

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

**Efeito do ácido fólico sobre as alterações nas atividades da
Na⁺,K⁺-ATPase e da butirilcolinesterase e sobre alguns
parâmetros de estresse oxidativo causadas pela
homocisteína em ratos**

Cristiane Matté

Orientadora: Prof^a Dr^a Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre, 2006

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

**Efeito do ácido fólico sobre as alterações nas atividades da
Na⁺,K⁺-ATPase e da butirilcolinesterase e sobre alguns
parâmetros de estresse oxidativo causadas pela
homocisteína em ratos**

Cristiane Matté

Orientadora: Prof^a Dr^a Angela Terezinha de Souza Wyse

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

Porto Alegre, 2006

Ao meu noivo, Sandro,
pelo amor, pela compreensão e
torcida constante pelo meu crescimento profissional.

Agradecimentos

A Deus, pela proteção espiritual.

À minha orientadora, Angela, pela amizade, pelos ensinamentos e empenho em meu crescimento profissional.

Ao pessoal do laboratório, pelas amizades verdadeiras que fiz e vou conservar para sempre, pela convivência agradável e ajuda constante. Em especial às pessoas que colaboraram com esse trabalho: Eduardo, Francieli, Emilene e Franciele, obrigada pelo empenho.

Aos professores do grupo de Erros Inatos do Metabolismo: Clóvis, Dutra e Moacir, pelos ensinamentos e pela convivência.

Ao pessoal dos laboratório 34 C, 36 e 38, onde encontrei grandes amigos, que vou levar para sempre no meu coração.

À minha amiga e colega Ana Cristina Andreazza e à Prof^a Dr^a Mirian Salvador pela colaboração na realização do ensaio cometa.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelos três anos e meio de convivência e apoio.

Looking for the answer.
You hunt it,
you catch it,
you fool yourself;
the answer,
is always,
a step ahead.

Jens Christian Skou

Prêmio Nobel em química (1957) pela descoberta da Na^+, K^+ -ATPase

RESUMO

A homocistinúria é um erro inato do metabolismo caracterizado, bioquimicamente, pela deficiência da enzima cistationina- β -sintase, resultando no acúmulo tecidual de homocisteína. Os pacientes afetados apresentam sintomas neurológicos e vasculares característicos, como retardo mental e arteriosclerose, cuja fisiopatologia é desconhecida. No presente trabalho, avaliamos os efeitos *in vitro* e *in vivo* da homocisteína sobre alguns parâmetros bioquímicos. Primeiramente, observamos o efeito *in vitro* da exposição de homogeneizados de córtex parietal de ratos ao ácido fólico, avaliando a inibição causada pela homocisteína sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membranas plasmáticas. Nos estudos *in vivo*, investigamos o efeito do pré-tratamento com ácido fólico sobre a inibição das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e butirilcolinesterase em córtex parietal e em soro de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia aguda, respectivamente. Considerando que a Na^+, K^+ -ATPase é suscetível ao ataque de radicais livres, nós determinamos o efeito da hiperhomocisteinemia aguda sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, como a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e o conteúdo total de grupos tióis em córtex parietal de ratos. Finalmente, investigamos o efeito do ácido fólico sobre a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal e sobre o aumento do índice de dano ao DNA em sangue total de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia crônica. Nossos resultados mostraram que a homocisteína *in vitro* reduz, significativamente, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e que o ácido fólico previne esse efeito. Estudos cinéticos com o substrato ATP revelaram que a homocisteína inibe de forma não-competitiva a enzima Na^+, K^+ -ATPase. Os estudos *in vivo* confirmaram que a hiperhomocisteinemia aguda diminui as atividades das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e butirilcolinesterase e que o pré-tratamento com ácido fólico também previne os efeitos causados pela homocisteína. Por outro lado, a hiperhomocisteinemia aguda não alterou os parâmetros de estresse oxidativo analisados. A hiperhomocisteinemia crônica inibiu a Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal e aumentou o índice de dano ao DNA em sangue total de ratos e, novamente, o tratamento com ácido fólico previne tais efeitos. Esses resultados, em conjunto, revelam os efeitos da homocisteína sobre alguns parâmetros bioquímicos e colaboram com o entendimento da fisiopatologia da homocistinúria. Além disso, os resultados sugerem que o ácido fólico, já utilizado por alguns pacientes homocistinúricos, poderá ser uma importante ferramenta terapêutica utilizada na prevenção dos efeitos neurológicos e vasculares da homocisteína.

ABSTRACT

Homocystinuria is an inborn error of metabolism biochemically characterized by cystathionine- β -synthase deficiency and tissue accumulation of homocysteine, and clinically by mental retardation, seizures and vascular disturbs. In the present work we studied *in vitro* and *in vivo* effects of homocysteine on some biochemical parameters. In the *in vitro* studies, we first investigated the effect of exposing parietal cortex homogenates to folate on the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase from synaptic plasma membranes of rats caused by homocysteine. In the *in vivo* studies, we investigated the effect of folic acid pretreatment on Na^+, K^+ -ATPase and butyrylcholinesterase activities in parietal cortex and serum of rats subjected to acute hyperhomocysteinemia, respectively. Considering that Na^+, K^+ -ATPase is susceptible to free radical attack, we evaluated the effect of acute hyperhomocysteinemia on some parameters of oxidative stress, named thiobarbituric acid-reactive substances and total thiol content in parietal cortex of rats. We also investigated folic acid effect on Na^+, K^+ -ATPase inhibition in parietal cortex and DNA damage index in whole blood of rats subjected to chronic hyperhomocysteinemia. *In vitro* studies showed that homocysteine reduced Na^+, K^+ -ATPase activity in synaptic plasma membranes. Folic acid prevented homocysteine effect. Kinetic studies showed that homocysteine inhibited Na^+, K^+ -ATPase by a non-competitive manner with ATP. We also performed *in vivo* studies, our results showed that acute hyperhomocysteinemia reduced Na^+, K^+ -ATPase and butyrylcholinesterase activities. Folic acid pretreatment prevented such effect. However, acute hyperhomocysteinemia did not alter oxidative stress parameters studied. Chronic hyperhomocysteinemia reduced Na^+, K^+ -ATPase activity in parietal cortex and increased DNA damage index in whole blood of rats. The concomitant folic acid treatment prevented homocysteine effects. These results explain, at least in part, some mechanisms related to the dysfunctions observed in human homocystinuria. Moreover, folic acid, a vitamin used by some patients, can be an important therapeutic approach to prevent neurologic and vascular effects of homocysteine.

LISTA DE ABREVIATURAS

BHMT - betaína homocisteína metiltransferase
BuChE - butirilcolinesterase
CBS - cistationina β -sintase
CGL - cistationina γ -liase
DNA – ácido desoxirribonucléico
EIM - erros inatos do metabolismo
HCU - homocistinúria
Hcy – homocisteína
L-NAME - N ^{ω} -nitro-L-arginina metil éster
MAT - metionina adenosiltransferase
Met - metionina
5-MeTHF - 5-metiltetraidrofolato
MS - metionina sintase
MT - metiltransferase
5,10-MTHF - 5,10-metilenotetraidrofolato
MTHFR - metilenotetraidrofolato redutase
NMDA - N-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintase
Pi – fosfato inorgânico
PLP - piridoxal fosfato
SAH - S-adenosil homocisteína
SAHH - S-adenosil homocisteína hidrolase
SAM - S-adenosil metionina
SNC - sistema nervoso central
TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
THF – tetraidrofolato

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Via metabólica da homocisteína e bloqueio metabólico da enzima cistationina β -sintase característico da homocistinúria.	4
Figura 2. Metabolismo da homocisteína e bloqueio metabólico da enzima cistationina β -sintase característico da homocistinúria (Adaptado de Mudd et al., 2001).	6
Figura 3. Formas redox da homocisteína.	7
Figura 4. Ciclo catalítico da Na^+, K^+ -ATPase.	11
Figura 5. Classificação utilizada no ensaio cometa.	52
Figura 6. Efeito da administração crônica de ácido fólico sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex parietal de ratos hiperhomocisteinêmicos.	54
Figura 7. Efeito da administração crônica de ácido fólico sobre o índice de dano ao DNA em sangue total de ratos hiperhomocisteinêmicos.	55

SUMÁRIO

	Pág.
I. INTRODUÇÃO	1
1. Erros Inatos do Metabolismo	1
2. Homocistinúria	1
3. Homocisteína	5
3.1. Homocisteína e Neurotoxicidade	7
4. Ácido Fólico	9
5. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	10
6. Butirilcolinesterase	13
7. Estresse oxidativo	14
II. OBJETIVOS	16
Objetivo geral	16
Capítulo I	16
Capítulo II	17
Capítulo III	17
III. RESULTADOS	19
Capítulo I - Na⁺,K⁺-ATPase inhibition by homocysteine is prevented by folate and L-NAME in parietal cortex of rats	19
Capítulo II - Folic acid pretreatment prevents the reduction of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia	42
Capítulo III - Resultados não submetidos a artigos	49
1. MATERIAIS E MÉTODOS	49

1.1. Animais e reagentes	49
1.2. Procedimento de indução da hiperhomocisteinemia crônica e tratamento com ácido fólico	49
1.3. Preparação da membrana plasmática sináptica de córtex parietal de ratos	50
1.4. Dosagem da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	51
1.5. Ensaio cometa	51
1.6. Determinação protéica	52
1.7. Análise estatística	53
2. RESULTADOS	54
2.1. Efeito do tratamento com ácido fólico sobre a redução da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em córtex parietal de ratos hiperhomocisteinêmicos	54
2.2. Efeito da administração crônica de ácido fólico sobre o aumento do índice de dano ao DNA em sangue total de ratos hiperhomocisteinêmicos	55
IV. DISCUSSÃO	56
V. CONCLUSÕES	66
VI. PERSPECTIVAS	67
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO 1. Guia para autores do periódico Metabolic Brain Disease	82

I. INTRODUÇÃO

1. Erros Inatos do Metabolismo

Erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças hereditárias, majoritariamente, autossômicas recessivas que se caracterizam pela síntese de uma proteína alterada, geralmente, uma enzima com atividade parcial ou totalmente reduzida, resultando no bloqueio da via metabólica com conseqüente acúmulo de substrato e diminuição da síntese de produto. A freqüência individual dos EIM é baixa, porém, em conjunto, os aproximados 500 EIM descritos atingem um a cada mil nascimentos (Scriver et al., 2001).

