quatro complexos (I, II, III e IV). O complexo I, também chamado de NADH: ubiquinona oxirredutase, realiza a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. Essa reação faz com que dois prótons sejam bombeados para o espaço intermembrana. O complexo II, também denominado de succinato: ubiquinona oxirredutase, é formado pela enzima succinato desidrogenase (SDH) e três subunidades hidrofóbicas. Esse complexo participa do ciclo de Krebs e transfere elétrons do succinato para a ubiquinona e também forma ubiquinol. O complexo III, ou citocromo *c* oxirredutase, transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo *c*, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons. O complexo IV, mais conhecido como citocromo *c* oxidase, transfere elétrons para do citocromo *c* para o oxigênio e forma água. Nessa etapa os últimos dois prótons são bombeados (VOET e VOET, 1995; WALLACE, 1999).

O gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força-motriz para o complexo V, ou ATP sintase, formar ATP (fosforilação oxidativa). O ATP é transportado para fora da

mitocôndria com o concomitante transporte de ADP para dentro da mitocôndria, através de um sistema antiporte (VOET e VOET, 1995; HEALES et al., 1999; WALLACE, 1999; NELSON e COX, 2000).

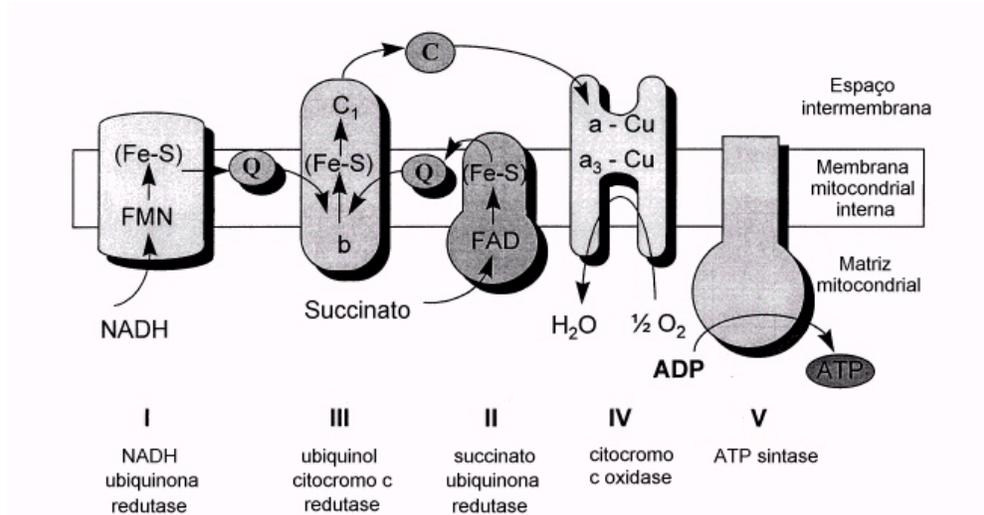


Figura 5.3. Cadeia respiratória mitocondrial (Adaptado de HEALES et al., 1999).

#### 5.4. Metabolismo energético e doenças neurodegenerativas

Deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP (HEALES et al., 1999). Sabe-se também que o dano causado à mitocôndria leva a uma rápida queda na produção de energia e morte celular (ANKARCORONA et al., 1995). A diminuição do metabolismo energético cerebral também pode levar à apoptose (HEALES et al., 1999). A redução de produção de energia no cérebro também pode comprometer a síntese de neurotransmissores (acetilcolina, glutamato, aspartato e GABA) e lipídios nesse tecido e pode, por isso, também levar a dano neuronal (DI DONATO, 2000). A redução do metabolismo energético também pode diminuir a captação de glutamato pelos astrócitos e pelos

neurônios, causando acúmulo excessivo de glutamato na fenda sináptica, que pode levar à morte neuronal (HENNEBERRY et al., 1989; LUDOLPH et al., 1993).

A diminuição no metabolismo energético cerebral parece estar associada com algumas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, isquemia cerebral e esclerose amiotrófica lateral (BRENNAN et al., 1985; BEAL, 1992; HEALES et al., 1999; BLASS, 2001; SCHURR, 2002). Acredita-se que a diminuição do metabolismo energético cerebral está envolvida na gênese de danos neurológicos dessas doenças (BEAL, 1992). Além disso, a diminuição do metabolismo energético no cérebro parece estar envolvida com alguns EIM, como a fenilcetonúria (RECH et al., 2002), acidemia metilmalônica (WAJNER et al., 1992) e hiperargininemia experimental em ratos (DELWING et al., 2003a).

## **6. Radicais Livres**

### *6.1. Histórico*

Em 1954, Gersham e Gilbert propuseram que alguns efeitos tóxicos do oxigênio poderiam ocorrer pela formação de radicais de oxigênio. McCord e Fridovich, em 1968, descreveram a enzima antioxidante superóxido dismutase, uma descoberta muito importante no estudo de radicais livres. A teoria da toxicidade do oxigênio pelo ânion superóxido, desenvolvido por Fridovich, em 1975, sugeria que a formação dessa espécie reativa de oxigênio “in vivo” seria responsável pelos efeitos tóxicos do oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984; PRYOR, 1988).

## 6.2. Definição

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Por isso, são muito reativos e atacam moléculas, como lipídios, proteínas e DNA. Dentre os radicais livres, podem-se destacar dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as de nitrogênio (ERN). As ERO mais importantes são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion hipoclorito ( $OCl^-$ ) e o oxigênio “singlet” ( $^1O_2$ ). O óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) constituem as principais ERN (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres são gerados em processos de oxidação biológica. A redução do oxigênio à água forma radicais livres, e o ânion superóxido é o primeiro radical livre formado nesse processo. Na cadeia respiratória mitocondrial, 5% do oxigênio utilizado não é completamente reduzido à água, e ocorre a formação de ânion superóxido. Essa ERO é muito reativa e é removida rapidamente pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxil e não existe nenhuma enzima que o remova. Por isso, as enzimas que decompõem o peróxido de hidrogênio, como a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX), são tão importantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; CADENAS e DAVIES, 2000).

Os radicais livres são gerados em muitos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo. Eles participam da fagocitose, processos de sinalização celular e estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas, em condições fisiológicas (WARD e PETERS, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE,

1999). O óxido nítrico desempenha funções importantes no sistema nervoso central, tais como neurotransmissão, plasticidade sináptica e aprendizado e memória. O óxido nítrico também tem função importante no controle da pressão arterial (HEALES et al., 1999).

### *6.3. Efeitos dos radicais livres em sistemas biológicos*

Os radicais livres podem provocar reações em cadeia e causar dano a um grande número de moléculas. O ataque de radicais livres a lipídios de membrana é chamado de lipoperoxidação (LPO). Na LPO, um radical livre reage com um lipídio insaturado (as membranas celulares são formadas principalmente por lipídios insaturados e proteínas), provocando uma reação em cadeia (com lipoperóxidos como produtos intermediários) e modificação das propriedades da membrana, como permeabilidade e fluidez, além de causar dano a proteínas transmembrana, como enzimas e receptores. A LPO tem como produto final, entre outros, o malondialdeído, que pode ser quantificado e usado para avaliação desse processo. Os radicais livres também podem atacar proteínas, principalmente nos resíduos de cisteína (-SH). As proteínas podem sofrer alterações na sua conformação e perda na sua função. O DNA também pode ser alvo de ataque de radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

### *6.4. Defesas antioxidantes*

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação desse substrato. Desse modo, os antioxidantes atuam como protetores da oxidação de biomoléculas por radicais livres e impedem a propagação da reação em cadeia provocada pelos mesmos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; FANG et al., 2002).

As principais defesas enzimáticas antioxidantes são a SOD, CAT e GPX. Além disso, antioxidantes não-enzimáticos, como a glutatona reduzida (GSH), tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C), entre outros, auxiliam no combate às ERO. Os antioxidantes estão amplamente distribuídos nos organismos vivos e constituem um sistema de defesa muito importante em condições aeróbicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; FANG et al., 2002).

#### 6.4.1. *Superóxido dismutase (SOD)*

A SOD é uma metaloenzima e catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido, formando peróxido de hidrogênio e oxigênio. Existem algumas formas de SOD, variando os metais presentes na enzima e a sua localização. A Cu-Zn-SOD (SOD que contém cobre e zinco) ocorre em praticamente todas as células eucarióticas, está localizada no citosol, e também pode ocorrer nos lisossomas, núcleo celular e no espaço intermembrana nas mitocôndrias. Além disso, esta forma também pode estar presente nos peroxissomas (FRIDOVICH, 1995; WARD e PETERS, 1995). Existe ainda um outro tipo de Cu-Zn-SOD, chamada de SOD extracelular (EC-SOD), presente em fluidos extracelulares (ABRAHAMSSON et al., 1992). A Mn-SOD (SOD que contém manganês), é encontrada nas mitocôndrias (FRIDOVICH, 1995; WARD e PETERS, 1995). O mecanismo geral de reação da SOD está demonstrado a seguir.

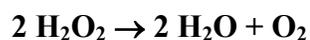


A importância da SOD é demonstrada em estudos onde camundongos geneticamente modificados, que não sintetizavam a Mn-SOD, morreram até os

primeiros dez dias de vida, geralmente com anormalidades cardíacas, acúmulo de gorduras no fígado e no músculo esquelético, bem como acidose metabólica. Verificou-se também que houve severo dano mitocondrial em vários tecidos, mostrando a importância da Mn-SOD para a função da mitocôndria (LEBOVITZ et al., 1996; MELOV et al., 1998). Outros estudos mostraram que camundongos que não sintetizavam a Cu-Zn-SOD apresentaram danos neurológicos e uma maior probabilidade de desenvolverem câncer e alteração na reprodução (REAUME et al., 1996; HO et al., 1998).

#### 6.4.2. *Catalase (CAT)*

A dismutação do ânion superóxido gera peróxido de hidrogênio, por ação da SOD. Uma das formas de eliminação do peróxido de hidrogênio é pela CAT, que atua sobre o mesmo e forma água e oxigênio (CHANCE et al., 1979; WARD e PETERS, 1995).



A CAT ocorre na maioria dos tecidos em humanos, estando presente em maior quantidade no fígado. Por outro lado, o cérebro apresenta pequenas quantidades de CAT (MARKLUND et al., 1982). A CAT localiza-se principalmente nos peroxissomas, as quais são estruturas que contém várias enzimas que produzem peróxido de hidrogênio, e também no citosol (CHANCE et al., 1979; WARD e PETERS, 1995). A localização da CAT nos peroxissomas provavelmente deve-se ao fato de que nessas estruturas existem muitas enzimas que produzem peróxido de hidrogênio (CHANCE et al., 1979).

#### 6.4.3. *Glutathione peroxidase (GPX)*

A outra forma de eliminar o peróxido de hidrogênio é através de peroxidases. A enzima mais importante dessa classe é a GPX, que remove o peróxido de hidrogênio através de sua redução a água com a oxidação da GSH. A GPX é amplamente distribuída em tecidos animais, geralmente localiza-se nas membranas celulares e é específica para a GSH como doador de hidrogênio. A GPX está presente em grande quantidade no fígado e tem selênio na sua estrutura (CHANCE et al., 1979; WARD e PETERS, 1995). O mecanismo de reação da GPX está demonstrado a seguir.



Além disso, a GPX pode terminar a reação em cadeia da LPO, removendo lipoperóxidos da membrana celular, pelo seguinte mecanismo (WARD e PETERS, 1995).

#### 6.4.4. *Glutathione reduzida (GSH)*

A GSH é um tripeptídeo, formado por glutamato, cisteína e glicina, e atua principalmente como substrato da enzima GPX. Ela também desempenha outras funções, como participação no metabolismo do ácido ascórbico e prevenção de oxidação de grupos sulfidrílicos (-SH) de proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A razão entre a GSH e a glutathione oxidada (GSSG) é alta, com menos de 5% da glutathione total estando presente na forma oxidada. Existe um mecanismo para a redução da GSSG em GSH, e essa reação é feita pela enzima glutathione redutase (GR), que requer uma

molécula de NADPH para regenerar cada molécula de GSH (CHANCE et al., 1979; WARD e PETERS, 1995).



