

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
LABORATÓRIO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO E FUNÇÃO CARDIOVASCULAR
EM DIFERENTES MODELOS DE HIPERHOMOCISTEINEMIA: PAPEL
PROTETOR DO FOLATO E DO ESTROGÊNIO**

JAQUELINE BARP

ORIENTADORA: DRA. ADRIANE BELLÓ-KLEIN

PORTO ALEGRE, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
LABORATÓRIO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR

**AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO E FUNÇÃO CARDIOVASCULAR
EM DIFERENTES MODELOS DE HIPERHOMOCISTEINEMIA: PAPEL
PROTETOR DO FOLATO E DO ESTROGÊNIO**

JAQUELINE BARP

ORIENTADORA: DRA. ADRIANE BELLÓ-KLEIN

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA, DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICA DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR.

PORTO ALEGRE, 2007

"A VIDA É UMA PEÇA DE TEATRO QUE NÃO PERMITE
ENSAIOS...

POR ISSO, CANTE, RIA, DANCE, CHORE, AME E VIVA
INTENSAMENTE CADA MOMENTO DA SUA VIDA...

...ANTES QUE A CORTINA SE FECHÉ E A PEÇA TERMINE
SEM APLAUSOS."

CHARLES CHAPLIN

DEDICO ESTE TRABALHO A MINHA FILHA,
BIANCA, A MAIOR E MELHOR REALIZAÇÃO DA
MINHA VIDA, POR TORNAR TODOS OS DIAS
MUITO MAIS COLORIDOS.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Adriane Belló Klein, pela orientação, pelo carinho, pela paciência, pela atenção e por toda sua confiança em mim e no meu trabalho;

À Prof^a Ângela Wyse, pela colaboração nos protocolos utilizados neste trabalho;

À Tânia, por estar sempre disposta e pronta para ajudar, e que muito me ajudou na realização dos experimentos;

Aos colegas Paulo e Rafael pela grande ajuda, e companhia, nos finais de tarde no laboratório fazendo o registro dos animais;

Às colegas da bioquímica Siomara e Cristiane pela colaboração no tratamento dos animais;

Às colegas e amigas Helena, Roberta e a Júlia pela grande colaboração na realização dos experimentos.

À minha colega e amiga Patrícia Bianchi, pelos finais de semana no laboratório, pelas jantãs no Bourbon, pela companhia e ajuda nos experimentos.

A todos os amigos e colegas (e ex-colegas) do laboratório pelos momentos de descontração, conversas, cafezinhos, enfim por tornarem os dias mais agradáveis e menos cansativos;

Às minhas grandes amigas Lucila e Maristela por todos os bons momentos e o apoio sempre que necessário;

À minha família, em especial a minha mãe, por todo o apoio e amor que sempre me dedicou;

À minha sogra, por emprestar a casa e cuidar da Bianca para que eu pudesse terminar o doutorado;

Ao meu marido, Eduardo, pelo apoio, paciência e ajuda, o meu amor e o mais sincero agradecimento por tudo que já passamos juntos;

Por fim, gostaria de agradecer ao PPG - Fisiologia, à UFRGS e ao CNPq por todo apoio e infra-estrutura para o desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INDÍCE DE REAÇÕES..... | 9 |
| INDÍCE DE FIGURAS | 10 |
| INDÍCE DE TABELAS | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 13 |
| ABSTRACT..... | 14 |
| RESUMO..... | 16 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 1.1 ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO | 18 |
| 1.1.1 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO | 20 |
| 1.1.2 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE..... | 22 |
| 1.2 ESTROGÊNIOS | 25 |
| 1.2.1 ESTROGÊNIOS COMO ANTIOXIDANTES | 26 |
| 1.2.2 EFEITOS DOS ESTROGÊNIOS SOBRE DOENÇAS CARDÍACAS..... | 27 |
| 1.2.3 ÓXIDO NÍTRICO E ESTROGÊNIO..... | 30 |
| 1.3 HOMOCISTEÍNA | 31 |
| 2. HIPÓTESE | 38 |
| 3. OBJETIVO GERAL | 38 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 38 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 40 |
| 4.1 ANIMAIS | 40 |
| 4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS | 40 |
| 4.3 COLETA DE SANGUE | 43 |
| 4.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS..... | 43 |
| 4.5 CASTRAÇÃO (OVARECTOMIA) | 44 |
| 4.6 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL..... | 44 |
| 4.6.1 CANULAÇÃO ARTERIAL..... | 44 |
| 4.6.2 REGISTRO E PROCESSAMENTO DE SINAL | 45 |
| 4.6.3 REGISTRO DAS PRESSÕES VENTRICULARES ESQUERDAS..... | 46 |
| 4.7 DOSAGEM HORMONAL | 47 |
| 4.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS | 48 |
| 4.9 ANÁLISE DE NITRITOS+NITRATOS (NOX) | 48 |
| 4.10 QUIMILUMINESCÊNCIA (QL) | 48 |
| 4.11 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) | 49 |
| 4.12 ANÁLISE DE CARBONILAS | 50 |
| 4.13 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP) | 50 |
| 4.14 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)..... | 51 |
| 4.15 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)..... | 52 |
| 4.16 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)..... | 53 |
| 4.17 CATALASE (CAT)..... | 53 |
| 4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 54 |