A classificação mais utilizada para os EIM é realizada de acordo com a área do metabolismo afetada (Scriver et al., 2001): EIM de aminoácidos, de ácidos orgânicos, de glicídios, de lipídios, de glicosaminoglicanos, de glicoproteínas, de purinas e pirimidinas, de enzimas eritrocitárias, de metais, de lipoproteínas, de hormônios e de proteínas plasmáticas. Este trabalho enfoca um EIM de aminoácidos denominado homocistinúria (HCU).

2. Homocistinúria

A HCU é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos sulfurados, que foi reportado pela primeira vez em 1969 por McCully, com a identificação de homocistina [duas moléculas de homocisteína (Hcy) ligadas por ponte dissulfeto] na urina de uma paciente portadora de HCU, que apresentava placas arterioscleróticas, precocemente (McCully, 1969). O estudo realizado por McCully foi o primeiro a relacionar os níveis

elevados de Hcy plasmáticos, a deficiência das vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico encontrados em pacientes com alguns sintomas da HCU ao aparecimento de arteriosclerose em pacientes homocistinúricos (Walter et al., 1998; Mudd et al., 2001).

A HCU é uma doença autossômica recessiva com uma prevalência média variando de 1:80.000 à 1:200.000 nascidos vivos, o que depende das características populacionais do local do estudo. Essa doença se caracteriza bioquimicamente pela deficiência parcial ou total da enzima cistationina β-sintase (CBS), resultando em acúmulo tecidual do seu substrato Hcy, e na falta do produto cistationina (Figura 1). As concentrações plasmáticas normais de Hcy variam de 5 – 15 μM, podendo alcançar até 500 μM na HCU clássica onde a atividade da enzima CBS está fortemente reduzida. A Hcy, via remetilação, é convertida à metionina (Met). Portanto, a concentração desse aminoácido pode elevar-se de 35 μM à 2000 μM no plasma dos pacientes homocistinúricos. Estudos mostram que em pacientes heterozigóticos a atividade da enzima CBS está reduzida em aproximadamente 50% em extratos de fígado e fibroblastos. Além disso, a atividade dessa enzima também encontra-se diminuída em cérebro, linfócitos, cultura de células do fluido amniótico e vilosidades coriônicas. Cistationina e cisteína, os produtos da via de transulfuração da Hcy, têm suas concentrações reduzidas em pacientes homocistinúricos (Mudd et al., 2001).

Os pacientes homocistinúricos apresentam sintomas clínicos envolvendo diversos órgãos e sistemas, incluindo os olhos, o sistema vascular e o sistema nervoso central (SNC). Os achados clínicos no sistema vascular incluem tromboembolismo, arteriosclerose e infarto, e eles são a principal causa de morte precoce nesses pacientes. Os sintomas observados no SNC incluem convulsões, distúrbios psiquiátricos, distúrbios de comportamento e um variado grau de retardo mental. Esses

sintomas vem sendo relacionados às altas concentrações teciduais de Hcy observadas nos pacientes (Mudd et al., 2001).

O diagnóstico inicial da HCU é dado pela presença de sinais clínicos característicos da doença. Porém, o diagnóstico definitivo faz-se por análise dos parâmetros bioquímicos. O teste de triagem para HCU consiste na identificação da homocistina na urina do paciente, a qual reage com o cianeto-nitroprussiato. A detecção e a quantificação dos metabólitos da Hcy no plasma podem ser realizadas por eletroforese, cromatografia de troca iônica ou cromatografia líquida de alta resolução. Essas metodologias também são utilizadas para o monitoramento da eficácia do tratamento empregado em pacientes homocistinúricos. A confirmação do diagnóstico de HCU é dada através de ensaios diretos da atividade da enzima CBS em biópsia de fígado, cultura de fibroblastos da pele ou linfócitos estimulados por fitohemaglutinina obtidos dos pacientes. O diagnóstico precoce dessa doença auxilia o clínico a uma melhor condução terapêutica, evitando o desenvolvimento dos sintomas mais graves da doença. Neste sentido, pode-se realizar o diagnóstico pré-natal através da medida dos metabólitos da Hcy no líquido amniótico, utilizando-se cromatografia líquida de alta pressão, ou pela determinação da atividade da enzima CBS em cultura de células livres do líquido amniótico (Fowler e Jakobs, 1998; Mudd et al., 2001; 2003).

Após o diagnóstico clínico e bioquímico da HCU, inicia-se o tratamento com uma dieta reduzida em Met, e com uma suplementação de vitamina B₆ (para pacientes responsivos à piridoxina), cisteína e ácido fólico. A dieta com restrição de Met permite a redução da formação de Hcy, já que a Met é a sua precursora. Esta dieta tem demonstrado ser efetiva, reduzindo os níveis de Met até níveis normais e de Hcy até níveis não-detectáveis no plasma. A piridoxina é convertida a piridoxal fosfato (PLP), que é o cofator da CBS, e portanto estimula a atividade dessa enzima, reduzindo a

concentração de Hcy. O ácido fólico é convertido à 5-metiltetraidrofolato (5-MeTHF), um doador de grupamentos metil na conversão de Hcy à Met. Tendo em vista a função da cisteína como precursora do mais importante antioxidante cerebral, a glutathiona, faz-se necessário utilizar uma dieta suplementada com cisteína. O tratamento tem por objetivo controlar ou eliminar as complicações neurológicas e periféricas e as anormalidades bioquímicas características da doença, impedindo a progressão da sintomatologia (Walter et al., 1998; Mudd et al., 2001).

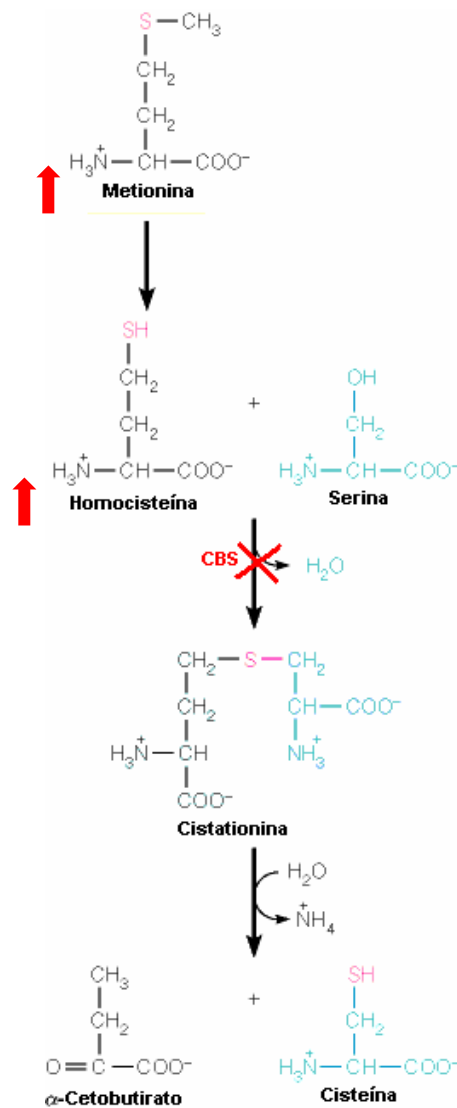


Figura 1. Via metabólica da homocisteína e bloqueio metabólico da enzima cistionina β-sintase característico da homocistinúria.

3. Homocisteína

A Hcy é um aminoácido sulfurado sintetizado a partir da Met (Figura 2). Esta participa do metabolismo de um carbono, uma rota metabólica fundamental para metilação de diversos substratos, além de estar envolvida na síntese e reparo do DNA. A Met pode ser obtida da dieta ou da degradação endógena de proteínas, e é convertida à S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima metionina adenosiltransferase (MAT; EC 2.5.1.6). A SAM formada é convertida à S-adenosil homocisteína (SAH) por uma metiltransferase (MT). Esta reação é a principal via de metilação de compostos endógenos, como o ácido desoxirribonucléico (DNA), a fosfatidiletanolamina, o guanidinoacetato e alguns neurotransmissores. A SAH é hidrolisada a Hcy e adenosina pela S-adenosil homocisteína hidrolase (SAHH; EC 3.3.1.1). A Hcy formada pode ser catabolizada de duas formas: (1) através da via de remetilação, onde a Hcy recebe um grupo metil proveniente do 5-MeTHF pela enzima metionina sintase (MS; EC 2.1.1.13) ou da betaína, em menor quantidade, pela enzima betaína homocisteína metiltransferase (BHMT; EC 2.1.1.15) formando novamente Met; ou, alternativamente, (2) através da via de transulfuração, onde a Hcy é convertida à cistationina pela enzima CBS (EC 4.2.1.22), que utiliza como cofator o PLP, e a cistationina formada é convertida à cisteína pela cistationina γ -liase (CGL; EC 4.4.1.1). A rota de remetilação é amplamente distribuída no organismo, enquanto que a via de transulfuração da Hcy tem distribuição limitada, sendo encontrada em maior quantidade no fígado, rins, intestino delgado e pâncreas (Fowler, 1997; Brosnan et al., 2004).