#### 6.4.5. *α-Tocoferol (vitamina E)*

O organismo contém diferentes tocoferóis, mas o mais potente é o  $\alpha$ -tocoferol, também conhecido como vitamina E, e é lipossolúvel. Por isso, o  $\alpha$ -tocoferol está presente nas membranas celulares, nas mitocôndrias e em lipoproteínas plasmáticas. Assim, ele quebra as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres. Os lipoperóxidos atacam preferencialmente o  $\alpha$ -tocoferol, em vez de outro lipídio de membrana. Com a oxidação, forma-se o radical  $\alpha$ -tocoferoxil, que pode ser regenerado a  $\alpha$ -tocoferol pelo ácido ascórbico ou pela GSH (SOKOL, 1989; WARD e PETERS, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A deficiência de  $\alpha$ -tocoferol pode ocorrer em síndromes de má absorção de lipídios e tem como consequência danos neurológicos graves (SOKOL, 1989). Além disso, estudos epidemiológicos mostraram que a capacidade antioxidante da vitamina E é importante na prevenção da aterosclerose (GEY, 1990).

#### 6.4.6. *Ácido ascórbico (vitamina C)*

As plantas e a maioria dos animais podem sintetizar ácido ascórbico a partir da glicose. Humanos, outros primatas, o porquinho-da-índia e o morcego-das-frutas perderam uma enzima requerida para a síntese do ácido ascórbico, a gulonolactona

oxidase. Por isso, esses animais devem obter o ácido ascórbico da dieta (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, tem como principal função a regeneração do  $\alpha$ -tocoferol e forma nesse processo a forma oxidada, denominada ácido deidroascórbico (WARD e PETERS, 1995). O ácido ascórbico tem excelente ação antioxidante “in vitro” e atua como seqüestrador de vários radicais livres. Além disso, a vitamina C atua como cofator de enzimas envolvidas com a síntese de colágeno. A deficiência de vitamina C pode levar ao escorbuto, uma doença em que os vasos tornam-se fragilizados e que tem como principal característica o sangramento (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Estudos epidemiológicos também demonstraram que a deficiência de vitamina C aumenta a probabilidade do aparecimento de aterosclerose (GEY et al., 1987).

#### *6.5. Estresse oxidativo*

Os radicais livres são formados normalmente no metabolismo celular. As defesas antioxidantes, enzimáticas e não-enzimáticas, atuam contra a toxicidade dessas espécies e são responsáveis pela manutenção da homeostase entre a produção e a eliminação de radicais livres. No entanto, em certas condições, pode ocorrer aumento da produção de radicais livres suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante ou uma diminuição das defesas antioxidantes no organismo, favorecendo o que chamamos de estresse oxidativo (BONDY e LE BEL, 1993; CADENAS e DAVIES, 2000).

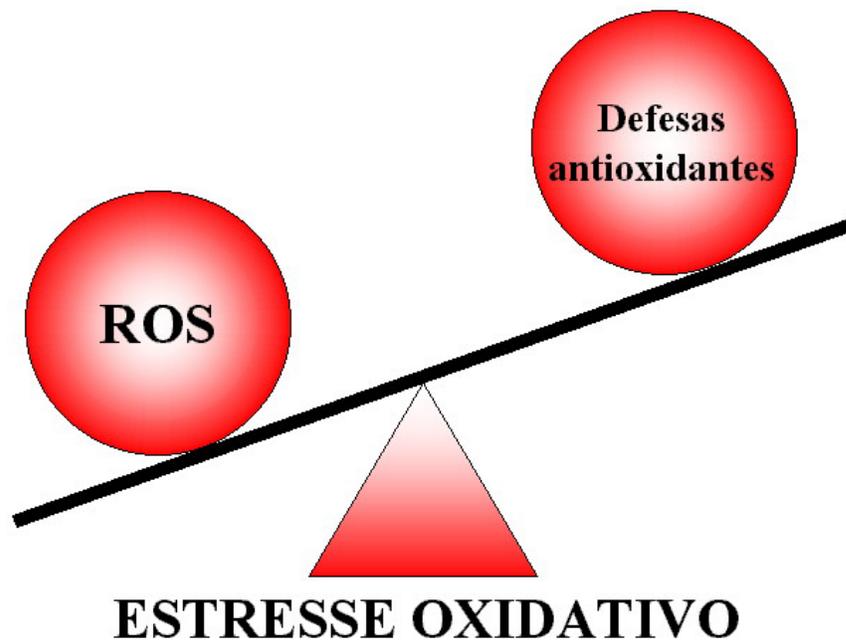


Figura 6.1. Estresse oxidativo (Adaptado de MARKS et al., 1996).

O estresse oxidativo pode provocar perda de função celular, por causar alterações no metabolismo das células. No sistema nervoso central, neurotoxicidade e morte celular podem ocorrer devido ao estresse oxidativo (BONDY e LE BEL, 1993; WARD e PETERS, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; CADENAS e DAVIES, 2000). É importante ressaltar que o estresse oxidativo pode ocorrer em condições fisiológicas (fagocitose) e patológicas (doenças neurodegenerativas e aterosclerose) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Na homocistinúria, a rota metabólica bloqueada é a da degradação de homocisteína e formação de cisteína, um dos três aminoácidos formadores do antioxidante não-enzimático GSH. A diminuição da síntese de cisteína pode, por isso, levar à diminuição de GSH, diminuindo a defesa antioxidante em pacientes homocistinúricos (MUDD et al., 2001).

### *6.6. Radicais livres e doenças neurodegenerativas*

O cérebro apresenta algumas características que o tornam mais sensível ao estresse oxidativo. O alto consumo de  $O_2$  por massa de tecido é um fator muito importante e contribui para a maior sensibilidade do cérebro ao estresse oxidativo. O cérebro possui uma percentagem muito baixa do peso corporal, mas consome em torno de 20% do  $O_2$  do organismo. O cérebro também possui alguns neurotransmissores auto-oxidáveis, como a dopamina, que reage com  $O_2$  e forma superóxido e peróxido de hidrogênio. O metabolismo da dopamina, pela enzima monoamino oxidase, também leva à produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, a estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos pode causar estresse oxidativo. A situação pode ser agravada, já que algumas espécies reativas de oxigênio inibem a recaptação de glutamato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O cérebro também apresenta altos níveis de ferro, que pode catalisar reações de formação de radicais livres. Além disso, os lipídios de membrana dos neurônios são ricos em ácidos graxos de cadeia lateral poli-insaturada, alvos fáceis para o ataque de radicais livres e que tem como consequência a LPO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O cérebro também possui baixos níveis de antioxidantes, principalmente a enzima CAT (MARKLUND et al., 1982; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O estresse oxidativo parece estar envolvido na patogênese do dano neurológico de várias doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, além das escleroses múltipla e amiotrófica lateral (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Estudos realizados em nosso laboratório mostram que o estresse oxidativo também está aumentado em modelos experimentais químicos de EIM, como

hiperprolinemia tipo II (DELWING et al., 2003b), hiperargininemia (WYSE et al., 2001b) e fenilcetonúria (KIENZLE-HAGEN et al., 2002).

## **7. Memória**

### *7.1. Conceito*

Os processos de aprendizagem e memória são propriedades fundamentais do sistema nervoso central. A memória é um processo dinâmico e pode ser dividida em três etapas: aquisição (obtida através de experiências), consolidação (quando a informação obtida na aquisição é processada) e armazenamento de informações (IZQUIERDO, 1989). A evocação é utilizada frequentemente para a avaliação da memória, verificada através de mudanças comportamentais provocadas pelos processos de aprendizagem e formação de memória (PARIS, 2001).

Os fenômenos de plasticidade sináptica, característicos do sistema nervoso central, são responsáveis pelas alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas verificadas nos processos de aprendizagem e memória (IZQUIERDO e MEDINA, 1997; IZQUIERDO, 2002).

As memórias podem ser classificadas de várias maneiras. Quanto à sua natureza, por exemplo, podem ser de arquivo (memória de referência) ou transitórias (memória de trabalho) (IZQUIERDO, 2002).

### *7.2. Homocisteína e memória*

Os pacientes homocistinúricos apresentam um grau variado de deficiências neurológicas. Atraso no desenvolvimento mental, verificado por deficiências cognitivas, geralmente ocorrem nos dois primeiros anos de vida. Além disso, o retardo mental, convulsões e outras alterações neurológicas são freqüentes em pacientes homocistinúricos (MUDD et al., 2001).

Trabalho realizado recentemente em nosso laboratório mostrou uma diminuição de memória na tarefa de esQUIVA inibitória provocada por administração aguda de homocisteína. Além disso, o pré-tratamento com as vitaminas E e C preveniu esse efeito (REIS et al., 2002).

### *7.3. Labirinto Aquático de Morris*

O labirinto aquático de Morris, também chamado de “water maze”, é um teste comportamental utilizado para a avaliação de aprendizagem espacial (D’HOOGE e DE DEYN, 2001). Esse teste comportamental foi desenvolvido por Morris, em 1982 (SANTOS, 1999).

O hipocampo está envolvido nos processos de aquisição, evocação, consolidação e armazenamento de memória espacial (D’HOOGE e DE DEYN, 2001). Além disso, estudos mostraram que animais com lesões hipocampais apresentaram mais dificuldade para executar a tarefa no labirinto aquático de Morris (MORRIS et al., 1982). Por isso, a tarefa experimental do “water maze” é amplamente utilizada para a avaliação da integridade funcional e estrutural do hipocampo (MORRIS et al., 1982; MORRIS, 1984). No entanto, o mecanismo de aquisição da memória espacial é muito complexo e envolve outras estruturas cerebrais (D’HOOGE e DE DEYN, 2001). Verificou-se que o

estriado e o cerebelo também afetam o desempenho dos animais na tarefa do “water maze” (WHISHAW et al., 1987; LALONDE, 1994). Além da avaliação da memória espacial, o labirinto aquático de Morris pode ser utilizado para avaliação da memória de trabalho (SANTOS, 1999).

O equipamento utilizado para a tarefa consiste de um tanque circular preenchido com água. O ambiente deve apresentar alguns pontos de referência na parede. Durante a fase de treino, os animais são colocados no tanque, por vários dias, e devem aprender a localização de uma plataforma submersa (D’HOOGE e DE DEYN, 2001). Como a água é um meio aversivo para os ratos, eles procuram a plataforma, onde não precisam nadar. Além disso, os ratos são nadadores natos e possuem boa capacidade de localização espacial (SANTOS, 1999). Depois de alguns dias de treino, o teste é realizado. A plataforma é removida e o animal é colocado no tanque por 60 segundos, quando são avaliados alguns parâmetros para verificar a memória espacial. O tempo que o animal permanece no tanque e os parâmetros analisados podem variar. Alguns parâmetros usados para avaliação da memória espacial são o tempo em que o animal permanece no quadrante onde estava a plataforma (quadrante alvo) e o número de vezes que ele passa exatamente onde estava a plataforma (D’HOOGE e DE DEYN, 2001). O procedimento para a avaliação da memória de trabalho apresenta algumas diferenças em relação ao da memória espacial (SANTOS, 1999).