| | |
|--------------------------|-----|
| 5. RESULTADOS | 55 |
| 5.1 EXPERIMENTO 1: | 55 |
| 5.2 EXPERIMENTO 2: | 58 |
| 5.3 EXPERIMENTO 3: | 62 |
| 5.3.1 CORAÇÃO: | 65 |
| 5.3.2 AORTA: | 73 |
| 5.3.3 ERITRÓCITOS: | 74 |
| 5.4 EXPERIMENTO 4: | 78 |
| 5.4.1 CORAÇÃO: | 80 |
| 5.4.2 FÍGADO: | 89 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 97 |
| 6.1 EXPERIMENTO 1: | 97 |
| 6.2 EXPERIMENTO 2 | 99 |
| 6.3 EXPERIMENTO 3 | 101 |
| 6.4 EXPERIMENTO 4 | 108 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 114 |
| 8. REFERÊNCIAS | 115 |
| ANEXO 1 - ARTIGO..... | 131 |

ÍNDICE DE REAÇÕES

| | |
|---|----|
| Reação 1: Formação das EAO, a partir da redução do O ₂ | 19 |
| Reação 2: Reação de Fenton..... | 20 |
| Reação 3: Reação de Haber – Weiss | 20 |
| Reação 4: Dismutação do radical superóxido pela SOD..... | 22 |
| Reação 5: Decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase..... | 23 |
| Reação 6: Redução de hidroperóxidos (ROOH) pela glutatina peroxidase (GPx), formando glutatona oxidada (GSSG) e regeneração da glutatona reduzida (GSH) pela glutatona redutase (GR). | 23 |
| Reação 7: Exemplo de reação de detoxificação do cloro dinitrobenzeno (CDNB) através da glutatona S-transferase (GST)..... | 24 |
| Reação 8: Reação de redução de dissulfetos de glutatona e peróxido de hidrogênio através do sistema tiorredoxina..... | 25 |
| Reação 9: Exemplo de reação global de oxidação | 35 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: A -Estrutura do 17 β -estradiol. B -Ciclo antioxidante do 17 β -estradiol . | 27 |
| Figura 2: A -Formação da Hcy. B -Mecanismo de geração de EAO pela Hcy | 33 |
| Figura 3: Lipoperoxidação avaliada por quimiluminescência em homogeneizado cardíaco. | 56 |
| Figura 4: Atividade da Catalase em homogeneizado cardíaco. | 56 |
| Figura 5: Atividade da SOD em homogeneizado cardíaco..... | 57 |
| Figura 6: Atividade da GST em homogeneizado cardíaco..... | 57 |
| Figura 7: Lipoperoxidação avaliada por TBARS em homogeneizado cardíaco. ... | 59 |
| Figura 8: Análise de carbonilas em homogeneizado cardíaco | 59 |
| Figura 9: Atividade da catalase em homogeneizado cardíaco | 60 |
| Figura 10: Correlação entre TBARS e atividade da catalase homogeneizado cardíaco | 61 |
| Figura 11: Atividade da SOD em homogeneizado cardíaco..... | 61 |
| Figura 12: Atividade da GST em homogeneizado cardíaco | 62 |
| Figura 13: Dosagem de 17 β -estradiol em plasma..... | 64 |
| Figura 14: Nitratos+Nitritos em homogeneizado cardíaco..... | 65 |
| Figura 15: Correlação entre os níveis de NOx e pressão arterial média em homogeneizado cardíaco..... | 66 |
| Figura 16: Lipoperoxidação avaliada por quimiluminescência em homogeneizado cardíaco | 67 |
| Figura 17: Correlação entre quimiluminescência e pressão arterial média em homogeneizado cardíaco..... | 68 |
| Figura 18: Análise de carbonilas em homogeneizado cardíaco | 69 |
| Figura 19: Análise do TRAP em homogeneizado cardíaco..... | 70 |
| Figura 20: Atividade da GST em homogeneizado cardíaco | 70 |
| Figura 21: Correlação entre quimiluminescência e a atividade da GST em homogeneizado cardíaco..... | 71 |
| Figura 22: Atividade da GPx em homogeneizado cardíaco | 72 |
| Figura 23: Atividade da GST em homogeneizado de aorta..... | 73 |
| Figura 24: Atividade da GPx em homogeneizado de aorta..... | 74 |
| Figura 25: Nitratos+Nitritos em plasma | 75 |