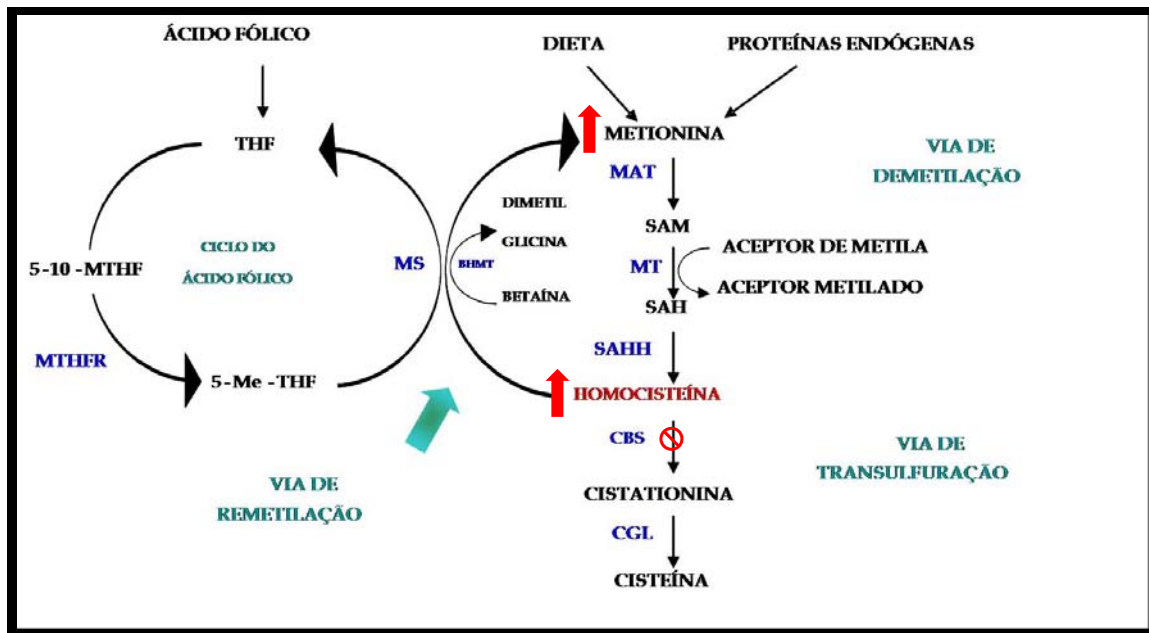


Figura 2. Metabolismo da homocisteína e bloqueio metabólico da enzima cistationina β -sintase característico da homocistinúria (Adaptado de Mudd et al., 2001).

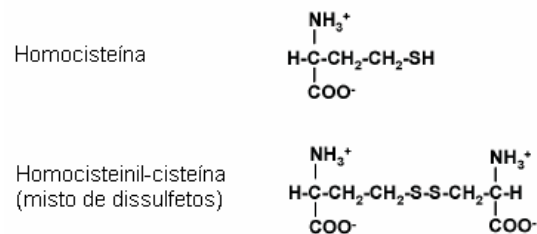
MAT – metionina adenosil transferase; MT – metiltransferase; SAHH – S-adenosilhomocisteína hidrolase; CBS – cistationina β -sintase; CGL – cistationina γ -liase; MS – metionina sintase; BHMT – betaína homocisteína metiltransferase; MTHFR – metileno tetrahydrofolato redutase; SAM – S-adenosil metionina; SAH – S-adenosil homocisteína; THF – tetrahydrofolato; 5,10-MTHF – 5,10-metilenotetrahydrofolato; 5-Me-THF – 5-metiltetrahydrofolato.

O metabolismo da Hcy tem pontos chaves de regulação, sendo dependente de diversos fatores, entre eles a adequada ingestão de vitaminas (cofatores das enzimas do ciclo da Hcy) e de proteínas que contém Met. A MS tem como grupo prostético a vitamina B₁₂ (cobalamina) e as enzimas que participam da via de transulfuração, CBS e CGL, utilizam como grupo prostético o PLP, um derivado da vitamina B₆. O ácido fólico, ou vitamina B₉, é o precursor do 5-MeTHF, o principal doador de grupamentos metil na via de remetilação da Hcy. Em conjunto, estes dados indicam que a deficiência vitamínica pode alterar a concentração plasmática de Hcy. Em adição, a ingesta de proteínas contendo Met e a concentração de substratos chaves, como a concentração de SAM, podem regular a velocidade da rota e direcionar a Hcy tanto para a remetilação, quanto para a transulfuração (Fowler, 1997; Brosnan et al., 2004).

A Hcy é encontrada no plasma sob diversas formas redox (figura 3): a forma reduzida contribui em menor quantidade para o “pool” total de Hcy, apenas 1 – 4%; a forma oxidada ligada a proteínas, como a albumina, através de uma ponte dissulfeto

corresponde à 70% - 80% da Hcy total plasmática; e a forma livre oxidada (composta por um misto de dissulfetos) encontra-se numa proporção de aproximadamente 20% (Mudd et al., 2001; Perna et al., 2003; Brosnan et al., 2004). Entretanto, essa proporção é perdida quando a concentração plasmática de Hcy supera 140 μM , ocorrendo saturação da ligação às proteínas plasmáticas e aumento na concentração de Hcy na forma livre (Perna et al., 2003).

Homocisteína não ligada a proteínas



Homocisteína ligada a proteínas

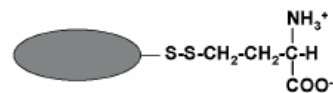


Figura 3. Formas redox da homocisteína.

3.1. Homocisteína e Neurotoxicidade

Além dos dados clínicos correlacionando altas concentrações plasmáticas de Hcy com os sintomas característicos da HCU, como retardo mental e crises epiléticas (Mudd et al., 1985), estudos em modelos animais demonstraram que a injeção intraperitoneal de altas doses de Hcy está relacionada a convulsões em ratos (Kubova et al., 1995; Mudd et al., 2001). O cérebro é um órgão, especialmente, sensível aos efeitos da Hcy, além disso, este aminoácido neurotóxico é concentrado em neurônios, pois ele é, rapidamente, captado através de um transportador específico de membrana

(Grieve et al., 1992). Outro fator importante que favorece a neurotoxicidade da Hcy é atribuída à ausência de duas vias importantes de eliminação dessa substância, já que a enzima BHMT e parte da via de transulfuração até cisteína não estão presentes no cérebro (Finkelstein, 1998). Nesse contexto, a Hcy tem sido relacionada à morte neuronal via excitotoxicidade, por provocar a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I (Zieminska et al., 2003) e ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA) (Kim e Pae, 1996; Lipton et al., 1997; Kim, 1999; Kruman et al., 2000).

Outra abordagem utilizada para explicar os efeitos citotóxicos da Hcy, envolve a indução de estresse oxidativo, via aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que podem atuar sobre lipídios, proteínas e sobre o DNA, ou por redução na produção de defesas antioxidantes (Halliwell e Whiteman, 2004). Estudos têm demonstrado que a autooxidação da Hcy formando homocistina e dissulfetos mistos promove a geração de espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido e peróxido de hidrogênio, que posteriormente é convertido a radical hidroxil, o mais danoso para as células (Mudd et al., 2001; Ho et al., 2002; Dayal et al., 2004; Faraci e Lentz, 2004). Trabalhos mostram que a neurotoxicidade da Hcy é prevenida pela incubação concomitante com as enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase mais catalase, demonstrando o envolvimento dos radicais livres na citotoxicidade mediada por esse aminoácido (Kim e Pae, 1996). Ho e colaboradores (2002) ampliaram o panorama de ação da Hcy como neurotoxina, mostrando o papel da Hcy na produção de espécies reativas de oxigênio, na ativação de receptores NMDA com conseqüente influxo de Ca^{2+} , e na indução de apoptose via depleção de ATP celular pela ativação das enzimas de reparo de DNA e via ativação da cascata das caspases.

Resultados obtidos em nosso laboratório corroboram com os dados da literatura. A Hcy inibe a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em hipocampo (Streck et al., 2002a; Wyse et al., 2002) e córtex parietal de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia (Matté et al., 2004). Essa inibição enzimática pode estar relacionada com a indução de estresse oxidativo promovida pela Hcy *in vitro* em hipocampo (Streck et al., 2003a) e em córtex parietal de ratos (Matté et al., 2004), ou com a possível redução do aporte energético cerebral, visto que a Hcy inibe o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória (Streck et al., 2003b) em hipocampo de ratos. A neurotoxicidade desse aminoácido pode ser sugerida, também, pelo aumento do dano celular, medido pela liberação da enzima lactato desidrogenase para o meio de incubação, em fatias de hipocampo de ratos hiperhomocisteinêmicos submetidas à privação de oxigênio e glicose (dados não mostrados).

4. Ácido Fólico

O ácido fólico é a forma mais oxidada e estável dos folatos, sua estrutura consiste de um anel pteridina ligado ao ácido p-aminobenzóico, através de uma ponte metileno, e este a um resíduo de ácido glutâmico. Esta vitamina não é sintetizada pelos humanos, e desta forma, deve ser ingerida com a dieta, visto que participa de importantes funções endógenas, como a síntese de DNA. As principais fontes naturais de ácido fólico são vegetais verdes, algumas frutas cítricas, fígado e cereais. Além destas fontes, diversos produtos comerciais têm recebido suplementação com esta vitamina, especialmente farinhas (Finglas et al., 2003).

Algumas células de mamíferos, como os neurônios e a glia apresentam transportadores específicos para ácido fólico, o que demonstra a importância desta

vitamina no metabolismo cerebral (Sirotnak e Tolner, 1999). Após internalização celular, o ácido fólico, que já se encontra ligado a um radical glutamato, recebe em torno de oito resíduos de glutamato, que promovem sua retenção no meio intracelular. O ácido fólico poliglutamato encontra-se compartimentalizado no meio intracelular, aproximadamente metade do “pool” encontra-se na mitocôndria e o restante no citosol (Suh et al., 2001).

Considerando a participação do ácido fólico na rota metabólica da Hcy, estudos clínicos e em modelos animais têm sido desenvolvidos com a finalidade de avaliar o efeito da administração ou a ingestão de ácido fólico sobre os efeitos tóxicos causados pela Hcy. Testes clínicos mostraram que o ácido fólico reduz significativamente os níveis plasmáticos de Hcy em humanos (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 1998; Rydlewicz et al., 2002; Lamers et al., 2004). Achón e colaboradores (2000) administraram a ratos uma dieta suplementada com ácido fólico e observaram um aumento da relação SAM:SAH hepática, possivelmente pelo aumento da síntese de SAM, o que sugere um aumento na velocidade da via de remetilação da Hcy. Isso é reforçado pela redução nas concentrações séricas de Hcy nesse modelo animal. Por outro lado, uma dieta com deprivação de ácido fólico aumenta os níveis plasmáticos de Hcy (Kim et al., 2002; Ho et al., 2003) e está relacionada com morte de neurônios dopaminérgicos em modelo animal da doença de Parkinson (Duan et al., 2002).

5. Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma enzima integral de membrana amplamente distribuída nas células de mamíferos, porém encontrada em maior concentração em células

epiteliais e neurais (Hansen e Clausen, 1988). As células nervosas apresentam uma elevação gradativa da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após o nascimento, que se co-localiza temporalmente com as alterações durante a sinaptogênese ativa, sendo que uma maior atividade desta enzima ocorre na região sináptica (Erecinska et al., 2004). Esta enzima, da família das P-ATPases, utiliza a hidrólise de cerca de 50% do ATP produzido no cérebro (Erecinska e Silver, 1994) a fim de manter o gradiente iônico neuronal, através do co-transporte de três íons Na^+ para o meio extracelular e dois íons K^+ para o meio intracelular. A manutenção do equilíbrio eletrolítico intra e extracelular garante ao neurônio a geração do potencial de membrana e do gradiente eletroquímico a fim de manter a excitabilidade e o volume neuronal (Kaplan, 2002; Devlin, 2003).

A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína oligomérica com duas subunidades α transmembrana, que contém os sítios de ligação para Na^+ , K^+ , ATP e glicosídeos cardíacos, duas subunidades β regulatórias, na forma de glicoproteínas, e uma subunidade γ . Durante o ciclo catalítico da Na^+, K^+ -ATPase a subunidade α é fosforilada e desfosforilada em um resíduo de ácido aspártico, estabilizando sua estrutura em duas formas, E_1 e E_2 (Figura 4) (Vasilets e Schwarz, 1993; Kaplan, 2002; Devlin, 2003; Jorgensen et al., 2003).

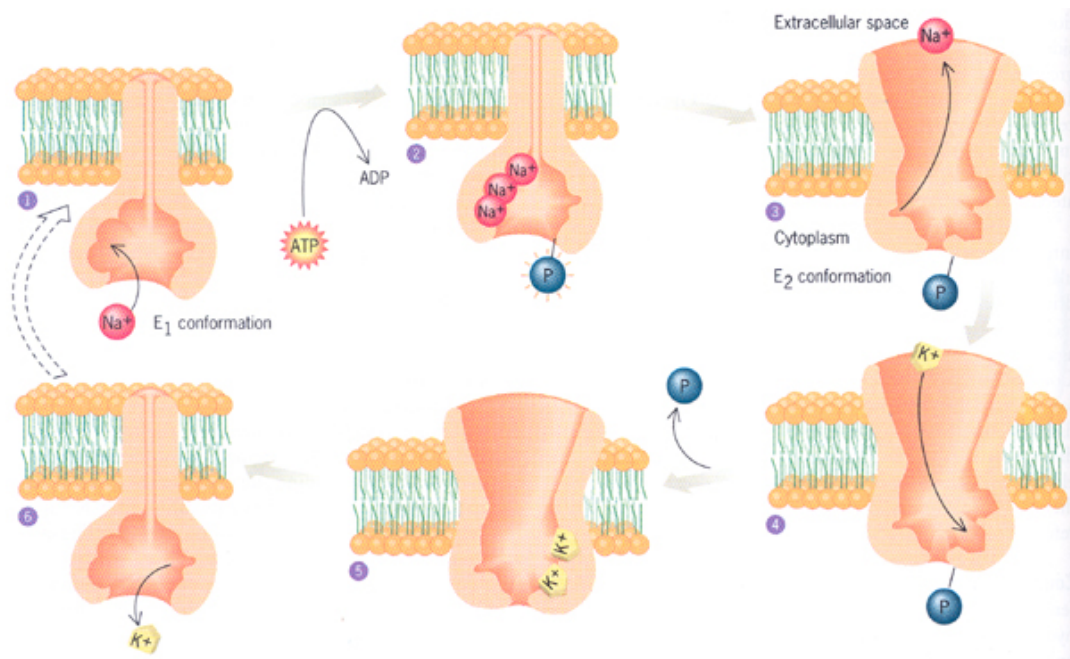


Figura 4. Ciclo catalítico da Na^+, K^+ -ATPase.

A forma E_1 é estabilizada pela ligação de três íons Na^+ . A fosforilação da enzima promove a perda da afinidade pelos íons Na^+ e conseqüente liberação dos mesmos no meio extracelular. A enzima passa a forma E_2 , com alta afinidade por íons K^+ , ligando assim dois íons, o que provoca a desfosforilação da enzima, seguida pela perda da afinidade pelos íons K^+ , que são liberados no meio intracelular. Finalmente, a enzima liga ATP novamente voltando à forma E_1 , que tem alta afinidade por Na^+ . Essa enzima tem sua atividade inibida por glicosídeos cardíacos, como a digoxina e a ouabaína (Vasilets e Schwarz, 1993; Kaplan, 2002; Devlin, 2003; Jorgensen et al., 2003).

Dados da literatura mostram que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está reduzida em isquemia cerebral (Wyse et al., 2000) e em algumas doenças neurodegenerativas (Lees, 1993; Hattori et al., 1998). Possíveis mecanismos de redução da atividade desta enzima envolvem o estresse oxidativo, pois a Na^+, K^+ -ATPase é inibida por radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (Lees, 1993; Kurella et al., 1999; Wang et al., 2003), peroxinitrito e óxido nítrico (NO) (Sato et al., 1997), possivelmente por

diminuição dos grupos sulfidríla viáveis presentes na enzima (Dobrota et al., 1999; Kurella et al., 1999). Essa enzima ainda é inibida por produtos de lipoperoxidação, como malondialdeído e 4-hidróxi-2-transnonenal, e por alterações na fluidez da membrana plasmática (Morel et al., 1999; Rauchová et al., 1999; Chakraborty et al., 2003).

Estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está reduzida em córtex parietal (Matté et al., 2004) e hipocampo (Streck et al., 2002a) de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperhomocisteinemia. Por outro lado, as vitaminas E e C (Wyse et al., 2002), a glutatona, a cisteína e o ditioneitol previnem o efeito mediado pela Hcy em hipocampo de ratos, indicando a participação do estresse oxidativo na inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase nessa estrutura cerebral (Streck et al., 2002b). O superóxido também parece estar envolvido na redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratos, desde que a enzima superóxido dismutase previne a inibição da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de ratos (Streck et al., 2002b).

6. Butirilcolinesterase

A acetilcolina é um neurotransmissor clássico que tem sua atividade finalizada por enzimas colinesterases presentes na sinapse. As colinesterases dividem-se em duas classes de acordo com sua preferência por substratos: acetilcolinesterase, que preferencialmente hidrolisa acetilcolina, e butirilcolinesterase (BuChE), que hidrolisa acetilcolina e outros ésteres de colina. A BuChE é uma enzima responsável pela hidrólise de ésteres de colina em soro, fígado, coração, endotélio nervoso e SNC (Mack e Robitzki, 2000). Essa enzima foi recentemente identificada em córtex cerebral,

hipocampo, amígdala e tálamo (Darvesh et al., 2003), estruturas com papel importante nas funções cognitivas. Um aumento da atividade da BuChE foi observada no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer (Benzi e Moretti, 1998). Esses autores relacionaram a formação de placas amilóides com as alterações na atividade dessa enzima.

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a hiperhomocisteinemia reduz a atividade da BuChE em soro de ratos e que as vitaminas E e C previnem tal efeito (Stefanello et al., 2005a).

7. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é conceituado como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes (Halliwell e Whiteman, 2004). Os radicais livres são formados em nosso organismo em condições fisiológicas em quantidades controladas pelas defesas antioxidantes, entretanto, em situações patológicas ocorre um aumento na formação de radicais livres e/ou uma diminuição nas defesas antioxidantes endógenas, promovendo o estresse oxidativo (Salvador e Henriques, 2004).

As espécies reativas de oxigênio são formadas em grande quantidade pela respiração celular, na mitocôndria, principalmente nos complexos I e III da cadeia respiratória, onde ocorre redução incompleta (2-5%) do oxigênio molecular. Os principais representantes das espécies reativas de oxigênio são os radicais superóxido e hidroxil, e o peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1999; Salvador e Henriques, 2004). As espécies reativas de oxigênio podem atuar sobre diversos alvos

celulares, entre esses estão os lipídios, as proteínas e o DNA (Halliwell e Whiteman, 2004).

As defesas antioxidantes podem ser divididas em enzimáticas e não-enzimáticas. Entre as enzimas antioxidantes, as principais são superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (Halliwell, 2001; Salvador e Henriques, 2004). Quanto as defesas antioxidantes não-enzimáticas, as principais são as vitaminas, como as vitaminas A, C, E, riboflavina e tiamina, os polifenóis e os compostos de baixo peso molecular, que incluem bilirrubina, α -cetoácidos, melatonina, urato, ácido lipóico, estrógenos e glutathione (Salvador e Henriques, 2004)

O estresse oxidativo tem sido relacionado com diversas patologias de origem e fisiopatologia ainda obscuras, tais como as doenças neurodegenerativas de Parkinson e Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, câncer e doenças neurológicas (Halliwell, 2001; Salvador e Henriques, 2004). Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a Hcy *in vitro* induz o estresse oxidativo em córtex parietal (Matté et al., 2004) e hipocampo de ratos (Streck et al., 2003a). Wyse e colaboradores (2002) verificaram que a hiperhomocisteinemia aguda promove a inibição da catalase e diminui as defesas antioxidantes não-enzimáticas em hipocampo de ratos.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Considerando que: (1) a Hcy reduz as atividades da Na^+, K^+ -ATPase e da BuChE em córtex parietal e soro de ratos, respectivamente, (2) a Hcy *in vitro* induz estresse oxidativo em córtex parietal, e (3) o ácido fólico faz parte da via metabólica de remetilação da Hcy, o objetivo geral do nosso estudo foi investigar o efeito do ácido fólico sobre as alterações causadas pela Hcy nas atividades da Na^+, K^+ -ATPase e da BuChE, nos parâmetros de estresse oxidativo e no índice de dano ao DNA.