## **II. OBJETIVOS**

Considerando que os mecanismos bioquímicos envolvidos na gênese da disfunção neurológica presente na homocistinúria são pouco conhecidos e que a homocisteína tem efeitos neurotóxicos e aumenta a formação de radicais livres, esse trabalho teve como objetivos:

1. Desenvolver um modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia em ratos, semelhante àquela encontrada em pacientes homocistinúricos.
2. Estudar a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e alguns parâmetros do metabolismo energético (produção de  $\text{CO}_2$ , captação de glicose, produção de lactato e atividades das enzimas succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase) em hipocampo de ratos submetidos ao modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia.
3. Avaliar a aprendizagem e memória na tarefa do labirinto aquático de Morris em ratos submetidos ao modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia.
4. Verificar o efeito “in vitro” de substâncias acumuladas na homocistinúria, homocisteína e metionina, sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, alguns parâmetros do metabolismo energético (produção de  $\text{CO}_2$ , captação de glicose, produção de lactato e atividade da enzima citocromo *c* oxidase), e o estresse oxidativo (potencial antioxidante total, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em hipocampo de ratos.
5. Estudar o mecanismo de inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causada pela homocisteína “in vitro” em hipocampo de ratos.

6. Verificar o efeito de antioxidantes (glutathiona, ditioneitol e cisteína) e da enzima antioxidante superóxido dismutase sobre a inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causada pela homocisteína em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos.

### **III. RESULTADOS**

*Artigo 1*

*Redução da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em hipocampo de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia quimicamente induzida.*

**Reduction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia.**

*Emilio L. Streck, Cristiane Matté, Paula S. Vieira, Fernanda Rombaldi, Clovis M.D.*

*Wannmacher, Moacir Wajner e Angela T.S. Wyse.*

Neurochemical Research, 27: 1585-1590 (2002).

*Artigo 2*

*Diminuição do metabolismo energético em hipocampo de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia quimicamente induzida.*

**Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia.**

*Emilio L. Streck, Cristiane Matté, Paula S. Vieira, Thiago Calcagnotto, Clovis M.D.*

*Wannmacher, Moacir Wajner e Angela T.S. Wyse.*

*Biochimica et Biophysica Acta, 1637: 187-192 (2003).*

*Artigo 3*

*Hiperhomocisteinemia crônica provoca deficiência de memória na tarefa do labirinto aquático de Morris.*

**Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task.**

*Emilio L. Streck, Caren S. Bavaresco, Carlos A. Netto e Angela T.S. Wyse.*

Behavioural Brain Research (submetido).

*Artigo 4*

*Inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pelos metabólitos acumulados na homocistinúria.*

**Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria.**

*Emilio L. Streck, Alexandra I. Zugno, Bárbara Tagliari, Clovis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner e Angela T.S. Wyse.*

Metabolic Brain Disease, 17: 83-91 (2002).

*Artigo 5*

*Metabolismo energético cerebral está comprometido pelos metabólitos acumulados na homocistinúria.*

**Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria.**

*Emilio L. Streck, Débora Delwing, Bárbara Tagliari, Cristiane Matté, Clovis M.D.*

*Wannmacher, Moacir Wajner e Angela T.S. Wyse.*

Neurochemistry International, 1314: 1-6 (2003).

*Artigo 6*

*Efeito “in vitro” da homocisteína sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo de ratos.*

**In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus.**

*Emilio L. Streck, Paula S. Vieira, Fernanda Rombaldi, Clovis M.D. Wannmacher, Carlos S. Dutra-Filho, Moacir Wajner e Angela T.S. Wyse.*

Metabolic Brain Disease, 18: 147-154 (2003).

*Artigo 7*

*Estudo sobre o mecanismo de inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase causada pela homocisteína.*

**On the mechanism of the inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity caused by homocysteine.**

*Emilio L. Streck, Alexandra I. Zugno, Bárbara Tagliari, João J.F. Sarkis, Moacir Wajner, Clovis M.D. Wannmacher e Angela T.S. Wyse.*

International Journal of Developmental Neuroscience, 20: 77-81 (2002).

*Artigo 8*

*Inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase de cérebro de ratos pela homocisteína é provavelmente causada por estresse oxidativo.*

**Inhibition of rat brain Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress.**

*Emilio L. Streck, Alexandra I. Zugno, Bárbara Tagliari, Renata Franzon, Clovis M.D.*

*Wannmacher, Moacir Wajner e Angela T.S. Wyse.*

*Neurochemical Research, 26: 1195-1200 (2001).*

## **IV. DISCUSSÃO**

A homocistinúria é um EIM causado pela deficiência na atividade da enzima CBS e caracteriza-se bioquimicamente pelo acúmulo tecidual de homocisteína e metionina. Os pacientes homocistinúricos podem apresentar um grau variado de retardo mental, distúrbios psiquiátricos, convulsões, isquemia cerebral, tromboembolismo, complicações vasculares e deslocamento da lente ocular (MUDD et al., 2001).

O exato mecanismo dos danos neuronais da homocistinúria permanece incerto, embora muitos estudos estejam sendo realizados na tentativa de melhor compreender as alterações neurológicas dessa doença. Nesse contexto, Parsons e colaboradores (1998) mostraram que a homocisteína tem ação excitotóxica sobre linhagens celulares de neurônios humanos. Por outro lado, Kim e Pae (1996) demonstraram que a homocisteína causa morte celular em cultura de neurônios de ratos por ativação de receptores NMDA e pela produção de radicais livres. Além disso, a administração intraperitoneal de homocisteína provoca convulsões em ratos (KUBOVÁ et al., 1995). Sabe-se também que, na auto-oxidação da homocisteína, são formados o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (HOGG, 1999).

Modelos animais são importantes instrumentos de pesquisa no estudo de mecanismos fisiopatológicos de doenças que ocorrem em humanos. Já foram desenvolvidos modelos animais experimentais de vários EIM em nosso laboratório, como fenilcetonúria (WYSE et al., 1995b), hiperprolinemia tipo II (MOREIRA et al., 1989) e acidemias metilmalônica (DUTRA et al., 1991) e propiônica (BRUSQUE et al., 1999).

O principal objetivo desse trabalho foi desenvolver um modelo animal químico experimental de hiperhomocisteinemia, com o objetivo de estudar e melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos da homocistinúria. As doses foram escolhidas com o

objetivo de induzir, nos animais, concentrações plasmáticas de homocisteína semelhantes às encontradas em pacientes homocistinúricos, e foram calculadas conforme a idade e o peso dos animais. O tratamento crônico com homocisteína foi realizado do 6<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia de vida, já que, nesse período, os ratos apresentam um rápido desenvolvimento do cérebro, sinaptogênese (CLARK et al., 1993), proliferação celular intensa e crescimento (ENESCO e LEBLOND, 1962; WINICK e NOBLE, 1965) e são mais vulneráveis a substâncias endógenas e exógenas.

A análise dos parâmetros farmacocinéticos medidos após a administração de homocisteína mostrou que a eliminação (metabolização e/ou excreção) do aminoácido aumentou com o avanço da idade dos ratos, já que o volume de distribuição e a depuração plasmática aumentaram e o tempo de meia-vida plasmática diminuiu. A concentração plasmática máxima de homocisteína ocorreu 15 minutos após a administração do aminoácido e foi semelhante à concentração de homocisteína encontrada comumente em pacientes homocistinúricos (de 0,4 a 0,5 mM).

Além disso, verificamos que o tratamento crônico com homocisteína levou a concentrações elevadas de homocisteína no cérebro dos ratos tratados, sugerindo que a homocisteína atravessa a barreira sangue-cérebro. De forma semelhante ao sangue, a concentração cerebral máxima de homocisteína ocorreu 15 minutos após a administração do aminoácido, em torno de 60 nmol/g de tecido. Além disso, as concentrações de homocisteína no sangue diminuíram de forma mais rápida do que no cérebro. A queda mais rápida das concentrações de homocisteína no sangue deve ocorrer, provavelmente, porque o aminoácido é rapidamente metabolizado no fígado e excretado na urina, fato observado em pacientes homocistinúricos (MUDD et al., 2001).

Nossos dados também mostraram que o tratamento crônico com homocisteína não alterou o crescimento dos animais, já que o peso corporal, do cérebro e do hipocampo não foi alterado, quando comparado com os animais tratados com solução salina (controles). Esses dados são importantes, porque permitem que o modelo químico experimental seja utilizado para estudar os mecanismos fisiopatológicos da doença sem a interferência do estado nutricional dos animais.

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase desempenha um papel fundamental no sistema nervoso central, mantendo o gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal. Além disso, essa enzima regula o volume e o pH intracelular (GEERING, 1990; LINGREL e KUNTZWEILER, 1994). A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase está presente em grande quantidade no tecido cerebral (HANSEN e CLAUSEN, 1988) e consome de 40 a 60% do ATP formado no cérebro (ERECINSKA e SILVER, 1994).

Foi demonstrado que a inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase está relacionada com a disfunção neurológica (LEES, 1990). Além disso, sabe-se que a enzima está inibida na epilepsia (GRISAR, 1984; GRISAR et al., 1992), na doença de Alzheimer (LIGURI et al., 1990; HATTORI et al., 1998), em convulsões (RENKAWEK et al., 1992) e na isquemia cerebral (MATEJOVICOCA et al., 1996; WYSE et al., 2000a).

A inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase também é causada por metabólitos acumulados em vários EIM. A fenilalanina, metabólito acumulado na fenilcetonúria, inibe a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase “in vitro” e “in vivo” (WYSE et al., 1995a; WYSE et al., 1999). A administração crônica de prolina, de ácido propiônico e de ácido metilmalônico, acumulados na hiperprolinemia tipo II e nas acidemias propiônica e metilmalônica, respectivamente, também inibe a atividade da enzima em cérebro de ratos (PONTES et al., 1999; PONTES et al., 2001; WYSE et al., 1998a; WYSE et al.,

2000b). Além disso, os mesmos metabólitos inibiram a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase “in vitro” (PONTES et al., 1999; PONTES et al., 2001; WYSE et al., 1998a; WYSE et al., 2000b). Estudos também mostram que alguns compostos guanidínicos, acumulados na hiperargininemia, e a administração aguda de arginina diminuem a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase cerebral de ratos (SILVA et al., 1999; WYSE et al., 2001a).

Considerando a importância da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase para o funcionamento normal do sistema nervoso central e que os pacientes homocistinúricos apresentam alterações neurológicas, nesse trabalho verificamos o efeito da hiperhomocisteinemia quimicamente induzida sobre a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos.

Nossos resultados mostraram que a administração crônica de homocisteína provocou uma diminuição significativa na atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos, em aproximadamente 40%. Por outro lado, o tratamento não alterou significativamente a atividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, sugerindo um efeito específico da homocisteína sobre a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase. No entanto, os mecanismos responsáveis pela inibição da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase causada pelo tratamento com homocisteína são pouco conhecidos, uma vez que a regulação da atividade da enzima é muito complexa e mediada por vários fatores. Segundo Bertorello e Kats (1995), a regulação da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase pode ser de longa duração, quando ocorrem alterações nas taxas de síntese e degradação da enzima, ou de curta duração, quando ocorrem modificações rápidas na atividade da enzima e que geralmente ocorre em minutos. A regulação de curta duração ocorre de forma secundária a mudanças nas concentrações intracelulares de sódio, limitantes para as bombas em células intactas. Além disso, sabe-se que as modificações rápidas na atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase também podem ser

mediadas por redes complexas de mecanismos de sinais de transdução gerados por estímulos extracelulares. Os mecanismos de sinalização envolvidos nesse tipo de regulação caracterizam-se por reações de fosforilação, através de ativação ou inibição de proteínas quinases e fosfatases.

O efeito inibitório “in vivo” da homocisteína sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase não deve ocorrer, provavelmente, por uma simples inibição direta na enzima, pois, se esse fosse o caso, a atividade enzimática seria normal nas membranas plasmáticas sinápticas preparadas 12 horas após a última administração de homocisteína. A homocisteína “in vivo” provavelmente inibe a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de forma indireta, por mecanismos distintos, tais como 1) um aumento na taxa de degradação e/ou uma diminuição na taxa de síntese da enzima, 2) alterações na membrana celular na qual a enzima está inserida, causada por peroxidação dos lipídios da membrana e 3) modificações estruturais e funcionais na enzima, causada pelo ataque de radicais livres (LEES, 1991; DOBROTA et al., 1999). A inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase provocada pela administração crônica de homocisteína provavelmente ocorre por um conjunto de fatores e por vários mecanismos.