| | |
|--|-----|
| Figura 26: Lipoperoxidação avaliada por quimiluminescência em eritrócito..... | 76 |
| Figura 27: Atividade da GST em eritrócito | 77 |
| Figura 28: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) | 79 |
| Figura 29: Nitratos+Nitritos em homogeneizado cardíaco..... | 80 |
| Figura 30: Correlação entre PDFVE e a NOx em homogeneizado cardíaco..... | 81 |
| Figura 31: Lipoperoxidação avaliada por TBARS em homogeneizado cardíaco . | 82 |
| Figura 32: Correlação entre TBARS e PDFVE em homogeneizado cardíaco..... | 83 |
| Figura 33: Análise de carbonilas em homogeneizado cardíaco | 84 |
| Figura 34: Atividade da GST em homogeneizado cardíaco | 85 |
| Figura 35: Atividade da GPx em homogeneizado cardíaco | 86 |
| Figura 36: Correlação entre TBARS e a atividade da GPx em homogeneizado cardíaco | 87 |
| Figura 37: Atividade da SOD em homogeneizado cardíaco..... | 88 |
| Figura 38: Atividade da catalase em homogeneizado cardíaco | 889 |
| Figura 39: Nitratos+Nitritos em homogeneizado hepático..... | 90 |
| Figura 40: Lipoperoxidação avaliada por TBARS em homogeneizado hepático . | 91 |
| Figura 41: Análise de carbonilas em homogeneizado hepático | 92 |
| Figura 42: Atividade da GST em homogeneizado hepático | 93 |
| Figura 43: Atividade da GPx em homogeneizado hepático..... | 94 |
| Figura 44: Atividade da SOD em homogeneizado hepático | 95 |
| Figura 45: Atividade da catalase em homogeneizado hepático | 96 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm)..... | 64 |
| Tabela 2: Enzimas SOD e Catalase em homogeneizado cardíaco..... | 72 |
| Tabela 3: Enzimas SOD e Catalase em sangue | 77 |
| Tabela 4: PDFVE (mmHg), PSVE (mmHg), +dP/dt (mmHg/s), -dP/dt (mmHg/s), FC (bpm) e HC (mg/g) | 79 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenosina trifosfato
CAT - catalase
DNA – ácido desoxirribonucléico
+dP/dt - derivada positiva
-dP/dt - derivada negativa
EAN – espécies ativas de nitrogênio
EAO - espécies ativas de oxigênio
EO – estresse oxidativo
FC - frequência cardíaca
GABA – ácido γ -aminobutírico
GPx - glutaciona peroxidase
GR - glutaciona redutase
GSH - glutaciona reduzida
GSSG - glutaciona oxidada
GST - glutaciona S-transferase
Hcy – homocisteína
HHcy –hiperhomocisteinemia
LDL - lipoproteínas de baixa densidade
LPO - lipoperoxidação
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO - óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
NOx – metabólitos do NO
PAM - pressão arterial média
PDFVE - pressão diastólica final no ventrículo esquerdo
PSVE - pressão sistólica ventrículo esquerdo
QL - quimiluminescência
RL – radicais livres
SOD - superóxido dismutase
TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP - capacidade antioxidante total
TrxR - tioredoxina redutase

ABSTRACT

It is known that high concentrations of homocysteine (Hcy) are associated with the increase of risk of cardiovascular disease and of cellular damage caused by the formation of reactive oxygen species (ROS). It is also known that the estrogen acts as a non enzymatic antioxidant involved in cardiovascular protection. In this work we evaluated the effect of homocystinuria on myocardial oxidative stress parameters, and the effect of hyperhomocysteinemia (HHcy) on the same parameters and also on hemodynamics in rats with and without estrogen.

Four experiments were performed. In experiment number one, sixteen animals were divided in 2 groups (n=8/group): control and Hcy. These animals received chronic treatment from the 6th to the 28th day of life with increasing doses of Hcy and were killed one hour after the last dose. In the second experiment, thirty rats were divided into four groups: Saline (n=8); Folate (n=6); Hcy (n=9) and Folate+Hcy (n=7). These animals had received folic acid and/or Hcy from the 6th to the 28th day of life and had been killed with 80 days of life. In the third experiment, forty eight animals were divided in 6 groups (n=8/group): NAIVE; NAIVE+Hcy; Sham; Sham+Hcy; castrated and castrated+Hcy. These animals were castrated in the 50th day of life and, after one week, they received an acute treatment with Hcy for 72 hours at each eight hours and were killed one hour after the last dose. In the fourth experiment, thirty two animals were divided into four groups (n=8/group): control, castrated, methionine and castrated+methionine. These animals had been castrated in the 70th day of life, and received methionine in drinking water for 30 days and were killed at the end of treatment.

In the homocystinuria model (experiment number one), there were no signs of alterations in lipid peroxidation (LPO) in 28 day rats. However, antioxidant enzyme activities of SOD and GST were increased in Hcy group. As this is a chronic treatment, probably these enzymes are increased to minimize the oxidative damage caused by Hcy. In the second experiment, the effect of the homocystinuria was evaluated in animals with 80 days. It was observed an increase in LPO in the animals that had received Hcy, but it returned to control values with folate administration. The reduction of LPO in the presence of folate confirms its capacity of minimize the damage caused by Hcy. We also observed