Esse trabalho será dividido em três capítulos como segue:

Capítulo I

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da exposição de homogeneizados de córtex parietal de ratos à Hcy avaliando a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas.
2. Verificar o papel do ácido fólico e do N^ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) sobre a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela Hcy.
3. Realizar estudos cinéticos da atividade da Na^+, K^+ -ATPase na presença de Hcy, quando adicionada ao ensaio enzimático (*in vitro*) em córtex parietal de ratos.

Capítulo II

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito do pré-tratamento com ácido fólico sobre a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia aguda.
2. Investigar o efeito do pré-tratamento com ácido fólico sobre a redução da atividade da BuChE em soro de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia aguda.
3. Avaliar o efeito da hiperhomocisteinemia aguda sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, denominados formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo total de grupos tióis em córtex parietal de ratos.

Capítulo III

Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do tratamento com ácido fólico sobre a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia crônica.
2. Investigar o efeito da hiperhomocisteinemia crônica e do concomitante tratamento com ácido fólico sobre o índice de dano ao DNA, utilizando o ensaio cometa, em sangue total de ratos.

OBS: os capítulos I e II serão apresentados na forma de artigos e o capítulo III na forma de resultados não submetidos a artigos.

IV. DISCUSSÃO

A HCU é um erro inato do metabolismo caracterizado, bioquimicamente, pela deficiência da enzima CBS, o que promove o bloqueio na via metabólica de transulfuração da Hcy à cisteína (Figura 1), resultando em elevação de até 50 vezes dos níveis plasmáticos de Hcy. Nos primeiros anos de vida, os pacientes desenvolvem graves sintomas neurológicos, no entanto a morte precoce relacionada à HCU, geralmente, é consequência de disfunções vasculares (De Franchis et al., 1998; Mudd et al., 2001). O diagnóstico para esse EIM é realizado primeiramente por métodos de triagem em recém nascidos, identificando-se homocistina na urina dos pacientes. Entretanto, outros métodos estão disponíveis para o diagnóstico precoce da HCU, ainda intra-uterino, visando rastrear possíveis pacientes em famílias com história prévia desse EIM ou morte não explicada de recém nascido. O tratamento é iniciado o mais breve possível, a fim de evitar as complicações neurológicas e vasculares causadas pelos altos níveis teciduais de Hcy (Fowler e Jakobs, 1998; Mudd et al., 2001).

Além da HCU, a elevação dos níveis plasmáticos de Hcy tem sido descrita como fator de risco para diversas doenças, incluindo isquemia cardíaca e arteriosclerose (Welch e Loscalzo, 1998; Cavalca et al., 2001; Durand et al., 2001; Koning, 2003; Álvarez-Maqueda et al., 2004), esquizofrenia (Regland et al., 1995; Susser et al., 1998), depressão (Bottiglieri, 2005), demência (Loscalzo, 2002) e doenças neurodegenerativas (Clarke et al., 1998; Kuhn et al., 1998; Mattson et al., 2002; Seshadri et al., 2002; Morris, 2003; Dwyer et al., 2004; Garcia et al., 2004). Por outro lado, altos níveis de ácido fólico têm sido descritos como fator de proteção para essas doenças, enquanto baixos níveis dessa vitamina representam um fator associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurológicas (Graham e O'Callaghan,

2002; Mattson et al., 2002; Verhaar et al., 2002; Quadri et al., 2004; Bottiglieri, 2005; Pintó et al., 2005). Corroborando com esses dados e objetivando esclarecer a relação entre os níveis plasmáticos de ácido fólico e Hcy, diversos estudos têm demonstrado que uma dieta suplementada com ácido fólico pode ser benéfica na prevenção de doenças cardiovasculares e neurológicas, por reduzir as concentrações de Hcy (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 1998; Rydlewicz et al., 2002; Den Heijer et al., 2003; Lamers et al., 2004; Pintó et al., 2005).

Modelos animais têm sido utilizados com a finalidade de avaliar o efeito da Hcy e do ácido fólico sobre algumas doenças humanas nas quais altos níveis de Hcy e/ou reduzidos níveis de ácido fólico já tenham sido descritos como fatores de risco. Num modelo animal da doença de Parkinson, os ratos receberam uma dieta com deprivação de ácido fólico e apresentaram elevação dos níveis plasmáticos de Hcy, que está associada à morte de neurônios dopaminérgicos (Duan et al., 2002). Endres e colaboradores (2005) demonstraram um risco aumentado de derrame e isquemia cerebral, e o aumento do dano oxidativo ao DNA do cérebro isquêmico de ratos que receberam uma dieta com deprivação de ácido fólico. Kim e colaboradores (2002) administraram dietas ricas e deficitárias em ácido fólico a ratos e observaram através de microscopia eletrônica que o cérebro dos animais tratados com dietas pobres em ácido fólico apresentaram alterações características de degeneração mitocondrial no endotélio, entumescimento citoplasmático e atrofia da parede endotelial cerebrocortical. Corroborando com esses dados, estudos *ex-vivo* mostraram que neurônios em cultura incubados num meio com deficiência de ácido fólico apresentaram aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e prejuízo da função mitocondrial. Estes efeitos estão relacionados ao aumento da

concentração de Hcy, desde que a adição de um inibidor da síntese de Hcy no meio inibe tais efeitos (Tjiattas et al., 2004).

Nosso grupo de pesquisa tem investigado os efeitos da Hcy sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e sobre o metabolismo energético em hipocampo de ratos. Streck e colaboradores (2002a) desenvolveram um modelo crônico de hiperhomocisteinemia através de administrações diárias de Hcy do 6º ao 28º dia de vida pós-natal dos ratos. Ao final do tratamento as concentrações plasmáticas de Hcy nos animais apresentam-se semelhantes às encontradas em pacientes homocistinúricos. Esse modelo animal de hiperhomocisteinemia viabilizou a obtenção de muitos dados a cerca do efeito da Hcy sobre o SNC. Streck e colaboradores (2002a) mostraram que a administração crônica de Hcy inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase hipocampal em membrana plasmática sináptica. Ratos submetidos ao modelo de hiperhomocisteinemia apresentam uma redução de alguns parâmetros de metabolismo energético, como diminuição da produção de CO_2 no ciclo de Krebs e redução nas atividades das enzimas da cadeia respiratória (succinato desidrogenase e citocromo c oxidase) (Streck et al., 2003b), o que poderia reduzir o aporte energético do SNC. Esse fator pode ser determinante para a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, já que essa enzima consome aproximadamente 50% do ATP produzido no cérebro (Erecinska e Silver, 1994).

Wyse e colaboradores (2002) mostraram que a administração aguda de Hcy reduz a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratos e diminui as defesas antioxidantes nessa mesma estrutura cerebral. O pré-tratamento com antioxidantes (vitaminas E e C) preveniu os efeitos provocados por esse aminoácido, o que sugere o envolvimento do estresse oxidativo na inibição enzimática. Quanto aos estudos *in vitro*, a Hcy reduz a atividade da Na^+, K^+ -ATPase hipocampal quando adicionada diretamente

ao ensaio enzimático (Streck et al., 2002b). Em adição, Streck e colaboradores (2001) mostraram que a Hcy quando adicionada ao homogeneizado e pré-incubada por 1 hora inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmáticas sináptica de hipocampo de ratos. Essa inibição foi prevenida por antioxidantes (glutathiona, ditioneitol e superóxido dismutase), o que evidencia também o papel do estresse oxidativo no mecanismo de ação da Hcy. Corroborando com esses dados, a Hcy *in vitro* induz o estresse oxidativo em hipocampo de ratos, aumentando o índice de peroxidação lipídica e reduzindo as defesas antioxidantes não enzimáticas (Streck et al., 2003a).

Dando continuidade aos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, no presente trabalho avaliamos o efeito da Hcy sobre alguns parâmetros bioquímicos em córtex parietal de ratos jovens. Escolhemos esta estrutura cerebral porque ela tem importante papel nos mecanismos de memória e aprendizado (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 1999), porque pacientes homocistinúricos apresentam diversos sintomas neurológicos (Mudd et al., 2001) e porque a administração de Hcy prejudica a memória em ratos (Reis et al., 2002; Streck et al., 2004).

Iniciamos nosso estudo realizando experimentos *in vitro*, onde avaliamos o efeito da exposição de homogeneizado de córtex parietal a Hcy sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de ratos. Nossos resultados mostraram que a Hcy reduz a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal de ratos. O ácido fólico e o L-NAME previnem tal efeito. Estes ensaios foram realizados submetendo-se os homogeneizados de córtex parietal de ratos não-tratados, à pré-incubação de 1 h com as substâncias mencionadas acima, após esse período, membranas plasmáticas sinápticas foram preparadas e a atividade enzimática foi determinada.

Considerando que a Hcy quando adicionada diretamente ao ensaio enzimático inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex

parietal de ratos (Matté et al., 2004), nós também realizamos estudos cinéticos de inibição da atividade dessa enzima. Nossos resultados mostraram que a Hcy inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de forma não competitiva com o ATP, pois concentrações crescentes de Hcy reduziram a velocidade máxima enzimática, e o K_m não foi alterado. Esses dados sugerem que a Hcy não altera a atividade da Na^+, K^+ -ATPase por interagir diretamente com o sítio de ligação do ATP na enzima. Nossos achados concordam com dados anteriores mostrando que a Hcy inibe esta enzima de forma não competitiva, em hipocampo de ratos (Streck et al., 2002c).

Posteriormente, realizamos estudos *in vivo*, objetivando avaliar o efeito da hiperhomocisteinemia aguda e crônica sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal de ratos. Mostramos que as administrações aguda e crônica de Hcy reduzem, significativamente, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal. Em adição, avaliamos o efeito do tratamento com ácido fólico sobre a redução da atividade enzimática causada pela Hcy. O ácido fólico foi administrado aos animais de acordo com dois modelos diferenciados: (1) pré-tratamento quando induzimos hiperhomocisteinemia aguda, e (2) tratamento concomitante com a hiperhomocisteinemia crônica. A administração de ácido fólico foi capaz de prevenir os efeitos causados pela Hcy sobre a atividade dessa enzima, tanto utilizando a abordagem de pré-tratamento, quanto na forma de administração concomitante do ácido fólico com a Hcy.