Com o objetivo de verificar o efeito direto da homocisteína sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, nesse trabalho também estudamos o efeito “in vitro” da homocisteína sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos. Nesse estudo foi realizada a preparação de membranas plasmáticas sinápticas de ratos de 28 dias de idade, e a homocisteína foi adicionada ao meio de incubação para a medida da atividade da enzima. Com esse desenho experimental é possível verificar o efeito direto de uma substância sobre a atividade da enzima. Também verificamos o

efeito “in vitro” da metionina, outro metabólito acumulado na homocistinúria, sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos.

Nossos resultados mostraram que a homocisteína e a metionina inibiram a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase “in vitro”, mas não alteraram a atividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, indicando um efeito específico desses metabólitos sobre a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. A homocisteína inibiu a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase nas concentrações de 50 a 500  $\mu\text{M}$ , com inibição máxima de 63%, na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . A metionina inibiu a enzima de 1,5 a 2,0 mM, com inibição máxima de 37%, em 2,0 mM. Além disso, a análise da regressão linear mostrou que a homocisteína e a metionina inibiram a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de forma dose-dependente.

O fato de que ambos aminoácidos inibem a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membrana plasmática sináptica purificada sugere um mecanismo de ação similar. Nesse contexto, trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que alguns aminoácidos, fenilalanina e prolina, inibem a atividade dessa enzima “in vivo” e “in vitro” (WYSE et al., 1995; PONTES et al., 1999; WYSE et al., 1999; PONTES et al., 2001). No entanto, outros aminoácidos, como a arginina (SILVA et al., 1999), L- ou  $\beta$ -alanina (WYSE et al., 1998b) e soluções-tampão contendo histidina não alteram a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (VAN DER HIJDEN et al., 1989), indicando que o efeito inibitório é específico para alguns aminoácidos.

O modelo proposto por Chevillard e colaboradores (1993) foi utilizado para estudar o mecanismo de ação “in vitro” da homocisteína e da metionina sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Com esse objetivo, realizou-se um estudo cinético de interação entre os dois aminoácidos. A homocisteína e a metionina foram testadas

simultaneamente, com concentrações diferentes de cada aminoácido (100  $\mu$ M de homocisteína e 2,0 mM de metionina) e proporcionalmente crescente para um e decrescente para o outro. As concentrações testadas para cada aminoácido são escolhidas com base na percentagem de inibição, que deve ser semelhante entre as duas substâncias. A dosagem da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase foi realizada e os dados plotados em um gráfico, com as concentrações dos aminoácidos no eixo das ordenadas. De acordo com Chevillard e colaboradores (1993), uma reta no “plot” de competição, indica que as duas substâncias atuam no mesmo sítio de ligação na enzima. A análise de nossos dados sugere que a homocisteína e a metionina inibem a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase através de um mesmo sítio de ligação.

Baseado no fato de que a homocisteína induz a produção de radicais livres (HOGG, 1999) e de que a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase apresenta grupos  $-\text{SH}$  sensíveis ao estresse oxidativo (YUFU et al., 1993), um outro mecanismo proposto para a inibição da enzima causada pela homocisteína é através da oxidação de grupos  $-\text{SH}$  da mesma. Nesse contexto, verificou-se o efeito da pré-incubação de homogeneizados de hipocampus na presença de homocisteína e de metionina sobre a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica. Os resultados mostraram que a pré-incubação com homocisteína inibiu a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase significativamente, enquanto que a pré-incubação com metionina não alterou a atividade da enzima. Além disso, a cisteína, um importante antioxidante endógeno e precursor da GSH, preveniu o efeito inibitório causado pela homocisteína sobre a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase.

Através da análise dos dados desse trabalho, podemos concluir que a homocisteína e a metionina inibem a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase “in vitro”, atuando em

um sítio de ligação comum da enzima. Além disso, a homocisteína, e não a metionina, inibe a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de forma indireta, por oxidação de grupos  $-\text{SH}$  da enzima.

Com o objetivo de melhor compreender o mecanismo de inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causada pela homocisteína “in vitro”, estudamos também a cinética de inibição da enzima causada pela mesma. A análise dos dados mostrou que a homocisteína inibe a enzima de forma não-competitiva com o ATP, uma vez que o  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) não foi alterado e a  $V_{max}$  (velocidade máxima) diminuiu à medida que aumentava a concentração do aminoácido.

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a fenilalanina inibe a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos, enquanto que a alanina não altera a atividade da enzima. No entanto, quando combinada com a fenilalanina, a alanina previne o efeito inibitório desse aminoácido sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (WYSE et al., 1995a; WYSE et al., 1998b). Com base nesses dados, resolvemos estudar a cinética de interação da homocisteína e da fenilalanina sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a cinética de reversão pela alanina da inibição da atividade da enzima causada pela homocisteína. De modo semelhante ao estudo anterior, o modelo proposto por Chevillard e colaboradores (1993) foi utilizado. As concentrações de homocisteína e fenilalanina utilizadas foram de 100  $\mu\text{M}$  e 1,0 mM, respectivamente.

Nossos resultados mostraram que a homocisteína e a fenilalanina inibiram a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase atuando em um mesmo sítio na enzima, reforçando o trabalho anterior, onde foi demonstrado que a homocisteína e a metionina também inibiram a enzima

ligando-se no mesmo sítio. Além disso, verificamos que a alanina não inibiu a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e reverteu a inibição da enzima causada pela homocisteína, de forma competitiva. Se a alanina também apresentar uma reversão do efeito inibitório da homocisteína sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase “in vivo”, seria interessante desenvolver mais estudos sobre a suplementação de alanina, com o objetivo de verificar um possível benefício de seu uso na dieta dos pacientes homocistinúricos.

A partir desses dados, sugere-se que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase tem um sítio de ligação comum para esses aminoácidos e que a inibição da enzima depende da hidrofobicidade do ligante. Esses dados estão de acordo com outros estudos, onde foi demonstrado que a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase depende da hidrofobicidade da molécula (CARFAGNA e MUHOBERAC, 1993).

Considerando que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é inibida por radicais livres (LEES, 1991; DOBROTA et al., 1999), principalmente pela oxidação de grupos  $-\text{SH}$  (YUFU et al., 1993), e que a homocisteína induz a produção de EROs, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (HOGG, 1999), realizamos outros experimentos com o objetivo de identificar possíveis efeitos inibitórios indiretos “in vitro” da homocisteína sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causada pela homocisteína. Para esses experimentos, foram utilizados homogeneizados de hipocampo de ratos, que contêm toda a maquinaria celular, diferentemente da membrana plasmática sináptica purificada. As atividades da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase foram determinadas em membrana plasmática sináptica preparada após 1 hora de incubação dos homogeneizados de hipocampo com homocisteína e metionina.

Verificou-se que a incubação de homogeneizados de hipocampo com homocisteína (1,0 mM) inibiu a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e não alterou a atividade

da  $Mg^{2+}$ -ATPase. Por outro lado, a incubação de homogeneizados de hipocampo com metionina (1,0 mM) não alterou a atividade das ATPases. Considerando que a homocisteína induz a produção de radicais livres (HOGG, 1999) e que a  $Na^+,K^+$ -ATPase é sensível ao estresse oxidativo (LEES, 1991; YUFU et al., 1993; DOBROTA et al., 1999), testamos o efeito de antioxidantes (enzima superóxido dismutase (SOD), glutathiona reduzida (GSH), cisteína, ditioneitol (DTT) e trolox) e de gangliosídeos  $GM_1$  sobre a inibição da  $Na^+,K^+$ -ATPase causada pela homocisteína. Verificou-se que os antioxidantes e o gangliosídeo  $GM_1$  não alteraram a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase. Nossos resultados mostraram que antioxidantes que impedem a oxidação de grupos  $-SH$  das proteínas (GSH, cisteína e DTT) e a SOD preveniram a inibição da atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase causada pela homocisteína. Esses dados sugerem que a homocisteína inibe a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase por oxidação dos grupos  $-SH$  e que o ânion superóxido e outros radicais livres derivados provavelmente também estão envolvidos na inibição da enzima.

Por outro lado, o trolox, antioxidante que atua inibindo a lipoperoxidação, não preveniu o efeito inibitório da homocisteína sobre a atividade da enzima. Esse resultado sugere que a inibição da atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase não ocorreu por lipoperoxidação. Além disso, o gangliosídeo  $GM_1$ , considerado um agente neuroprotetor (AVROVA et al., 1999), preveniu o efeito inibitório da homocisteína sobre a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase.

Nossos trabalhos, em conjunto, mostraram que a administração crônica de homocisteína inibiu a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos. A homocisteína e a metionina também inibiram a atividade dessa enzima “in vitro”. Além disso, a pré-incubação de homogeneizados de hipocampo com

homocisteína, mas não com metionina, também inibiu a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, e foi prevenida por alguns antioxidantes e pelo gangliosídeo  $\text{GM}_1$ .

O funcionamento normal do sistema nervoso central depende da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, a redução da atividade dessa enzima pode provocar dano neuronal (LEES, 1990) e a inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pode estar parcialmente relacionada com a disfunção neurológica característica dos pacientes homocistinúricos.

O efeito da homocisteína e da metionina sobre o metabolismo energético em hipocampo de ratos também foi investigado. Sabe-se que a diminuição na energia pode estar envolvida na fisiopatologia de algumas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, isquemia cerebral e esclerose amiotrófica lateral (BRENNAN et al., 1985; BEAL, 1992; HEALES et al., 1999; BLASS, 2001; SCHURR 2002) e também de alguns EIM, como a fenilcetonúria (RECH et al., 2002), acidemia metilmalônica (WAJNER et al., 1992) e hiperargininemia (DELWING et al., 2003). Sabe-se também que uma diminuição no funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial leva à redução da produção de ATP (HEALES et al., 1999) e que danos mitocondriais estão envolvidos com a morte celular por diminuição na produção de energia (ANKARCRONA et al., 1995). Além disso, a homocisteína é considerada um fator de risco para algumas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, além da isquemia cerebral (MATTSON et al., 2002).

Baseado no fato de que uma diminuição no metabolismo energético está relacionada com doenças neurodegenerativas e que os pacientes homocistinúricos apresentam disfunções neurológicas, verificamos o efeito da administração crônica de homocisteína sobre alguns parâmetros de metabolismo energético em hipocampo de ratos. O efeito do tratamento crônico com homocisteína foi investigado sobre a produção

de CO<sub>2</sub> a partir de acetato (avaliação do ciclo de Krebs), produção de lactato (avaliação do metabolismo anaeróbico), consumo de glicose e as atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase (complexo IV).

Nossos resultados mostraram que a administração crônica de homocisteína diminuiu a produção de CO<sub>2</sub> e o consumo de glicose, mas não alterou a produção de lactato. Esses dados sugerem que, provavelmente, houve uma diminuição da glicólise aeróbica e do ciclo de Krebs e, conseqüentemente, do consumo de glicose. A produção de lactato não foi alterada provavelmente porque o consumo de glicose também diminuiu.

O tratamento crônico com homocisteína também alterou o funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial, inibindo significativamente a atividade das enzimas succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase de hipocampo de ratos. A diminuição na atividade dessas enzimas pode explicar a diminuição do consumo de glicose e da produção de CO<sub>2</sub> (ciclo de Krebs) observadas com o mesmo tratamento.

Com o objetivo de investigar o efeito direto da homocisteína sobre o metabolismo energético cerebral, estudamos o efeito “in vitro” da homocisteína sobre alguns parâmetros do metabolismo energético (produção de CO<sub>2</sub>, produção de lactato, consumo de glicose e atividade da enzima citocromo *c* oxidase) em hipocampo de ratos. O efeito “in vitro” da metionina sobre os mesmos parâmetros de metabolismo energético cerebral também foi investigado.