reduction in the enzyme activities of GST and catalase in the animals receiving Hcy, which also returned to the control values with the administration of folate. It is possible that Hcy increases the hydrogen peroxide concentration in the myocardium of these animals. From the results obtained, we can suggest that the levels of Hcy can be reduced with folate, since high doses of folate had significantly reduced the levels of oxidative stress caused by Hcy. In the acute model of HHcy (experiment number three), myocardial oxidative stress increased due to the administration of Hcy in the group without estrogen. This result has a positive correlation with mean arterial pressure (MAP), that is, the higher LPO, the higher MAP. This effect was not observed in groups with physiological estrogen levels. It is possible that these findings are related to the antioxidant protection offered by estrogen. Moreover, we observed a reduction in the activity of GST in the group castrated+Hcy, which can be contributing for the oxidative damage observed. In the HHcy model caused by the consumption of methionine (experiment number four), we observed an increase in LVEDP in group castrated+methionine. This result has a negative correlation with the nitric oxide metabolites (Nox) showing that the animals that had an increased ventricular diastolic pressure had presented lesser NO bioavailability. In this model we also observed an increase in the myocardial oxidative stress due to the administration of methionine in the group without estrogen. This result has a positive correlation with LVEDP, that is, the animals with enhanced LPO also presented high ventricular diastolic pressure, indicating a possible participation of oxidative stress in ventricular dysfunction. These animals also presented an increase in the activities of GST and GPx in group castrated+methionine, suggesting that chronic treatment with methionine leads to an adaptation of the enzymatic antioxidant system in the absence of the estrogen.

KEY WORDS: homocysteine, estrogen, antioxidant enzymes, oxidative damage, methionine.

RESUMO

Sabe-se que concentrações elevadas de homocisteína (Hcy) estão associadas com o aumento do risco de doenças cardiovasculares e com o dano celular causado pela formação das espécies ativas de oxigênio (EAO). Sabe-se também que o estrogênio atua como antioxidante não enzimático envolvido na proteção cardiovascular. Foram objetivos deste trabalho avaliar o efeito da homocistinúria sobre parâmetros de estresse oxidativo em tecido cardíaco; e avaliar o efeito da hiperhomocisteinemia (HHcy) sobre parâmetros de estresse oxidativo e hemodinâmicos em ratas com e sem estrogênio.

Este trabalho foi dividido em 4 experimentos. No experimento 1 foram utilizados 16 animais divididos em 2 grupos (n= 8/grupo): controle e Hcy. Estes animais receberam tratamento crônico do 6° dia ao 28° dia de vida com doses crescentes de Hcy e foram mortos 1 hora após a última dose. No experimento 2 foram utilizados 30 ratos, divididos em 4 grupos: Salina (n=8); Folato (n=6); Hcy (n=9) e Folato+Hcy (n=7). Estes animais receberam ácido fólico e/ou Hcy do 6° ao 28° dias de vida e foram mortos aos 80 dias de vida. No experimento 3, foram utilizados 64 animais divididos em 6 grupos (n= 8/grupo): NAIVE; NAIVE+Hcy; Sham; Sham+Hcy; castrada e castrada+Hcy. Estes animais foram castrados no 50° dia de vida e, após uma semana, receberam tratamento agudo com Hcy de 8 em 8 horas por 72 horas e foram mortos 1 hora após a última dose. No experimento 4, foram utilizados 32 animais divididos em 4 grupos (n= 8/grupo): controle, castrado, metionina e castrado+metionina. Estes animais foram castrados no 70° dia de vida, receberam metionina na água de beber por 30 dias e foram mortos logo após o final do tratamento.

No modelo de homocistinúria (experimento 1), não foram observadas alterações na lipoperoxidação (LPO) cardíaca nos ratos com 28 dias. No entanto, as atividades das enzimas antioxidantes SOD e GST estavam aumentadas no grupo Hcy. Como este é um tratamento crônico, provavelmente estas enzimas estão aumentadas de forma a minimizar o dano oxidativo causado pela Hcy. Já no experimento 2, avaliou-se o efeito da Hhcy a longo prazo, em animais com 80 dias. Houve aumento na LPO dos animais tratados com Hcy que foi prevenida com a administração de folato. A redução da LPO na presença do folato confirma sua capacidade de minimizar o dano causado pela Hcy. Observamos ainda a

diminuição na atividade das enzimas GST e catalase nos animais tratados com Hcy o que resultaria em aumento da concentração de peróxido de hidrogênio no tecido cardíaco. O tratamento com folato previniu a atividade das enzimas antioxidantes. A partir dos resultados encontrados, podemos sugerir que os níveis de Hcy podem ser reduzidos com folato, uma vez que altas doses de folato reduziram consideravelmente os níveis de estresse oxidativo gerado pela Hcy. No modelo de HHcy aguda (experimento 3), o estresse oxidativo cardíaco aumentou em função da administração de Hcy no grupo sem estrogênio. Este resultado se correlaciona positivamente com a pressão arterial (PA), ou seja, os animais com maior LPO também apresentaram uma maior PA. Este efeito não foi observado nos grupos com níveis estrogênicos fisiológicos. Acredita-se que estes resultados sejam devidos à proteção antioxidante oferecida pelo estrogênio. Além disso, observamos uma diminuição na atividade da GST nos animais castrados+Hcy, o que pode estar contribuindo para o dano oxidativo observado. Já no modelo de HHcy causado pelo consumo de metionina (experimento 4), observamos um aumento na PDFVE no grupo castrado+metionina que se correlaciona negativamente com os metabólitos do NO. Este resultado mostra que os animais que tiveram disfunção ventricular apresentaram uma menor biodisponibilidade do NO. Neste modelo observamos também um aumento no dano oxidativo cardíaco em função da administração de metionina no grupo sem estrogênio. Este resultado se correlaciona positivamente com a PDFVE, ou seja, os animais com maior LPO também apresentam uma maior pressão ventricular diastólica, indicando uma possível participação do estresse oxidativo na disfunção ventricular. Estes animais ainda apresentaram um aumento na atividade das enzimas antioxidantes GST e GPx no grupo castrado+metionina, sugerindo que o tratamento crônico levou a uma adaptação do sistema antioxidante enzimático na ausência do estrogênio.