Nesse estudo, também, investigamos o efeito da hiperhomocisteinemia aguda sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, denominados TBARS e conteúdo total de grupos tióis, que são índices de dano a lipídios e proteínas, respectivamente. Nossos resultados mostraram que uma administração aguda de Hcy não alterou esses parâmetros de estresse oxidativo em córtex parietal de ratos.

Como mencionado anteriormente, o ácido fólico é o precursor do 5-MeTHF, o principal doador de grupos metil na conversão de Hcy à Met (Finkelstein, 1998; Mudd et al., 2001; Brosnan et al., 2004). Uma dieta deficiente em ácido fólico aumenta os níveis de Hcy plasmáticos (Kim et al., 2002; Ho et al., 2003). Por outro lado, Achón e colaboradores (2000) mostraram que uma dieta suplementada com ácido fólico reduz os níveis de Hcy possivelmente via aumento da remetilação da mesma. No presente trabalho, não medimos os níveis plasmáticos e cerebrais de Hcy e ácido fólico pós-indução dos modelos de hiperhomocisteinemia e administração de ácido fólico. Entretanto, sugerimos que um possível mecanismo para o efeito de prevenção, apresentado pelo ácido fólico sobre a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causado pela Hcy, seria a metabolização aumentada desse aminoácido, via remetilação à Met. No entanto, a concentração de Met não atingiria níveis suficientes para promover a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Stefanello et al., 2005b).

Por outro lado, o mecanismo de citotoxicidade mediado pela Hcy inclui a indução de estresse oxidativo via produção de espécies reativas de oxigênio e redução das defesas antioxidantes (Sachdev, 2005). Espécies reativas podem ser geradas de diversas formas pela Hcy, entre elas via autooxidação, produzindo superóxido (Loscalzo, 1996; Dayal et al., 2004; Faraci e Lentz, 2004), e via superativação dos receptores NMDA (Lipton et al., 1997; Das, 2003), permitindo o influxo excessivo de Ca^{2+} e a ativação da NOS, com conseqüente produção de espécies reativas em neurônios (Culcasi et al., 1994; Gbadegesin et al., 1999; Nelson et al., 2003). Topal e colaboradores (2004) também mostraram que a Hcy pode atuar sobre a NOS promovendo seu desacoplamento e conseqüente formação de superóxido em células endoteliais. As espécies reativas NO e superóxido são instáveis e reagem avidamente formando um radical livre mais danoso, o peroxinitrito (Rubbo et al., 1994; Nelson et al.,

2003; Dudzinski et al., *in press*), que promove lipoperoxidação (Darley-Usmar et al., 1995) e inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase por reagir com grupos sulfidrilas essenciais para sua atividade catalítica (Radi et al., 1991; Kurella et al., 1999; Wang et al., 2003).

Estudos mostram que o ácido fólico e seu derivado 5-MeTHF têm propriedades antioxidantes, atuando como “scavenger” de espécies reativas (Zhang et al., 2000; Doshi et al., 2001; Moat et al., 2004). Outra habilidade inerente ao ácido fólico reside em sua capacidade de aumentar a viabilidade da tetraidrobiopterina, um cofator da NOS, prevenindo seu desacoplamento e conseqüente produção de espécies reativas (Das, 2003).

Nesse contexto, demonstramos que o L-NAME, um inibidor da NOS, preveniu a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela Hcy. Corroborando com nossos dados, Avrova e colaboradores (1999) mostraram que o L-NAME preveniu a inibição da Na^+, K^+ -ATPase causada pelo glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que a Hcy *in vitro* reduz as defesas antioxidantes e aumenta a peroxidação lipídica em córtex parietal (Matté et al., 2004) e em hipocampo de ratos (Streck et al., 2003a). Resultados semelhantes foram obtidos por Jara-Prado e colaboradores (2003), que mostraram que a Hcy induz peroxidação lipídica em sinaptossomas de cérebro de ratos, e que o L-NAME e um antagonista do receptor NMDA previnem o efeito desse aminoácido. Esses dados sugerem que o efeito da Hcy sobre a Na^+, K^+ -ATPase pode ser mediado pela ativação da NOS, culminando na produção de espécies reativas que podem reagir com grupos sulfidrilas presentes na enzima (Radi et al., 1991; Sato et al., 1997; Kurella et al., 1999; Wang et al., 2003).

Também avaliamos o efeito do pré-tratamento com ácido fólico sobre a inibição da BuChE causada pela hiperhomocisteinemia aguda em soro de ratos. A BuChE é

uma enzima encontrada no sangue (Mack e Robitzki, 2000) e em diversas estruturas cerebrais fundamentais para os mecanismos de memória e aprendizado (Darvesh et al., 2003). Considerando que a Hcy (*in vivo* e *in vitro*) reduz a atividade da BuChE em soro de ratos (Stefanello et al., 2003), um dos objetivos de nosso estudo foi avaliar o efeito do pré-tratamento com ácido fólico sobre a redução da atividade da BuChE em soro de ratos hiperhomocisteinêmicos. Nossos resultados mostraram que a administração aguda de Hcy reduz a atividade da BuChE e que o pré-tratamento com ácido fólico foi eficaz em prevenir esse efeito. Stefanello e colaboradores (2005a) mostraram que a BuChE é inibida pela Hcy provavelmente por um mecanismo que envolve o estresse oxidativo, desde que o pré-tratamento com as vitaminas E e C previne o efeito da administração aguda de Hcy. Acreditamos que o efeito exercido pelo ácido fólico em nosso estudo possa ser semelhante ao descrito para a Na⁺,K⁺-ATPase, isto é, via aumento da remetilação da Hcy (Finkelstein, 1998; Achón et al., 2000; Mudd et al., 2001; Brosnan et al., 2004) ou devido a suas propriedades antioxidantes (Zhang et al., 2000; Doshi et al., 2001; Das, 2003; Moat et al., 2004).

Por fim, avaliamos o efeito da hiperhomocisteinemia crônica sobre o índice de dano ao DNA em sangue total de ratos, através do ensaio cometa. Nossos dados revelam que a administração crônica de Hcy provoca um aumento expressivo de dano ao DNA (170%) quando comparado ao grupo controle. O ácido fólico *per se* não altera significativamente o dano ao DNA. Entretanto, a administração crônica concomitante de Hcy e ácido fólico mostrou que o ácido fólico foi capaz de prevenir totalmente o efeito da Hcy sobre o índice de dano ao DNA. Estes resultados demonstram que a Hcy, ao menos quando administrada cronicamente aos animais, aumenta o índice de dano ao DNA, o qual expressa fragmentação de fita simples e dupla do DNA (Tice et al., 2000).

Corroborando com nossos resultados, diversos estudos têm demonstrado que a Hcy atua sobre o DNA promovendo quebra de fita, via radicais livres, podendo levar a apoptose ou ao câncer (Mattson e Shea, 2003; Oikawa et al., 2003; Sachdev, 2005). Além disso, a formação de micronúcleos, um indicador de instabilidade genômica, é minimizada quando a concentração de Hcy plasmática encontra-se inferior à 7,5 μM (Feneck, 2001). Kruman e colaboradores (2000) mostraram que a Hcy colocada no meio de incubação é rapidamente captada pelos neurônios hipocâmpais e promove morte celular via dano ao DNA, subsequente à ativação da cascata apoptótica dependente de caspases. Kruman e colaboradores (2002), utilizando cultura de neurônios hipocâmpais, mostraram que um meio deficiente em ácido fólico ou rico em Hcy prejudica o sistema de reparo do DNA, promovendo o acúmulo do dano ao DNA causado pela presença da proteína β -amilóide, a qual está relacionada à doença de Alzheimer. Além disso, Duthie e colaboradores (2000) mostraram que uma dieta livre de ácido fólico fornecida a ratos promove uma diminuição nas concentrações plasmáticas, eritrocitárias e hepáticas de ácido fólico, e essa redução está associada à instabilidade do DNA, que foi demonstrada pelo aumento das quebras de fitas do ácido nucléico. Estudos clínicos mostram que uma concentração superior a 700 nM de ácido fólico em eritrócitos reduz a hipometilação do DNA, reduz a incorporação de uracil no DNA, quebras cromossômicas e formação de micronúcleos (Feneck, 2001; 2002).

Considerando que o peroxinitrito tem sido descrito como um potente mediador de dano sobre o DNA (Szabó, 1996) e que a Hcy pode participar de sua formação via autoxidação (Loscalzo, 1996; Dayal et al., 2004; Faraci e Lentz, 2004) ou desacoplamento da NOS (Culcasi et al., 1994; Gbadegesin et al., 1999; Nelson et al., 2003; Topal et al., 2004), o efeito observado em nossos resultados poderia ser mediado por espécies reativas. Por outro lado, o ácido fólico preveniu o efeito da Hcy

sobre o DNA. Possíveis explicações para nossos resultados incluem o efeito antioxidante demonstrado pelo ácido fólico e seus metabólitos (Zhang et al., 2000; Doshi et al., 2001; Moat et al., 2004), ou o estímulo da rota de remetilação da Hcy (Finkelstein, 1998; Achón et al., 2000; Mudd et al., 2001; Brosnan et al., 2004) reduzindo as concentrações desse aminoácido e assim seus efeitos.

Concluindo, nossos resultados mostraram que a Hcy *in vitro* inibe a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase em córtex parietal de ratos. A incubação concomitante com ácido fólico ou L-NAME foi capaz de prevenir tal efeito. O ácido fólico, também, foi eficaz em prevenir a redução das atividades da Na⁺, K⁺-ATPase e da BuChE em córtex parietal e soro de ratos hiperhomocisteinêmicos, respectivamente. Também, mostramos que a hiperhomocisteinemia crônica reduz a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase em córtex parietal e aumenta o índice de dano ao DNA em sangue total de ratos. O tratamento com ácido fólico, novamente, preveniu os efeitos causados pela Hcy. Acreditamos que o mecanismo de ação do ácido fólico possa contemplar efeitos como: (1) o aumento da remetilação da Hcy à Met, e/ou (2) o seu efeito antioxidante, e/ou (3) a habilidade em prevenir o desacoplamento da NOS, e assim impedir a formação de NO/peroxinitrito. O esclarecimento do mecanismo de ação do ácido fólico requer mais estudos. Entretanto, nossos resultados podem justificar a utilização dessa vitamina na terapia precoce em pacientes homocistinúricos, no intuito de prevenir os sintomas neurológicos característicos da HCU.