Nossos resultados mostraram que a homocisteína inibiu a produção de CO<sub>2</sub>, com inibição máxima de 35%, na concentração de 500 µM. A metionina, por sua vez, inibiu a produção de CO<sub>2</sub> em 30%, na concentração de 2,0 mM. Os dois aminoácidos

inibiram a produção de CO<sub>2</sub> de forma dose-dependente. Além disso, a homocisteína e a metionina não alteraram o consumo de glicose em hipocampo de ratos. Por outro lado, a homocisteína e a metionina aumentaram a produção de lactato “in vitro” em hipocampo de ratos, em 30% e 40%, respectivamente. O aumento na produção de lactato provocado por ambos aminoácidos também ocorreu de forma dose-dependente. Por fim, verificamos que a homocisteína inibiu a atividade da citocromo *c* oxidase, enzima marcadora da fosforilação oxidativa, em torno de 30%, de forma dose-dependente, enquanto que a metionina não alterou a atividade dessa enzima.

Sabe-se que a redução do metabolismo energético no cérebro pode ter várias conseqüências, como a diminuição da síntese de neurotransmissores (acetilcolina, glutamato, aspartato e GABA) e lipídios, e podem levar a dano neurológico (HERTZ e PENG, 1992). A diminuição do metabolismo energético também pode diminuir a recaptação de glutamato pelas células gliais e pelos neurônios, causando um acúmulo excessivo de glutamato na fenda sináptica e levando à excitotoxicidade (HENNEBERRY et al., 1989; SCHINDER et al., 1996; NOVELLI et al., 1998). A diminuição do metabolismo energético pode ser um dos mecanismos pelos quais a homocisteína causa morte neuronal por superestimulação de receptores do tipo NMDA (KIM e PAE, 1996).

A citocromo *c* oxidase é o complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, e catalisa a transferência de elétrons do citocromo *c* para o O<sub>2</sub> (CAPALDI, 1995). Por isso, uma inibição na atividade dessa enzima pode levar à redução incompleta do O<sub>2</sub> e, por conseqüência, à formação de radicais livres e diminuição da produção de ATP (MILATOVIC et al., 2001; GUPTA et al., 2002). A inibição da cadeia respiratória mitocondrial pode ser muito prejudicial ao tecido cerebral, já que no cérebro a

fosforilação oxidativa é muito ativa e importante (DI DONATO, 2000). Nesse contexto, foi demonstrado que a homocisteína altera a expressão mitocondrial de genes de proteínas da cadeia respiratória, além de modificar a estrutura e função das mitocôndrias em cultura de células humanas, inibindo as taxas de crescimento celular e de respiração mitocondrial (AUSTIN et al., 1998). Além disso, a diminuição na atividade das enzimas succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase, causada pela homocisteína “in vivo” e “in vitro”, pode ser muito prejudicial ao tecido cerebral. Além disso, vários estudos demonstram que a homocisteína provoca injúria celular (HARKER et al., 1974, 1983; HLADOVEC, 1979; WALL et al., 1980; DE GROOT et al., 1983; STARKEBAUM e HARLAN, 1986; HULTBERG et al., 1995).

Nossos resultados mostram que os animais submetidos ao modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia apresentam uma diminuição do metabolismo energético no cérebro. Além disso, a homocisteína e a metionina causaram uma diminuição no metabolismo energético cerebral “in vitro”. Nossos achados podem estar, portanto, parcialmente associados com sintomas neurológicos característicos dos pacientes homocistinúricos.

O efeito da homocisteína sobre o estresse oxidativo também foi investigado em hipocampo de ratos. De forma semelhante às alterações do metabolismo energético no cérebro, o aumento do estresse oxidativo parece estar relacionado com a fisiopatologia de algumas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington e esclerose múltipla e amiotrófica lateral (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) e em alguns EIM, como hiperprolinemia tipo II (DELWING et al., 2003), hiperargininemia (WYSE et al., 2001) e fenilcetonúria (KIENZLE-HAGEN et al., 2002).

O tecido cerebral é muito sensível ao estresse oxidativo por várias razões, como o alto consumo de O<sub>2</sub> por massa de tecido, altos níveis de ferro e o baixo nível de defesas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Sabe-se também que, na auto-oxidação da homocisteína, ocorre a formação de ERO, como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (HOGG, 1999). Além disso, foi relatado que a homocisteína causa morte neuronal por produção de radicais livres (KIM e PAE, 1996). Por isso, resolvemos estudar o efeito “in vitro” da homocisteína sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo de ratos, tais como a dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), potencial antioxidante total (TRAP) e as atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. A medida de TBARS é usada para avaliar a LPO, quando os lipídios sofrem ação de radicais livres.

Nossos resultados mostraram que a homocisteína, em concentrações semelhantes àquelas encontradas em pacientes homocistinúricos, aumentou a quantidade de TBARS (de 100 a 500 µM) e diminuiu o TRAP (de 10 a 500 µM) “in vitro”, de forma dose-dependente. A alteração desses dois parâmetros é um forte indicativo de indução de estresse oxidativo, já que o mesmo ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. Verificamos também que a homocisteína não altera as atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase “in vitro” em hipocampo de ratos.

Nossos achados sugerem que a homocisteína pode aumentar a produção de radicais livres e diminuir a defesa antioxidante em hipocampo de ratos. Os danos neurológicos presentes em pacientes com homocistinúria podem ser parcialmente

explicados pelo aumento do estresse oxidativo. Além disso, evidências sugerem que os radicais livres também estão envolvidos com outras alterações características de pacientes homocistinúricos, tais como complicações vasculares e oculares (MALINOW, 1990; CAVALCA et al., 2001; MUDD et al., 2001).

Considerando que a homocisteína é um fator de risco para o aparecimento de algumas doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Alzheimer e Parkinson (MATTSON et al., 2002), e que os pacientes homocistinúricos freqüentemente apresentam um grau variado de retardo mental e de deficiências cognitivas, também investigamos, no presente trabalho, o efeito da hiperhomocisteinemia quimicamente induzida sobre o desempenho de ratos na tarefa do labirinto aquático de Morris, uma tarefa experimental utilizada para a avaliação da aprendizagem e memória espacial (D'HOOGHE e DE DEYN, 2001).

Os animais foram tratados cronicamente com homocisteína, do 6<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia de vida. Quando completaram 60 dias de idade, foram submetidos às tarefas experimentais. A tarefa experimental do labirinto aquático de Morris foi realizada em um tanque circular, com 200 cm de diâmetro e 100 cm de altura, preenchido com água até 50 cm de profundidade. Para fins de avaliação do desempenho na tarefa experimental, o tanque foi dividido em quatro quadrantes imaginários. Os animais participaram de seis sessões de treino e uma sessão de teste. Durante a fase de treino, os animais participaram de sessões diárias, com o objetivo de encontrar uma plataforma submersa 2 cm abaixo da superfície da água, em quatro largadas. A sessão de teste foi realizada um dia depois da última sessão de treino. Para a sessão de teste, a plataforma foi removida, e os animais permaneceram no tanque por 60 segundos. Durante o teste, quatro parâmetros foram avaliados: o tempo para passar pelo lugar exato onde estava a plataforma, o número de

vezes que passou por onde estava a plataforma, o tempo gasto no quadrante alvo e o tempo gasto no quadrante oposto ao alvo (WARREN e JURASKA, 2000).

Nossos resultados mostraram que os animais submetidos ao modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia não apresentaram diferenças no tempo necessário para encontrar a plataforma submersa somente nas sessões de treino, ou seja, durante a fase de aquisição de memória, quando comparados com os animais controle. No entanto, os animais tratados cronicamente com homocisteína apresentaram maior dificuldade para aprender a tarefa. Também foi demonstrado que os animais tratados com homocisteína diferiram dos animais controles (tratados com salina) em um parâmetro verificado na sessão de teste, o número de vezes que passou por onde estava a plataforma. Esses dados sugerem que o tratamento crônico com homocisteína altera a memória espacial de referência, avaliada nessa tarefa comportamental.

Após a realização da tarefa de memória espacial de referência, os animais permaneceram em repouso por uma semana. Os animais foram então submetidos à tarefa experimental para a avaliação da memória de trabalho, com o labirinto aquático de Morris. Os animais foram avaliados por quatro dias, e o tempo necessário para encontrar a plataforma submersa foi medido, em quatro largadas. Para a avaliação da memória espacial, o lugar da plataforma mudou todos os dias. Verificou-se que os animais tratados com homocisteína apresentaram diferenças significativas no tempo necessário para encontrar a plataforma, na terceira e na quarta largada, quando comparado com os controles. Nossos resultados também mostraram que os animais tratados com homocisteína apresentaram maior dificuldade para aprender a tarefa da memória de trabalho.

O efeito do tratamento crônico de homocisteína sobre a tarefa do campo aberto (NETTO et al., 1986) também foi realizado. Verificamos que os animais tratados com homocisteína não apresentaram diferença significativa nessa tarefa experimental, quando comparados com os animais controles (tratados com salina). Esse resultado é importante, pois mostra que os animais tratados com homocisteína não apresentaram deficiência motora, que poderia prejudicar o desempenho dos mesmos na tarefa do labirinto aquático de Morris.

Nossos resultados mostram que o tratamento crônico com homocisteína provocou alterações comportamentais significativas, tanto na memória espacial de referência quanto na memória de trabalho. De forma semelhante, Reis e colaboradores (2002), demonstraram que a administração aguda de homocisteína também prejudicou a memória/aprendizagem (esquiva inibitória) em ratos.

Os achados do presente trabalho sugerem que a inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, a diminuição do metabolismo energético e o aumento do estresse oxidativo provocados pela homocisteína podem estar relacionados com a disfunção neurológica característica dos pacientes homocistinúricos.

## **V. CONCLUSÕES**

- 1) Foi desenvolvido um modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia em ratos, cujas concentrações plasmáticas de homocisteína foram semelhantes às encontradas em pacientes homocistinúricos (0,4 a 0,5 mM). Os níveis cerebrais de homocisteína também aumentaram com esse tratamento.
- 2) A administração crônica de homocisteína inibiu significativamente a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos. A atividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase não foi alterada pelo mesmo tratamento.
- 3) A administração crônica de homocisteína diminuiu significativamente a produção de  $\text{CO}_2$ , captação de glicose e as atividades das enzimas succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase em hipocampo de ratos. A produção de lactato não foi alterada pelo mesmo tratamento.
- 4) A administração crônica de homocisteína prejudicou significativamente a memória espacial de referência e de trabalho em ratos, avaliada no labirinto aquático de Morris.
- 5) A homocisteína e a metionina *in vitro* não alteraram a atividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, mas inibiram significativamente a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos, provavelmente atuando no mesmo sítio de ligação da enzima.
- 6) A pré-incubação de homogeneizados de hipocampo de ratos com a homocisteína, mas não com a metionina, inibiu a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica. A inibição da atividade da enzima foi prevenida por antioxidantes (enzima superóxido dismutase, glutatona reduzida, cisteína e ditioneitol) e pelo gangliosídeo  $\text{GM}_1$ , mas não pelo trolox.

- 7) A homocisteína e a metionina *in vitro* diminuíram significativamente a produção de CO<sub>2</sub> e a captação de glicose, e aumentou a produção de lactato em hipocampo de ratos.
- 8) A homocisteína, mas não a metionina, *in vitro* inibiu a atividade da enzima citocromo *c* oxidase.
- 9) A homocisteína *in vitro* diminuiu o potencial antioxidante total (TRAP) e aumentou as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase não foram alteradas por esse aminoácido.