PALAVRAS-CHAVE: homocisteína, estrogênio, enzimas antioxidantes, dano oxidativo, metionina.

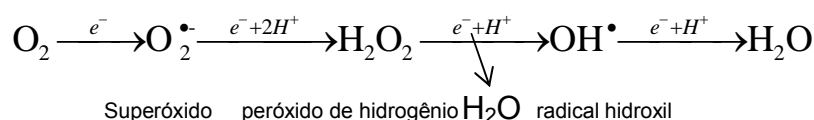
1. INTRODUÇÃO

O estrogênio endógeno está associado a um menor risco cardiovascular. Um dos mecanismos cardioprotetores envolvidos têm como base o seu papel como neutralizador de radicais livres e, por conseqüência, sua ação antioxidante. Sabendo da importância de estudar os efeitos deletérios das espécies ativas de oxigênio (EAO) iniciaremos abordando alguns conceitos básicos de estresse oxidativo (EO).

1.1 ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica. Dentre os quais, podemos destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para formação de ATP na mitocôndria. Em várias reações enzimáticas e não enzimáticas podem ser gerados compostos intermediários da redução parcial do oxigênio (O_2), sendo que podemos destacar: o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). A formação destas moléculas ocorre em aproximadamente 5% de todo processo de redução do oxigênio até água.



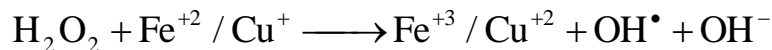
Reação 1: Formação das EAO, a partir da redução do O₂.

Cada EAO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida (Droge, 2002; Valko et al., 2007).

O ânion radical superóxido (O₂^{•-}) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio à água; a partir do mesmo serão formadas as demais EAO. A sua dismutação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (Valko et al., 2007). O peróxido de hidrogênio é o segundo intermediário do processo oxidativo, podendo ser produzido indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida da dismutação do ânion radical superóxido e/ou diretamente, pela redução divalente do oxigênio molecular. Apesar de não ser um radical livre, esta espécie ativa pode originar o radical hidroxil, o que seria bastante prejudicial à célula, além de ter a propriedade de ser muito permeável através das membranas biológicas (Halliwell & Gutteridge, 1999; Droge, 2002). O radical hidroxil (OH[•]), por sua vez, é um dos mais potentes oxidantes dos sistemas biológicos. Este radical livre possui a capacidade de atravessar as membranas e pode reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e DNA, apesar de seu curto tempo de meia vida, da ordem de 10⁻⁹ segundos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

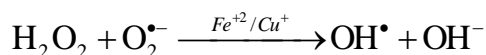
A mais reativa destas espécies, o radical hidroxil, é formada através de reações que necessitam a presença de íons metais de transição como o ferro e o cobre. A reação do peróxido de hidrogênio com íons ferroso ou cúprico é

chamada de reação de Fenton (1894) que leva à produção do radical hidroxil, altamente reativo (Reação 2).



Reação 2: Reação de Fenton

O radical hidroxil também pode ser formado a partir da reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio em presença de íons divalentes de metais de transição, reação descrita por Haber-Weiss em 1934 (Reação 3).



Reação 3: Reação de Haber – Weiss

1.1.1 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

O estresse oxidativo pode ser definido como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes, levando ao dano potencial” (Halliwell & Gutteridge, 1999). Além do estresse oxidativo (EO), há também o estresse nitrosativo, este gerado pelas espécies ativas do nitrogênio (EAN). O óxido nítrico (NO[•]) é, fisicamente, um radical livre (RL), considerando o elétron não pareado. Apesar de sua baixa reatividade, a difusão do NO é facilitada devida a sua carga neutra em soluções aquosas e sua alta lipossolubilidade (Bredt, 2003). Estas propriedades químicas do NO determinam importantes interações com vários tipos de enzimas e tornam este radical uma molécula potencialmente tóxica. O NO reage facilmente com o radical superóxido produzindo o peroxinitrito

(ONOO⁻). A reação do peroxinitrito com biomoléculas diminui suas funções, causando toxicidade e alterando vias de sinalização (Boveris, 1998; Tsikas, 2005).