V. CONCLUSÕES

1. A Hcy, quando adicionada ao homogeneizado de córtex parietal e incubada por 1 hora, reduz, significativamente, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica.
2. O ácido fólico e o L-NAME não alteram a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, mas previnem a inibição dessa enzima causada pela Hcy.
3. A Hcy quando adicionada, diretamente, ao ensaio enzimático inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex parietal de ratos de forma não-competitiva com o substrato ATP.
4. A hiperhomocisteinemia aguda reduz a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e BuChE em córtex parietal e soro de ratos, respectivamente. O pré-tratamento com ácido fólico previne os efeitos causados pela administração aguda de Hcy.
5. A hiperhomocisteinemia aguda não altera os parâmetros de estresse oxidativo avaliados, denominados TBARS e conteúdo total de grupos tióis em córtex parietal de ratos.
6. A hiperhomocisteinemia crônica inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex parietal e aumenta o índice de dano ao DNA em sangue total de ratos. O tratamento com ácido fólico preveniu tais efeitos.
7. Em resumo, a Hcy reduz a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal e BuChE em soro, e aumenta o índice de dano ao DNA em sangue total de ratos. O ácido fólico previne as alterações bioquímicas estudadas causadas pela Hcy.

VI. PERSPECTIVAS

Após a discussão deste estudo, observa-se que muitas questões ainda permanecem sem resposta. A fim de esclarecer diversos aspectos relacionados aos efeitos da Hcy e do ácido fólico sobre uma série de parâmetros bioquímicos e comportamentais, este estudo deixa como perspectivas:

1. O doseamento, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, dos níveis plasmáticos e cerebrais de Hcy e de ácido fólico após indução da hiperhomocisteinemia e concomitante tratamento com ácido fólico em ratos.
2. A investigação do efeito do tratamento crônico com ácido fólico sobre o prejuízo na memória provocado pela hiperhomocisteinemia crônica em ratos.
3. A avaliação do efeito do ácido fólico sobre as possíveis alterações no metabolismo energético (succinato desidrogenase e citocromo c oxidase) em córtex parietal de ratos submetidos ao tratamento crônico com Hcy.
4. A avaliação do efeito do ácido fólico sobre as possíveis alterações causadas pela hiperhomocisteinemia crônica sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, denominados frequência de micronúcleos em linfócitos de ratos, TBARS, potencial antioxidante total não-enzimático, reatividade antioxidante total e conteúdo total de grupos tióis em córtex parietal de ratos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achón, M.; Alonso-Aperte, E.; Reyes, L.; Úbeda, N.; Varela-Moreiras, G. (2000). High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br. J. Nutr.* 83:177-183.
- Álvarez-Maqueda, M.; Bekay, R.E.; Monteseirín, J.; Gonzalo, A.; Chacón, P.; Veja, A.; Santa María, C.; Tejedó, J.R.; Martín-Nieto, J.; Bedoya, F.J.; Pintado, E.; Sobrino, F. (2004). Homocysteine enhances superoxide anion release and NADPH oxidase assembly by human neutrophils. Effects on MAPK activation and neutrophil migration. *Atherosclerosis.* 172:229-238.
- 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⁺,K⁺-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. *Neurochem. Res.* 24:1101-1106.
- Benzi, G.; Moretti, A. (1998). Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur. J. Pharmacol.* 346:1-13.
- Bottiglieri, T. (2005). Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 29:1103-1112.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brosnan, J.T.; Jacobs, R.L.; Stead, L.M.; Brosnan, M.E. (2004). Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim. Pol.* 51:405-413.

- 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.
- Chakraborty, H.; Sen, P.; Sur, A.; Chatterjee, U.; Chakrabarti, S. (2003). Age-related oxidative inactivation of Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 38:705-710.
- Chan, K.M.; Delfer, D.; Junger, K.D. (1986). A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157:375-380.
- 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.
- Culcasi, M.; Lafon-Cazal, M.; Pietri, S.; Bockaert, J. (1994). Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J. Biol. Chem.* 269:12589-12593.
- Darley-Usmar, V.; Wiseman, H.; Halliwell, B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters.* 369:131-135.
- Darvesh, S.; Hopkins, D.A.; Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:131-138.
- Das, U.N. (2003). Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition.* 19:686-692.
- Dayal, S.; Arning, E.; Bottiglieri, T.; Boger, R.H.; Sigmund, C.D.; Faraci, F.M.; Lentz, S.R. (2004). Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke.* 35:1957-1962.
- De Franchis, R.; Sperandeo, M.P.; Sebatio, G.; Andria, G. (The Italian Collaborative Study Group on Homocystinuria). (1998). Clinical aspects of cystathionine β-synthase deficiency: how wide is the spectrum? *Eur. J. Pediatr.* 157:S67-S70.

- Den Heijer, T.; Vermeer, S.E.; Clarke, R.; Oudkerk, M.; Koudstaal, P.J.; Hofman, A.; Breteler, M.M.B. (2003). Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-dement elderly. *Brain*. 126:170-175.
- Devlin, T.M. (2003). Membranas biológicas: estrutura e transporte em membranas. In: Manual de bioquímica com correlações clínicas. Estados Unidos da América: editora Edgard Blücher LTDA. Tradução da 5ª edição americana. 462-463.
- Dobrota, D.; Matejovicova, M.; Kurrela, E.G.; Boldyrev, A.A. (1999). Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19:141-149.
- Doshi, S.N.; McDowell, I.F.W.; Moat, S.J.; Lang, D.; Newcombe, R.G.; Kredan, M.B.; Lewis, M.J.; Goodfellow, J. (2001). Folate improves endothelial function in coronary artery disease. An effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1196-1202.
- 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. *Journal of Neurochemistry.* 80:101-110.
- Dudzinski, D.M.; Igarashi, J.; Greif, D.; Michel, T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:235-276. *in press.*
- Durand, P.; Prost, M.; Loreau, N.; Lussier-Cacan, S.; Blache, D. (2001). Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab. Invest.* 81: 645-672.
- Duthie, S.J.; Grant, G.; Narayanan, S. (2000). Increased uracil misincorporation in lymphocytes from folate-deficient rats. *Br. J. Cancer.* 83:1532-1537.
- Dwyer, B.E.; Raina, A.K.; Perry, G.; Smith, M.A. (2004). Homocysteine and Alzheimer's disease: a modifiable risk? *Free Radic. Biol. Med.* 36:1471-1475.

- Endres, M.; Ahmadi, M.; Kruman, I.; Biniszkievicz, D.; Meisel, A.; Gertz, A. (2005). Folate Deficiency Increases Postischemic Brain Injury. *Stroke*. 36:321-325.
- Erecinska, M.; Silver, I.A. (1994). Silver, ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 16:37-71.
- Erecinska, M.; Cherian, S.; Silver, I.A. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog. Neurobiol.* 73:397-445.
- Faraci, F.M.; Lentz, S.R. (2004). Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke*. 35:345-347.
- Fenech, M. (2001). The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Res.* 475:57-67.
- Fenech, M. (2002). Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). *Food Chem. Toxicol.* 40:1113-1117.
- Finglas, P.M.; Wright, A.J.A.; Wolfe, C.A.; Hart, D.J.; Wright, D.M.; Dainty, J.R. (2003). Is there more to folates than neural-tube defects? *Pro. Nutr. Soc.* 62:591-598.
- Finkelstein, J.D. (1998). The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr.* 157:S40-S44.
- Fowler, B. (1997). Disorders of homocysteine metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 20:270-285.
- Fowler, B.; Jakobs, C. (1998). Post- and prenatal diagnostic methods for the homocystinurias. *Eur. J. Pediatr.* 157:S88-S93.
- Garcia, A.; Zanibbi, K. (2004). Homocysteine and cognitive functions in elderly people. *CMAJ.* 171:897-904.
- Gbadegesin, M.; Vicini, S.; Hewett, S.J.; Wink, D.A.; Espey, M.; Pluta, R.M.; Colton, C.A. (1999). Hypoxia modulates nitric oxide-induced regulation of NMDA receptor currents and neuronal cell death. *Am. J. Physiol.* 277:C673-C683.

- Graham, I.M.; O'Callaghan, P. (2002). Symposium: vitamin therapy and ischemic heart disease. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 16:383-389.
- Grieve, A.; Butcher, S.P.; Griffiths, R. (1992). Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *J. Neurosci. Res.* 32:60-68.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3^a edição. New York: Oxford University Press.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18: 685-716.
- Halliwell, B.; Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142:231-255.
- Hansen, O.; Clausen, T. (1988). Quantitative determination of Na⁺-K⁺-ATPase and other sarcolemmal components in muscle cells. *Am. J. Physiol.* 254:C1-C7.
- Hattori, N.; Kitagawa, K.; Higashida, T.; Yagyu, K.; Shimohama, S.; Wataya, T.; Perry, G.; Smith, M.A.; Inagaki, C. (1998). Cl⁻-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* 254:141-144.
- Ho, P.I.; Ortiz, D.; Rogers, E.; Shea, T. B. (2002). Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J. Neurosci. Res.* 70:694-702.
- Ho, P.I.; Ashline, D.; Dhitavat, S.; Ortiz, D.; Collins, S.C.; Shea, T.B.; Rogers, E. (2003). Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol. Dis.* 14:32-42.

- Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. (1998). Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 316:894-898.
- 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.; Medina, J.H.; Vianna, M.R.M.; Izquierdo, L.A.; Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* 103:1-11.
- Jara-Prado, A.; Ortega-Vazquez, A.; Martinez-Ruano, L.; Rios, C.; Santamaría, A. (2003). Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotox. Res.* 5:237-243.
- Jones, D.H.; Matus, A.I. (1974). Isolation of plasma synaptic membrane from brain by combination flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta.* 356:276-287.
- Jorgensen, P.L.; Hakansson, K.O.; Karlsh, S.J.D. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65:817-849.
- Kaplan, J.H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71:511-535.
- 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.
- Kim, Y.I., (1999). Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J. Nutr. Biochem.* 10:66-88.