O tratamento crônico com homocisteína causou inibição na atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e diminuição do metabolismo energético em hipocampo de ratos. Os animais tratados cronicamente com homocisteína também apresentaram diminuição de memória. A homocisteína e a metionina “*in vitro*” inibiram a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, diminuíram o metabolismo energético e aumentaram o estresse oxidativo em hipocampo de ratos.

## **VI. PERSPECTIVAS**

Esse trabalho abre inúmeras oportunidades de novos estudos sobre a fisiopatologia da homocistinúria com o modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia. Os principais estudos a serem seguidos são:

- 1) Investigar o efeito dos tratamentos agudo e crônico com homocisteína sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em outras estruturas do cérebro e no sangue de ratos.
- 2) Investigar o efeito “in vitro” da homocisteína e da metionina sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em outras estruturas do cérebro.
- 3) Investigar o efeito dos tratamentos agudo e crônico com homocisteína sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro e sangue de ratos.
- 4) Investigar o efeito dos tratamentos agudo e crônico com homocisteína sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro e sangue de ratos.
- 5) Investigar o efeito “in vitro” da homocisteína e da metionina sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro e sangue de ratos.
- 6) Investigar o efeito da homocisteína sobre outros testes comportamentais.
- 7) Investigar as atividades da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e acetilcolinesterase e parâmetros de estresse oxidativo em sangue de pacientes homocistinúricos.

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABRAHAMSSON, T.; BRANDT, U.; MARKLUND, S.L.; SJOQVIST, P.O. (1992): Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. **Circ. Res.** 70: 264-271.
- ACOSTA, P.B.; ELSAS, L.J. (1992): Nutrition support of vitamin B6-responsive homocystinuria. **Metab. Currents** 15: 13.
- ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, A.S.; NICOTERA, P. (1995): Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron** 15: 961-973.
- AUSTIN, R.C.; SOOD, S.K.; DORWARD, A.M.; SINGH, G.; SHAUGHNESSY, S.G.; PAMIDI, S.; OUTINEN, P.A.; WEITZ, J.I. (1998): Homocysteine-dependent alterations in mitochondrial gene expression, function and structure. Homocysteine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> act synergistically to enhance mitochondrial damage. **J. Biol. Chem.** 273: 30808-30817.
- AVROVA, N.F.; SHESTAK, K.I.; ZAKHAROVA, I.O.; SOKOLOVA, T.V.; LEONTEV, V.G. (1999): The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. **Neurochem. Res.** 24: 1101-1106.
- BAO, L.; VLCEK, C.; PACES, V.; KRAUS, J.P. (1998): Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase mRNA isoforms. **Arch. Biochem. Biophys.** 350: 95-103.
- BEAL, M.F. (1992): Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses? **Ann. Neurol.** 31: 119-130.

- BERTORELLO, A.M.; KATS, A.L. (1995): Regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pump activity: pathways between receptors and effectors. **NIPS** 10: 253-259.
- BLANCO, G.; MERCER, R.W. (1998): Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity and function. **Am. J. Physiol.** 275: F633-F650.
- BLANCO, G.; SÁNCHEZ, G.; MELTON, R.J.; TOURTELLOTTE, W.G.; MERCER, R.W. (2000): The  $\alpha$ 4 isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. **J. Histochem. Cytochem.** 48: 1023-1032.
- BLASS, J.P. (2001): Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? **J. Neurosci. Res.** 66: 851-856.
- BOLDYREV, A.A.; BULYGINA, E.R.; VOLYNSKAIA, E.A.; KURELLA, E.G.; TIULINA, O.V. (1995): The effect of hydrogen peroxide and hypochlorite on brain Na,K-ATPase activity. **Biokhimiia** 60: 1688-1696.
- BONDY, S.C.; LE BEL, C.P. (1993): The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Rad. Biol. Med.** 14: 633-642.
- BOUTELL, J.M.; WOOD, J.D.; HARPER, P.S.; JONES, A.L. (1998): Huntingtin interacts with cystathionine beta-synthase. **Hum. Mol. Genet.** 7: 371-378.
- BRATTSTROM, L.; LINDGREN, A.; ISRAELSSON, B.; ANDERSSON, A.; HULTBERG, B. (1994): Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. **J. Intern. Med.** 236: 633-641.
- BRENNAN, W.A.; BIRD, E.D.; APRILLE, J.R. (1985): Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. **J. Neurochem.** 44: 1948-1950.

- BRUSQUE, A.M.; MELLO, C.F.; BUCHANAN, D.N.; TERRACCIANO, S.T.; ROCHA, M.P.; VARGAS, C.R.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M. (1999): Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 64: 529-534.
- BURTON, B.K. (1987): Inborn errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. **Pediatrics** 79: 359.
- CADENAS, E.; DAVIES, K.J. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad. Biol. Med.** 29: 222-230.
- CARFAGNA, M.A.; MUHOBERAC, B.B. (1993): Interaction of tricyclic drugs analogs with synaptic plasma membranes: structure-mechanism relationships in inhibition of neuronal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. **Mol. Pharmacol.** 44: 129-141.
- CAPALDI, R.A. (1995): Structure and function of cytochrome C oxidase. **Annu. Rev. Biochem.** 59: 418-427.
- CARSON, N.A.; NEILL, D.W. (1962): Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. **Arch. Dis. Child.** 37: 505-513.
- CAVALCA, V.; CIGHETTI, G.; BAMONTI, F.; LOALDI, A.; BORTONE, L.; NOVEMBRINO, C.; DE FRANCESCHI, M.; BELARDINELLI, R.; GUAZZI, M.D. (2001): Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. **Clin. Chem.** 47: 887-892.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** 59: 527-605.
- CHEN, Y.F.; LI, P.L.; ZOU, A.P. (2002): Effect of hyperhomocysteinemia on plasma or tissue adenosine levels and renal function. **Circulation** 106: 1275-1281.

- CHEVILLARD, C.; CÁRDENAS, M.L.; CORNISH-BOWDEN, A. (1993): The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site. **Biochem. J.** 289: 599-604.
- CLARK, J.B.; BATES, T.E.; CULLINGFORD, T.; LAND, J.M. (1993): Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Dev. Neurosci.** 15: 174-180.
- CLARKE, R.; SMITH, A.D.; JOBST, K.A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P.M. (1998): Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. **Arch. Neurol.** 55: 1449-1455.
- CRUYSSBERG, J.R.; BOERS, G.H.; TRIJBELS, J.M.; DEUTMAN, A.F. (1996): Delay in diagnosis of homocystinuria: retrospective study of consecutive patients. **BMJ** 313: 1037-1040.
- CURTIUS, H.C.; MARTENET, A.C.; ANDERS, P.W. (1968): Determination of free amino acids in aqueous humor of homocystinuria patients and in control subjects. **Clin. Chim. Acta** 19: 469-476.
- D'HOOGE, R.; DE DEYN, P.P. (2001): Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Res. Brain Res. Rev.** 36: 60-90.
- DE FRANCHIS, R.; SPERANDEO, M.G.; SEBASTIO, G.; ANDRIA, G. (1998): Clinical aspects of cystathionine  $\beta$ -synthase: how wide is the spectrum? **Eur. J. Pediatr.** 157: S67-S70.
- DE GROOT, P.G.; WILLEMS, C.; BOERS, G.H.; GONSALVES, M.D.; VAN AKEN, W.G.; VAN MOURIK, J.A. (1983): Endothelial cell dysfunction in homocystinuria. **Eur. J. Clin. Invest.** 13: 405-410.

- DELWING, D.; TAGLIARI, B.; STRECK, E.L.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. (2003a): Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. **Brain Res.** In press.
- DELWING, D.; BAVARESCO, C.S.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.S. (2003b): Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats. **Int. J. Dev. Neurosci.** 21: 105-110.
- DI DONATO, S. (2000): Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **J. Inherit. Metab. Dis.** 23: 247-263.
- DIMITROVA, K.R.; DE GROOT, K.; MYERS, A.K.; KIM, Y.D. (2002): Estrogen and homocysteine. **Cardiovasc. Res.** 53: 577-588.
- DOBROTA, D.; MATEJOVICOVA, M.; KURELLA, E.G.; BOLDYREV, A.A. (1999): Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. **Cell. Mol. Neurobiol.** 19: 141-149.
- DUAN, W.; LADENHEIM, B.; CUTLER, R.G.; KRUMAN, I.I.; CADET, J.L.; MATTSON, M.P. (2002): Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. **J. Neurochem.** 80: 101-110.
- DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WANNMACHER, L.E.; PIRES, R.F.; ROSA-JUNIOR, A. (1991): Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 24: 595-605.
- ENESCO, M.; LEBLOND, C.P. (1962): Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 10: 530-562.

- ERECINSKA, M.; DAGANI, F. (1990): Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. **J. Gen. Physiol.** 95: 591-616.
- ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. (1994): Silver, ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** 16: 37-71.
- FAMBROUGH, D.M.; LEMAS, M.V.; HAMRICK, M.; EMERICK, M.; RENAUD, K.J.; INMAN, E.M.; HWANG, B.; TAKEYASU, K. (1994): Analysis of subunit assembly of the Na-K-ATPase. **Am. J. Physiol.** 266: C579-C589.
- FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G.W. (2002): Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition** 18: 872-879.
- FINKELSTEIN, J.D. (1998): The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **Eur. J. Pediatr.** 157: S40-S44.
- FLOTT-RAHMEL, B.; SCHURMANN, M.; SCHLUFF, P.; FINGERHUT, R.; MUSSHOFF, U.; FOWLER, B.; ULLRICH, K. (1998): Homocysteic and homocysteine sulphinic acid exhibit excitotoxicity in organotypic cultures from rat brain. **Eur. J. Pediatr.** 157: S112-S117.
- FOWLER, B. (1997): Disorders of homocysteine metabolism. **J. Inherit. Metab. Dis.** 20: 270-285.
- FRIDOVICH, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** 64: 97-112.
- FRYER, R.H.; WILSON, B.D.; GUBLER, D.B.; FITZGERALD, L.A.; RODGERS, G.M. (1993): Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. **Arterioscler. Thromb.** 13: 1327-1333.

- GEERING, K. (1990): Subunit Assembly and Functional Maturation of Na,K-ATPase. **J. Membr. Biol.** 115: 109-121.
- GEY, K.F. (1990): The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms. **Biochem. Soc. Trans.** 18: 1041-1045.
- GEY, K.F.; BRUBACHER, G.B.; STAHELIN, H.B. (1987): Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. **Am. J. Clin. Nutr.** 45: 1368-1377.
- GIUGLIANI, R. (1988): Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna** 23: 29-40.
- GLOOR, S.; ANTONICEK, H.; SWEADNER, K.J.; PAGLIUSI, S.; FRANK, R.; MOOS, M.; SCHACHNER, M. (1990): The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. **J. Cell. Biol.** 110: 165-174.
- GLYNN, I.M. (1993): All hands on the sodium pump. **J. Physiol.** 462: 1-30.
- GOLDSTEIN, J.L.; CAMPBELL, B.K.; GARTLER, S.M. (1972): Cystathionine synthase activity in human lymphocytes: induction by phytohemagglutinin. **J. Clin. Invest.** 51: 1034-1037.
- GRISAR, T. (1984): Glial and neuronal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in epilepsy. **Ann. Neurol.** 16: S128-S134.
- GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A.V. (1992): Contribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res.** 12: 141-149.
- GUPTA, R.C.; MILATOVIC, D.; DETTBARN, W.D. (2002): Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. **Neurotoxicology** 22: 271-282.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.** 219: 1-14.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. (1999): **Free radicals in biology and medicine.** 3<sup>rd</sup> ed., New York, Oxford University Press Inc.
- HANSEN, O.; CLAUSEN, T. (1988): Quantitative determination of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and other sarcolemmal components in muscle cells. **Am. J. Physiol.** 254: C1-C7.
- HARKER, L.A.; SLICHTER, S.J.; SCOTT, C.R.; ROSS, R. (1974): Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. **N. Engl. J. Med.** 291: 537-543.
- HARKER, L.A.; HARLAN, J.M.; ROSS, R. (1983): Effect of sulfinpyrazone on homocysteine-induced endothelial injury and arteriosclerosis in baboons. **Circ. Res.** 53: 731-739.
- HATTORI, N.; KITAGAWA, K.; HIGASHIDA, T.; YAGYU, K.; SHIMOHAMA, S.; WATAYA, T.; PERRY, G.; SMITH, M.A.; INAGAKI, C. (1998): Cl<sup>-</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. **Neurosci. Lett.** 254: 141-144.
- HEALES, S.J.; BOLAÑOS, J.P.; STEWART, V.C.; BROOKES, P.S.; LAND, J.M.; CLARK, J.B. (1999): Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochim. Biophys. Acta** 1410: 215-228.
- HENNEBERRY, R.C.; NOVELLI, A.; COX, J.A.; LYSKO, P.G. (1989): Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons: a hypothesis for cell death in aging and disease. **Ann. NY Acad. Sci.** 568: 225-233.
- HERTZ, L.; PENG, L. (1992): Energy metabolism at the cellular level of the CNS. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 70: 145-157.