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de: diminuição da atividade enzimática antioxidante, deficiência nutricional de antioxidantes ou outros constituintes dietéticos essenciais pela inadequada ingestão ou absorção dos nutrientes; ou produção aumentada de EAO e/ou EAN, pela exposição elevada ao O₂, a presença de toxinas, ou excessiva ativação de sistemas como as células fagocíticas nas doenças crônicas inflamatórias (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O estresse oxidativo pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. O principal alvo celular do estresse oxidativo pode variar dependendo da célula, do tipo de estresse imposto e da intensidade do estresse. O estresse oxidativo intenso pode produzir danos irreversíveis levando à morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Além de seu efeito citotóxico, as EAO também atuam como mensageiros em diferentes vias de sinalização intracelular. Um exemplo é a ativação do fator nuclear *kappa* B (NFκB) induzida pelo peróxido de hidrogênio e bloqueada por vários antioxidantes, incluindo a vitamina E (Murphy & Newsholme, 1999; Dourado et al., 2006).

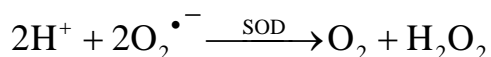
Um excesso de formação de radicais de nitrogênio é denominado estresse nitrosativo. Os radicais de nitrogênio (RNs) produzidos por um aumento da atividade da Óxido Nítrico Sintase (NOS), também podem contribuir para o desencadeamento de reações radicalares envolvidas na quebra da homeostase intracelular (Bredt, 2003).

1.1.2 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Os organismos aeróbios possuem sistemas de defesa para se protegerem contra os efeitos causados pelas EAO. Substâncias que neutralizam a ação dos RLs na fase de iniciação ou propagação da lipoperoxidação, levando à formação de produtos menos tóxicos, são chamadas de varredores (*scavengers*) como as enzimas antioxidantes e tocoferóis. Aquelas que atuam absorvendo a energia de excitação dos RLs, neutralizando-os, são chamadas de *quenchers* como os carotenóides e o ácido ascórbico. O sistema de defesa antioxidante é composto de elementos enzimáticos e não enzimáticos.

Dentre as defesas enzimáticas responsáveis pela detoxificação das EAO, salientam-se três enzimas: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx)(Sies, 1997).

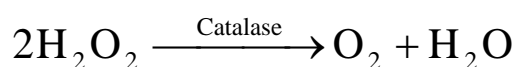
A superóxido dismutase (SOD) é a enzima que catalisa a dismutação de dois íons superóxido para formar peróxido de oxigênio (que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas) e oxigênio (Reação 4). Esta reação pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico, porém, com presença da SOD, a velocidade desta reação é 10^4 vezes maior (Fridovich, 1975; Yu, 1994; Halliwell & Gutteridge, 1999).



Reação 4: Dismutação do radical superóxido pela SOD

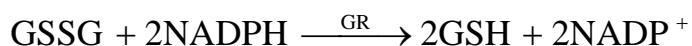
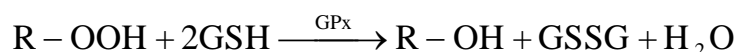
A geração de peróxido de hidrogênio foi demonstrada como um evento fisiológico diretamente relacionado ao consumo de oxigênio, sendo a catalase e

as peroxidases as enzimas que metabolizam este peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, impedindo assim a formação de radical hidroxil e conseqüente dano celular. A catalase (CAT) está presente em todos os tipos de células de mamíferos, porém ela é uma enzima altamente específica pois possui atividade apenas para peróxidos de hidrogênio, de etila e de metila (Reação 5) (Chance, 1979).



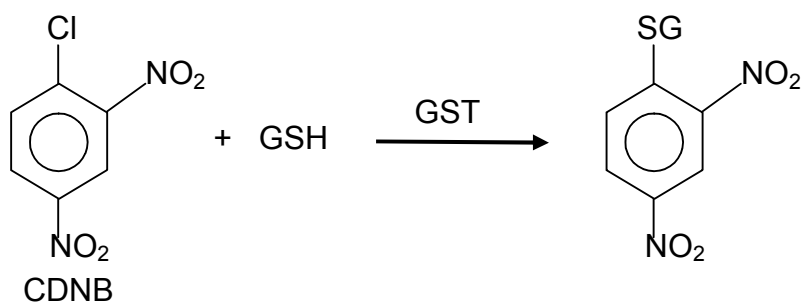
Reação 5: Decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase

Entre as peroxidases, a mais importante é a glutathiona peroxidase. A glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de vários peróxidos, principalmente do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (Yu, 1994). Para a redução dos peróxidos, esta enzima utiliza o grupamento sulfidril da glutathiona reduzida, que pode ser reciclada pela interação da forma oxidada com NADPH através da enzima glutathiona redutase (Reação 6). Os grupamentos sulfidril doam dois hidrogênios, formando uma ligação dissulfeto, que pode transformar a molécula de peróxido em um álcool (R-OH), ou, no caso do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em água (Halliwell & Gutteridge, 1999).