- Kim, J.; Lee, H.; Chang, N. (2002). Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. *J. Nutr.* 132:3418-3421.
- Koning, A.B.L.; Werstuck, G.H.; Zhou, J.; Austin, R.C. (2003). Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin. Biochem.* 36:431-441.
- 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.
- Kruman, I.I.; Kumaravel, T.S.; Lohani, A.; Pedersen, W.A.; Cutler, R.G.; Kruman, Y.; Haughey, N.; Lee, J.; Evans, M.; Mattson, M.P. (2002). Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22:1752-1762.
- Kubova, H.; Folbergrova, 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.; Müller, T. (1998). Hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 245:811-812.
- Kurella, E.G.; Tyulina, O.V.; Boldyrev, A.A. (1999). Oxidative resistance of Na/K-ATPase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19:133-140.
- Lalonde, R.; Joyal, C.C.; Botez, M.I. (1993). Effects of folic acid and folinic acid on cognitive and motor behaviors in 20-month-old rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:703-707.
- Lamers, Y.; Prinz-Langenohl, R.; Moser, R.; Pietrzik, K. (2004). Supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate or folic acid equally reduces plasma total homocysteine concentrations in healthy women. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:473-478.

- Lees, G.J. (1993). Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience*. 54:287-322.
- 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.* 94:5923-5928.
- Loscalzo, J. (1996). The oxidative stress of hyperhomocysteinemia. *J. Clin. Invest.* 98:5-7.
- Loscalzo, J. (2002). Homocysteine and dementias. *N. Engl. J. Med.* 346:466-468.
- Mack, A.; Robitzki, A. (2000). The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5' butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog. Neurobiol.* 60:607-628.
- Matté, C.; Monteiro, S.C.; Calcagnotto, T.; Bavaresco, C.S.; Netto, C.A.; Wyse, A.T.S. (2004). In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na⁺, K⁺-ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22:185-190.
- Mattson, M.P.; Kruman, I.I.; Duan, W. (2002). Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res. Rev.* 1:95-111.
- Mattson, M.P.; Shea, T.B. (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 26:137-146.
- Moat, S.J.; Lang, D.; McDowell, I.F.W.; Clarke, Z.L.; Madhavan, A.K.; Lewis, M.J.; Goodfellow, J. (2004). Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 15:64-79.

- Morel, P.; Tallineau, C.; Pontcharraud, R.; Piriou, A.; Huguet, F. (1999). Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem. Int.* 33:531-540.
- Morris, M.S. (2003). Homocysteine and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2:425-428.
- 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 β-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Gen.* 37:1-31.
- 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^a edição. New York: McGraw-Hill. 1279-1327.
- Mudd, S.H.; Braverman, N.; Pomper, M.; Tezcan, K.; Kronick, J.; Jayakar, P.; Garganta, C.; Ampola, M.G.; Levy, H.L.; McCandless, S.E.; Wiltse, H.; Stabler, S.P.; Allen, R.H.; Wagner, C. Borschel, M.W. (2003). Infantile hypermethioninemia and hyperhomocysteinemia due to high methionine intake: a diagnostic trap. *Mol. Genet. Metab.* 79:6-16.
- Nelson, E.J.; Connolly, J.; McArthur, P. (2003). Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol. Cell.* 95:3-8.
- Oikawa, S.; Murakami, K.; Kawanishi, S. (2003). Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene.* 22:3530-3538.
- Perna, A.F.; Ingrosso, D.; De Santo, N.G. (2003). Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids.* 25:409-417.
- Pintó, X.; Vilaseca, M.A.; Balcells, S.; Artuch, R.; Corbella, E.; Meco, J.F.; Vila, R.; Pujol, R.; Grinberg, D. (2005). A folate-rich diet is as effective as folic acid from

- supplements in decreasing plasma homocysteine concentrations. *Int. J. Med. Sci.* 2:58-63.
- Quadri, P.; Fragiaco, C.; Pezzati, R.; Zanda, E.; Forloni, G.; Tettamanti, M.; Lucca, U. (2004). Homocysteine, folate and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease and vascular dementia. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:114-122.
- Radi, R.; Beckman, J.S.; Bush, K.M.; Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* 266:4244-4250.
- Rauchová, H.; Drahoš, Z.; Koudelová, J. (1999). The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na^+/K^+ -ATPase activity. *Physiol. Res.* 48:73-78.
- Regland, B.; Johansson, B.V.; Grenfeldt, B.; Hjelmgren, L.T.; Medhus, M. (1995). Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 100:165-169.
- Reis, E.A.; Zugno, A.I.; Franzon, R.; Tagliari, B.; Matté, C.; Lamers, 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.
- Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B.A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 269:26066-26075.
- Rytlewicz, A.; Simpson, J.A.; Taylor, R.J.; Bond, C.M.; Golden, M.H.N. (2002). The effect of folic acid supplementation on plasma homocysteine in an elderly population. *Q. J. Med.* 95:27-35.

- Sachdev, P.S. (2005). Homocysteine and brain atrophy. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 29:1152-1161.
- Salvador, M.; Henriques, J.A.P. (2004). *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. 1ª edição. Canoas, RS: editora da Ulbra.
- Sato, T.; Kamata, Y.; Irifune, M.; Nishikawa, T. (1997). Inhibitory Effect of Several Nitric Oxide-Generating Compounds on Purified Na⁺,K⁺-ATPase Activity from Porcine Cerebral Cortex. *J. Neurochem*. 68:1312-1318.
- Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. eds. (2001). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8ª edição. New York: McGraw-Hill.
- Seshadri, S.; Beiser, A.; Selhub, J.; Jacques, P.F.; Rosenberg, I.H.; D'Angostino, R.B.; Wilson, P.W.F.; Wolf, P.F. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*. 346:476-483.
- Sirotnak, F.M.; Tolner, B. (1999). Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annu. Rev. Nutr*. 19:91-122.
- Stefanello, F.M.; Zugno, A.I.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2003). Homocysteine inhibits butyrylcholinesterase activity in rat serum. *Metab. Brain Dis*. 18:187-194.
- Stefanello, F.M.; Franzon, R.; Tagliari, B.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2005a). Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocysteinemia. *Metab. Brain Dis*. 20:97-103.
- Stefanello, F.M.; Chiarani, F.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2005b). Methionine alters Na(+),K(+)-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci*. 23:651-656.
- Streck, E.L.; Zugno, A.I.; Tagliari, B.; Franzon, R.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2001). Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by

- homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem. Res.* 26:1195-1200.
- Streck, E.L.; Matté, C.; Vieira, P.S.; Rombaldi, F.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2002a). Reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochem. Res.* 27:1585-1590.
- Streck, E.L.; Zugno, A.I.; Tagliari, B.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2002b). Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Metab. Brain Dis.* 17:83-91.
- Streck, E.L.; Zugno, A.I.; Tagliari, B.; Sarkis, J.J.F.; Wajner, M.; Wannmacher, C.M.D.; Wyse, A.T.S. (2002c). On the mechanism of the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity caused by homocysteine. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 20:77-81.
- Streck, E.L.; Vieira, P.S.; Wannmacher, C.M.D.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2003a). In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab. Brain Dis.* 18:147-154.
- Streck, E.L.; Matté, C.; Vieira, P.S.; Calcagnotto, T.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2003b). Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 1637:187-192.
- Streck, E.L.; Bavaresco, C.S.; Netto, C.A.; Wyse, A.T.S. (2004). Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav. Brain Res.* 153:377-381.
- Suh, J.R.; Herbig, A.K.; Stover, P.J. (2001). New perspectives on folate catabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 21:255-282.

- Susser, E.; Brown, A.S.; Klonowski, E.; Allen, R.H.; Lindenbaum, J. (1998). Schizophrenia and Impaired Homocysteine Metabolism: A Possible Association. *Biol. Psychiatry*. 44:141-143.
- Szabó, C. (1996). DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 21:855-869.
- Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, Y.F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:206-221.
- Tjiattas, L.; Ortiz, D.O.; Dhivant, S.; Mitton, K.; Rogers, E.; Shea, T.B. (2004). Folate deficiency and homocysteine induce toxicity in cultured dorsal root ganglion neurons via cytosolic calcium accumulation. *Aging Cell*. 3:71-76.
- Topal, G.; Brunet, A.; Millanvoye, E.; Boucher, J.; Rendu, F.; Devynck, M.; David-dufilho, M. (2004). Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. *Free Radic. Biol. Med.* 36:1532-1541.
- Vasilets, L.A.; Schwarz, W. (1993). Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1154:201-222.
- Verhaar, M.C.; Stroes, E.; Rabelink, T.J. (2002). Folates and Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:6-13.
- Walter, J.H.; Wraith, J.E.; White, F.J.; Bridge, C.; Till, J. (1998). Strategies for the treatment of cystathionine β-synthase deficiency: the experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. *Eur. J. Pediatr.* 157:S71-S76.
- Wang, X.Q.; Xiao, A.Y.; Sheline, C.; Hyrc, K.; Yang, A.; Goldberg, M.P.; Choi, D.W.; Yu, S.P. (2003). Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of

- neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J. Cell Sci.* 116:2099-2110.
- Welch, G.N.; Loscalzo, J. (1998). Homocysteine and atherothrombosis. *N. Eng. J. Med.* 338:1042-1050.
- Wyse, A.T.S.; Brusque, A.M.; Silva, C.G.; Streck, E.L.; Wajner, M.; Wannmacher, C.M.D. (1998). Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport.* 9:1719-1721.
- Wyse, A.T.S.; Streck, E.L.; Worm, P.; Wajner, A.; Ritter, F.; Netto, C.A. (2000). Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 25:969-973.
- Wyse, A.T.S.; Zugno, A.I.; Streck, E.L.; Matté, C.; Calcagnotto, T.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M. (2002). Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem. Res.* 27:1685-1689.
- Zhang, X.; Li, H.; Jin, H.; Ebin, Z.; Brodsky, S.; Goligorsky, M.S. (2000). Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 279:F671-F678.
- Zieminska, E.; Stafiej, A.; Łazarewicz, J.W. (2003). Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem. Int.* 43:481-492.