- HITSCHKE, K.; BUHLER, R.; APELL, H.J.; STARK, G. (1994): Inactivation of the Na,K-ATPase by radiation-induced free radicals. Evidence for a radical-chain mechanism. **FEBS Lett.** 353: 297-300.
- HLADOVEC, J. (1979): Experimental homocystinemia, endothelial lesions and thrombosis. **Blood Vessels** 16: 202-205.
- HO, P.I.; COLLINS, S.C.; DHITAVAT, S.; ORTIZ, D.; ASHLINE, D.; ROGERS, E.; SHEA, T.B. (2001): Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. **J. Neurochem.** 78: 249-253.
- HO, Y.S.; GARGANO, M.; CAO, J.; BRONSON, R.T.; HEIMLER, I.; HUTZ, R.J. (1998): Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.** 273: 7765-7769.
- HOGG, N. (1999): The effect of cyst(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine. **Free Rad. Biol. Med.** 27: 28-33.
- HULTBERG, B.; ANDERSSON, A.; ISAKSSON, A. (1995): Metabolism of homocysteine, its relation to the other cellular thiols and its mechanism of cell damage in a cell culture line (human histiocytic cell line U-937). **Biochim. Biophys. Acta** 1269: 6-12.
- ISHERWOOD, D.M. (1996): Homocystinuria. **BMJ** 313: 1025-1026.
- IZQUIERDO, I. (1989): Different forms of post-training memory processing. **Behav. Neural Biol.** 51: 171-202.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. (1997): Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol. Learn. Mem.** 68: 285-316.
- IZQUIERDO, I. (2002): **Memória.** Porto Alegre, Artmed.

- JACOBSON, I.R.; HAGBEG, H.; SANDBERG, M.; HAMBERGER, A. (1986): Ouabain-induced changes in extracellular aspartate, glutamate and GABA levels in the rabbit olfactory bulb in vivo. **Neurosci. Lett.** 64: 211-215.
- JACQUES, P.F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A.G.; WILSON, P.W.; ROSENBERG, I.H. (1999): The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **N. Engl. J. Med.** 340: 1449-1454.
- KAPLAN, J.H. (2002): Biochemistry of Na,K-ATPase. **Ann. Rev. Biochem.** 71: 511-535.
- KIENZLE-HAGEN, M.E.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; BRIDI, R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S.; DUTRA-FILHO, C.S. (2002): Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. **Biochim. Biophys. Acta** 1586: 344-352.
- KIM, W.K.; PAE, Y.S. (1996): Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. **Neurosci. Lett.** 216, 117-120.
- KLUIJTMANS, L.A.; BOERS, G.H.; KRAUS, J.P.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; CRUYSSBERG, J.R.; TRIJBELS, F.J.; BLOM, H.J. (1999): The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Dutch patients with homocystinuria: effect of CBS genotype on biochemical and clinical phenotype and on response to treatment. **Am. J. Hum. Genet.** 65: 59-67.
- KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. (1999): Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.** 26: 463-471.
- KRAUS, J.P.; OLIVERIUSOVA, J.; SOKOLOVA, J.; KRAUS, E.; VLCEK, C.; DE FRANCHIS, R.; MACLEAN, K.N.; BAO, L.; BUKOVSKA, G.; PATTERSON,

- D.; PACES, V.; ANSORGE, W.; KOZICH, V. (1998): The human cystathionine beta-synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms. **Genomics** 52: 312-324.
- KRAUS, J.P.; JANOSIK, M.; KOZICH, V.; MANDELL, R.; SHIH, V.; SPERANDEO, M.P.; SEBASTIO, G.; DE FRANCHIS, R.; ANDRIA, G.; KLUIJTMANS, L.A.; BLOM, H.; BOERS, G.H.; GORDON, R.B.; KAMOUN, P.; TSAI, M.Y.; KRUGER, W.D.; KOCH, H.G.; OHURA, T.; GAUSTADNES, M. (1999): Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. **Hum. Mutat.** 13: 362-375.
- KRUMAN, I.I.; CULMSEE, C.; CHAN, S.L.; KRUMAN, Y.; GUO, Z.; PENIX, L.; MATTSON, M.P. (2000): Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. **J. Neurosci.** 20: 6920-6926.
- KUBOVÁ, H.; FOLBERGROVÁ, J.; MARES, P. (1995): Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. **Epilepsia** 36: 750-756.
- KUHN, W.; ROEBROEK, R.; BLOM, H.; VAN OPPENRAAIJ, D.; PRZUNTEK, H.; KRETSCHMER, A.; BUTTNER, T.; WOITALLA, D.; MULLER, T. (1998): Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. **Eur. Neurol.** 40: 225-227.
- KUKREJA, R.C.; WEAVER, A.B.; HESS, M.L. (1990): Sarcolemmal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase: inactivation by neutrophil-derived free radicals and oxidants. **Am. J. Physiol.** 259: H1330-H1336.
- KURELLA, E.G.; TYULINA, O.V.; BOLDYREV, A.A. (1999): Oxidative resistance of Na/K-ATPase. **Cell. Mol. Neurobiol.** 19: 133-140.

- LALONDE, R. (1994): Cerebellar contributions to instrumental learning. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 18: 161-170.
- LEBOVITZ, R.M.; ZHANG, H.; VOGEL, H.; CARTWRIGHT, J. JR.; DIONNE, L.; LU, N.; HUANG, S.; MATZUK, M.M. (1996): Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 9782-9787.
- LECUONA, E.; LUQUIN, S.; AVILA, J.; GARCIA-SEGURA, L.M.; MARTIN-VASALLO, P. (1996): Expression of the beta 1 and beta 2(AMOG) subunits of the Na,K-ATPase in neural tissues: cellular and developmental distribution patterns. **Brain Res. Brain Res. Bull.** 40: 167-174.
- LEES, G.J.; LEHMANN, A.; SANDBERG, M.; HAMBERGER, A. (1990): The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neurosci. Lett.** 120: 159-162.
- LEES, G.J. (1991): Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res. Brain Res. Rev.** 16: 283-300.
- LEES, G.J. (1993): Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54: 287-322.
- LENTZ, S.R.; SADLER, J.E. (1991): Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. **J. Clin. Invest.** 88: 1906-1914.
- LEVITT, A.J.; KARLINSKY, H. (1992): Folate, vitamin B12 and cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. **Acta Psychiatr. Scand.** 86: 301-305.

- LIGURI, G.; TADDEI, N.; NASSI, P.; LATORRACA, S.; NEDIANI, C.; SORBI, S. (1990): Changes in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** 112: 338-342.
- LINGREL, J.B.; KUNTZWEILER, T. (1994): Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **J. Biol. Chem.** 269: 19659-19662.
- LIPTON, S.A.; KIM, W.K.; CHOI, Y.B.; KUMAR, S.; D'EMILIA, D.M.; RAYUDU, P.V.; ARNELLE, D.R.; STAMLER, J.S. (1997): Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 5923-5928.
- LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. (1994): Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N. Engl. J. Med.** 330: 613-622.
- LUBEC, B.; FANG-KIRCHER, S.; LUBEC, T.; BLOM, H.J.; BOERS, G.H. (1996): Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. **Biochim. Biophys. Acta** 1315: 159-162.
- LUDOLPH, A.C.; RIEPE, M.; ULLRICH, K. (1993): Excitotoxicity, energy metabolism and neurodegeneration. **J. Inherit. Metab. Dis.** 16: 716-723.
- MALINOW, M.R. (1990): Hyperhomocyst(e)inemia. A common and easily reversible risk factor for occlusive atherosclerosis. **Circulation** 81: 2004-2006.
- MARKLUND, S.L.; WESTMAN, N.G.; LUNDGREN, E.; ROOS, G. (1982): Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. **Cancer Res.** 42: 1955-1961.

- MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. (1996): **Basic Medical Biochemistry**. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.
- MATEJOVICOVA, M.; MACHAC, S.; LEHOTSKY, J.; JAKUS, J.; MEZESOVA, V. (1996): Synaptosomal Na, K-ATPase during forebrain ischemia in Mongolian gerbils. **Mol. Chem. Neuropathol.** 29: 67-78.
- MATTSON, M.P.; KRUMAN, I.I.; DUAN, W. (2002): Folic acid and homocysteine in age-related disease. **Ageing Res. Rev.** 1: 95-111.
- MELOV, S.; SCHNEIDER, J.A.; DAY, B.J.; HINERFELD, D.; COSKUN, P.; MIRRA, S.S.; CRAPO, J.D.; WALLACE, D.C. (1998): A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Nature Genet.** 18: 159-163.
- McCULLY, K.S. (1993): Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. **Ann. Clin. Lab. Sci.** 23: 477-493.
- McCULLY, K.S. (1994): Chemical pathology of homocysteine. III. Cellular function and aging. **Ann. Clin. Lab. Sci.** 24: 134-152.
- McCULLY, K.S. (1996): Homocysteine and vascular disease. **Nature Med.** 2: 386-389.
- McILWAIN, H.; POLL, J.D. (1985): Interaction between adenosine generated endogenously in neocortical tissues, and homocysteine and its thiolactone. **Neurochem. Int.** 7: 103-110.
- MILATOVIC, D.; ZIVIN, M.; GUPTA, R.C.; DETTBARN, W.D. (2001): Alterations in cytochrome c oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus. **Brain Res.** 31: 67-78.

- MOREIRA, J.C.F.; WANNMACHER, C.M.D.; COSTA, S.M.; WAJNER, M. (1989): Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 32: 885-890.
- MORRIS, R.G. (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J. Neurosci. Methods** 11: 47-60.
- MORRIS, R.G.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N.; O'KEEFE, J. (1982): Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature** 297: 681-683.
- MUDD, S.H.; FINKELSTEIN, J.D.; IRREVERRE, F.; LASTER, L. (1964): Homocystinuria: an enzymatic defect. **Science** 143: 1443-1445.
- MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; SKOVBY, F. (1989): Disorders of transsulfuration. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLED, D. eds. **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. 6<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill, 693-734.
- MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; SKOVBY, F. (2001): Disorders of Transulfuration. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLED, D. eds. **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. 8<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill, 1279-1327.
- MUDD, S.H.; SKOVBY, F.; LEVY, H.L.; PETTIGREW, K.D.; WILCKEN, B.; PYERITZ, R.E.; ANDRIA, G.; BOERS, G.H.; BROMBERG, I.L.; CERONE, R.; FOWLER, B.; GRÖBE, H.; SCHMIDT, H.; SCHWEITZER, L. (1985): The natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. **Am. J. Hum. Gen.** 37: 1-31.