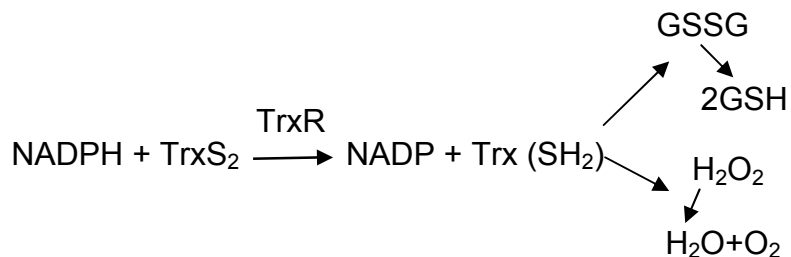
Reação 6: Redução de hidroperóxidos (ROOH) pela glutathiona peroxidase (GPx), formando glutathiona oxidada (GSSG) e regeneração da glutathiona reduzida (GSH) pela glutathiona redutase (GR).

Outra classe de enzimas que também têm um importante papel fisiológico na detoxificação são as glutathione S-transferases (GSTs). Estas enzimas agem na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. Como pode ser visto na reação 7, as GSTs catalisam a reação destes compostos com o grupamento -SH da glutathione, neutralizando assim seus sítios eletrofílicos e transformando-os em produtos hidrossolúveis, que são mais facilmente metabolizáveis (Habig, 1974).



Reação 7: Exemplo de reação de detoxificação do cloro dinitrobenzeno (CDNB) através da glutathione S-transferase (GST).

Mais recentemente, foi descrito outro sistema enzimático importante na defesa antioxidante, o sistema tioredoxina. Estas enzimas catalisam reduções, utilizando vários substratos. As tioredoxinas doam equivalentes redutores para proteínas, dissulfetos de glutathione, peróxido de hidrogênio, entre outros. Tornam-se oxidadas e são reduzidas pela tioredoxina redutase (TrxR). Esta, por sua vez, utiliza NADPH para reduzir pontes de dissulfeto da tioredoxina (Nordberg & Arner, 2001).



Reação 8: Exemplo de reação de redução de dissulfetos de glutathiona e peróxido de hidrogênio através do sistema tioredoxina. TrxS₂ – tioredoxina oxidada, Trx (SH₂) – tioredoxina reduzida, TrxR – tioredoxina redutase (adaptado de Kuntz et al., 2007).

Dentre os compostos não enzimáticos, destacam-se a vitamina E (α -tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico), o β -caroteno (precursor da vitamina A) e o tripeptídeo glutathiona. Cabe ainda salientar o poder antioxidante dos estrogênios, devido à presença do grupamento hidrofênolico (Yu, 1994; Ferreira, 1997; Singal et al., 2000).

1.2 ESTROGÊNIOS

Os estrogênios de ocorrência natural são o 17 β -estradiol, a estrona e o estriol, sendo o estradiol o hormônio mais potente e o produzido em maior quantidade e o estriol, o menos potente. A estrutura destes hormônios é formada, basicamente, de um núcleo esteroidal de dezoito carbonos (Figura 1) (Williams, 1996).

Os estrogênios, bem como os demais hormônios esteroidais, têm como mecanismo de ação clássico a regulação da transcrição gênica. Através da sua capacidade de atravessar as membranas celulares, ligam-se aos receptores nucleares formando um complexo que se liga ao DNA, estimulando a transcrição de alguns genes (Williams, 1996; Ganong, 1995). Mais recentemente, tem-se estudado mecanismos de ação não clássicos, ou de efeito rápido, onde os hormônios esteróides atuam na membrana plasmática. A ação na membrana pode se dar através de efeitos não específicos na sua fluidez ou de ligações em receptores de membrana específicos para hormônios esteróides (Wierman, 2007). Estudos já identificaram sítios de ligação para hormônios esteróides, com moderada atividade e alta especificidade. Outra ação na membrana pode ser por ligações com receptores de membrana de neurotransmissores, como o do GABA (Brann, 1995; Wierman, 2007).

1.2.1 ESTROGÊNIOS COMO ANTIOXIDANTES

Sabe-se que a estrutura das moléculas estrogênicas influencia bastante na sua atividade antioxidante, devido à presença de um grupamento hidrofênólico (Figura 1-A). O 17 β -estradiol, por exemplo, tem um potencial antioxidante bastante relevante, uma vez que esse hormônio esteróide pode interferir no processo de iniciação da LPO (Figura 1-B). Esta interferência se dá pela modificação na rota reacional da peroxidação, evitando assim a sua propagação e subsequente geração das EAO (Ayres et al., 1998; Wierman, 2007). O dano ao DNA também pode ser evitado por ação estrogênica, principalmente, pela inibição da produção do $O_2^{\bullet-}$ (Ayres et al., 1998; Strehlow et al., 2003).