- MÜLLER, T.; WERNE, B.; FOWLER, B.; KUHN, W. (1999): Nigral endothelial dysfunction, homocysteine, and Parkinson's disease. **Lancet** 354: 126-127.
- MÜNKE, M.; KRAUS, J.P.; OHURA, T.; FRANCKE, U. (1988): The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. **Am. J. Hum. Genet.** 42: 550-559.
- NARUSZEWICZ, M.; MIRKIEWICZ, E.; OLSZEWSKI, A.J.; (1994): Thiolation of low-density lipoprotein by homocysteine thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** 4: 70-77.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. (2000): **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Worth Publishers.
- NETTO, C.A.; DIAS, R.D.; IZQUIERDO, I. (1986): Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. **Psychoneuroendocrinology** 11: 437-446.
- NISHINAGA, M.; OZAWA, T.; SHIMADA, K. (1993): Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. **J. Clin. Invest.** 92: 1381-1386.
- NOVELLI, A.; REILLY, J.A.; LYSKO, P.G.; HENNEBERRY, R.C. (1998): Glutamate becomes neurotoxic via the NMDA receptor when intracellular energy levels are reduced. **Brain Res.** 451: 205-212.

- PARIS, F. (2001): Efeitos da gabapentina sobre a memória e ansiedade em ratos e humanos. Dissertação de mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PARSONS, R.B.; WARING, R.H.; RAMSDEN, D.B.; WILLIAMS, A.C. (1998): In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. **Neurotoxicology** 19: 599-603.
- PONTES, Z.L.; OLIVEIRA, L.S.; BAVARESCO, C.S.; STRECK, E.L.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S. (1999): Proline administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. **Metab. Brain Dis.** 14: 265-272.
- PONTES, Z.L.; OLIVEIRA, L.S.; FRANZON, R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S. (2001): Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity from rat hippocampus by proline. **Neurochem. Res.** 26: 1321-1326.
- PRYOR, W.A. (1988): A Festschrift volume celebrating the 20<sup>th</sup> anniversary of the discovery of superoxide dismutase. **Free Rad. Biol. Med.** 5: 271-273.
- RATNOFF, O.D. (1968): Activation of Hageman factor by L-homocystine. **Science** 162: 1007-1009.
- REAUME, A.G.; ELLIOTT, J.L.; HOFFMAN, E.K.; KOWALL, N.W.; FERRANTE, R.J.; SIWEK, D.F.; WILCOX, H.M.; FLOOD, D.G.; BEAL, M.F.; BROWN, R.H. JR.; SCOTT, R.W.; SNIDER, W.D. (1996): Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. **Nature Genet.** 13: 43-47.

- RECH, V.C.; FEKSA, L.R.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. (2002): Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. **Neurochem. Res.** 27: 353-357.
- REIS, E.A.; ZUGNO, A.I.; FRANZON, R.; TAGLIARI, B.; MATTE, C.; LAMMERS, M.L.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T.S. (2002): Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. **Metab. Brain Dis.** 17: 211-217.
- RENKAWEK, K.; RENIER, W.O.; DE PONT, J.J.; VOGELS, O.J.; GABREELS, F.J. (1992): Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy, and low activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase in the brain. **Epilepsia** 33: 58-64.
- RODGERS, G.M.; CONN, M.T. (1990): Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. **Blood** 75: 895-901.
- RODGERS, G.M.; KANE, W.H. (1986): Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. **J. Clin. Invest.** 77: 1909-1916.
- ROWLEY, D.A.; HALLIWELL, B. (1982): Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of thiol compounds. **FEBS Lett.** 138: 33-36.
- SANTOS, A.M. (1999): Aprendizagem e Memória no Labirinto Aquático de Morris. In: XAVIER, G.F. ed. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo, Plêiade, 131-154.
- SCHINDER, A.F.; OLSON, E.C.; SPITZER, N.C.; MONTAL, M. (1996): Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. **J. Neurosci.** 16: 6125-6133.

- SCHNEEDE, J.; REFSUM, H.; UELAND, P.M. (2000): Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. **Semin. Thromb. Hemos.** 26: 263-279.
- SCHURR, A. (2002): Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. **Neurochem. Int.** 41: 1-8.
- SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. eds. (2001): **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.** 8<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- SESHADRI, S.; BEISER, A.; SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; D'AGOSTINO, R.B.; WILSON, P.W.; WOLF, P.A. (2002): Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.** 346: 476-483.
- SILVA, C.G.; PAROLO, E.; STRECK, E.L.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S. (1999): In vitro inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. **Brain Res.** 838: 78-84.
- SKOU, J.C. (1957): The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim. Biophys. Acta** 23: 394-401.
- SKOU, J.C.; ESMANN, M. (1992): The Na,K-ATPase. **J. Bioenerg. Biomembr.** 24: 249-261.
- SMOLIN, L.A.; BENEVENGA, N.J.; BERLOW, S. (1981): The use of betaine for the treatment of homocystinuria. **J. Pediatr.** 99: 467-472.
- SNOWDON, D.A.; TULLY, C.L.; SMITH, C.D.; RILEY, K.P.; MARKESBERY, W.R. (2000): Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun study. **Am. J. Clin. Nutr.** 71: 993-998.

- SOKOL, R.J. (1989): Vitamin E and neurologic function in man. **Free Rad. Biol. Med.** 6: 189-207.
- SOKOLOVA, J.; JANOSIKOVA, B.; TERWILLIGER, J.D.; FREIBERGER, T.; KRAUS, J.P.; KOZICH, V. (2001): Cystathionine beta-synthase deficiency in Central Europe: discrepancy between biochemical and molecular genetic screening for homocystinuric alleles. **Hum. Mutat.** 18: 548-549.
- STAMLER, J.S.; SIMON, D.I.; OSBORNE, J.A.; MULLINS, M.E.; JARAKI, O.; MICHEL, T.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. (1992): S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 444-448.
- STAMLER, J.S.; OSBORNE, J.A.; JARAKI, O.; RABBANI, L.E.; MULLINS, M.; SINGEL, D.; LOSCALZO, J. (1993): Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. **J. Clin. Invest.** 91: 308-318.
- STARKEBAUM, G.; HARLAN, J.M. (1986): Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. **J. Clin. Invest.** 77: 1370-1376.
- STRYER, L. (1996): **Bioquímica**. 4ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- TADA, K.; YOSHIDA, T.; HIRONO, H.; ARAKAWA, T. (1967): Homocystinuria: amino acid pattern of the liver. **Tohoku J. Exp. Med.** 92: 325-332.
- THERIEN, A.G.; GOLDSHLEGER, R.; KARLISH, S.J.; BLOSTEIN, R. (1997): Tissue-specific distribution and modulatory role of the  $\gamma$  subunit of the Na,K-ATPase. **J. Biol. Chem.** 272: 32628-32634.

- TSAI, J.C.; PERRELLA, M.A.; YOSHIKUMI, M.; HSIEH, C.M.; HABER, E.; SCHLEGEL, R.; LEE, M.E. (1994): Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 6369-6373.
- UHLENDORF, B.W.; MUDD, S.H. (1968): Cystathionine synthase in tissue culture derived from human skin: enzyme defect in homocystinuria. **Science** 160: 1007-1009.
- UPCHURCH, G.R. JR.; WELCH, G.N.; FABIAN, A.J.; FREEDMAN, J.E.; JOHNSON, J.L.; KEANEY, J.F. JR.; LOSCALZO, J. (1997): Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. **J. Biol. Chem.** 272: 17012-17017.
- VAN DER HIJDEN, H.T.; SCHUURMANS STEKHOVEN, F.M.; DE PONT, J.J. (1989): Sidedness of the effect of amines on steady-state phosphorylation level of reconstituted Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta** 987: 75-82.
- VOET, D.; VOET, J.G. (1995): **Biochemistry**. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons.
- WAJNER, M.; DUTRA, J.C.; CARDOSO, S.E.; WANNMACHER, C.M.D.; MOTTA, E.R. (1992): Effect of methylmalonate on “in vitro” lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **J. Inherit. Metab. Dis.** 15: 92-96.
- WALL, R.T.; HARLAN, J.M.; HARKER, L.A.; STRIKER, G.E. (1980): Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. **Thromb. Res.** 18: 113-121.
- WALLACE, D.C. (1999): Mitochondrial diseases in man and mice. **Science** 283: 1482-1487.

- WARD, R.J.; PETERS, T.J. (1995): Free Radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. eds. **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects**. New York, Churchill Livingstone, 765-777.
- WARREN, S.G.; JURASKA, J.M. (2000): Sex differences and estropausal phase effects on water maze performance in aged rats. **Neurobiol. Learn. Mem.** 74: 229-240.
- WELCH, G.N.; LOSCALZO, J. (1998): Homocysteine and atherothrombosis. **N. Eng. J. Med.** 338: 1042-1050.
- WELCH, G.N.; UPCHURCH, G.R. JR.; LOSCALZO, J. (1997): Hyperhomocyst(e)inemia and atherothrombosis. **Ann. NY Acad. Sci.** 811: 48-58.
- WHITE, A.R.; HUANG, X.; JOBLING, M.F.; BARROW, C.J.; BEYREUTHER, K.; MASTERS, C.L.; BUSH, A.I.; CAPPAL, R. (2001): Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. **J. Neurochem.** 76: 1509-1520.
- WILCKEN, D.E.; DUDMAN, N.P.; TYRRELL, P.A. (1985): Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency - the effects of betaine treatment in pyridoxine-responsive patients. **Metabolism** 34: 1115-1121.
- WILLIAMSON, J.R.; COOPER, R.H. (1980): Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. **FEBS Lett.** 117: K73-K85.
- WINICK, M.; NOBLE, A. (1965): Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in rat. **Dev. Biol.** 12: 451-466.
- WHISHAW, I.Q.; MITTLEMAN, G.; BUNCH, S.T.; DUNNETT, S.B. (1987): Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation

- strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. **Behav. Brain Res.** 24: 125-138.
- WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; BRUSQUE, A.M.; WANNMACHER, C.M.D. (1995): Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. **Biochem. Soc. Trans.** 23: 227S.
- WYSE, A.T.S.; BRUSQUE, A.M.; SILVA, C.G.; STRECK, E.L.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. (1998a): Inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport** 9: 1719-1721.
- WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. (1998b): Kinetics of alanine reversal on the inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. **Med. Sci. Res.** 26: 141-143.
- WYSE, A.T.S.; NORILER, M.E.; BORGES, L.F.; FLORIANO, P.J.; SILVA, C.G.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. (1999): Alanine prevents the decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in experimental phenylketonuria. **Metab. Brain Dis.** 14: 95-101.
- WYSE, A.T.S.; STRECK, E.L.; WORM, P.; WAJNER, A.; RITTER, F.; NETTO, C.A. (2000a): Preconditioning prevents the inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity after brain ischemia. **Neurochem. Res.** 25: 971-975.
- WYSE, A.T.S.; STRECK, E.L.; BARROS, S.V.; BRUSQUE, A.M.; ZUGNO, A.I.; WAJNER, M. (2000b): Methylmalonate administration decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in cerebral cortex of rats. **Neuroreport** 11: 2331-2334.

- WYSE, A.T.S.; BAVARESCO, C.S.; KIENZLE-HAGEN, M.E.; DELWING, D.; WANNMACHER, C.M.D.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. (2001a): In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. **Brain Res.** 923: 50-57.
- WYSE, A.T.S.; BAVARESCO, C.S.; BANDINELLI, C.; STRECK, E.L.; FRANZON, R.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. (2001b): Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. **Neurochem. Res.** 26: 515-520.
- YASUI, K.; KOWA, H.; NAKASO, K.; TAKESHIMA, T.; NAKASHIMA, K. (2000): Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. **Neurology** 55: 437-440.
- YOSHINO, Y. (1984): Possible involvement of folate cycle in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurochem. Res.** 9: 387-391.
- YUFU, K.; ITOH, T.; EDAMATSU, R.; MORI, A.; HIRAKAWA, M. (1993): Effect of hyperbaric oxygenation on the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and membrane fluidity of cerebrocortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. **Neurochem. Res.** 18: 1033-1039.