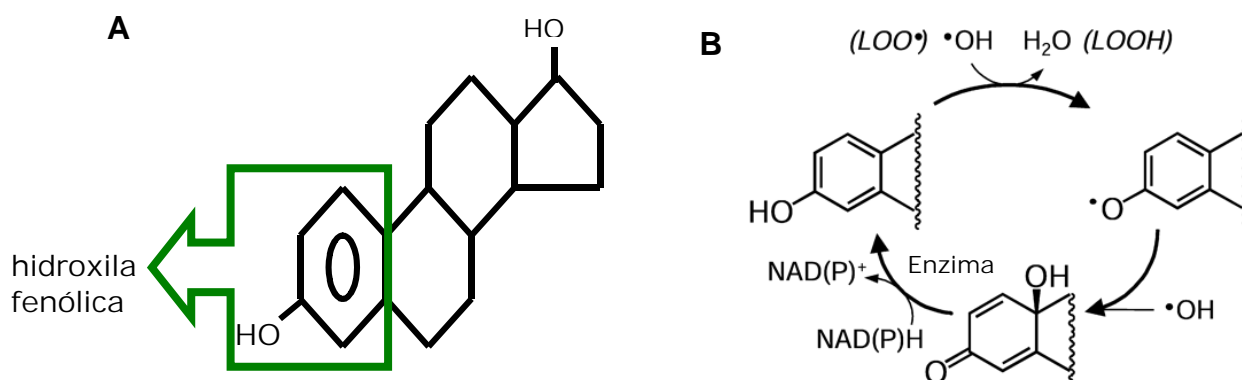


Figura 1: A - Estrutura do 17 β -estradiol. B - esquema do ciclo antioxidante do 17 β -estradiol quando exposto ao radical hidroxil OH^\bullet (adaptado de Prokai et al., 2003).

Outra propriedade antioxidante dos estrogênios, além da atividade de “scavenger” de radicais livres, é a ação sobre a regulação da atividade das enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase (GPx). Investigou-se a atividade da GPx eritrocitária ao longo do ciclo menstrual e foi verificado um aumento de sua ação enzimática quando houve picos de estrogênios ao longo do ciclo (Massafra et al., 1998). Também foi observado que concentrações progressivas de estradiol foram efetivas em bloquear a produção do ânion superóxido (Arnal et al., 1996). Além disso, foi verificado que o estradiol de origem exógena aumenta os níveis de SOD (Oberley et al., 1994) e diminui a expressão de enzimas pró-oxidantes como a NADPH oxidase (Hua & Harrison, 2000).

1.2.2 EFEITOS DOS ESTROGÊNIOS SOBRE DOENÇAS CARDÍACAS

Os estrogênios têm significativa ação redutora do colesterol plasmático, inibindo a aterogênese, por isso eles podem contribuir para reduzir a incidência de

infarto do miocárdio e outras complicações da doença vascular aterosclerótica em mulheres na pré-menopausa (Hayashi et al., 2000). No entanto, altas doses de estrogênios ativos por via oral parecem promover trombooses, por chegarem ao fígado pelo sangue, em altas concentrações e alterarem a produção hepática dos fatores de coagulação (Genuth, 1996).

As doenças cardiovasculares na pós-menopausa são devidas, em parte, ao desenvolvimento de aterosclerose causada por deficiência de estrogênios. A principal causa destas doenças é o aumento do LDL-colesterol e de triglicerídeos como resultado de uma menor eliminação do LDL e outros lipídios pelo fígado e o aumento da oxidação do LDL na membrana arterial (Kuhl, 1994).

Os hormônios esteróides sexuais, sobretudo, os estrogênios, possuem uma grande relevância no funcionamento vascular. O 17β -estradiol pode aumentar a liberação de NO, quando administrado cronicamente. Pode ainda fazer uma “up-regulation” da NO sintase endotelial (eNOS). Ao passo que o mesmo tem ação sobre a musculatura lisa, como vasodilatador, se aplicado agudamente (Barret-Connor & Bush, 1991; Di et al., 1999).

Os estrogênios têm se mostrado eficazes em reduzir a proliferação celular na camada íntima e adventícia da parede vascular em vários modelos experimentais. Esse efeito tem sido associado à ação do estrogênio na modulação de fatores envolvidos nesse processo, como inibição da atividade da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e/ou aumento da produção de NO (Orshal et al., 2004). O estrogênio também pode prevenir a formação da placa aterosclerótica ao exercer ação inibitória na expressão de importantes fatores pró-inflamatórios, como citocinas e moléculas de adesão, envolvidos no processo de adesão e migração transendotelial (Pfeilschifter et al., 2002; Turgeon, 2006).

Muitos trabalhos têm apontado o NO como o principal mediador dos efeitos induzidos pelo estrogênio sobre a função endotelial. O estrogênio é capaz de estimular a síntese de NO em diferentes leitos vasculares, como artéria uterina, micro-vasos da circulação mesentérica e muscular esquelética e na aorta (Strehlow et al., 2003; Turgeon, 2006). Aumento da produção de NO, determinado pela concentração urinária de seus metabólitos nitritos e nitratos, também tem sido observado em mulheres na menopausa que recebem terapia de reposição hormonal. O mecanismo mais provável para explicar o aumento da produção de NO seria a maior atividade da eNOS decorrente da indução da expressão gênica dessa enzima pelo estrogênio (Wassmann et al., 2001). É fato que o estrogênio, ao se ligar em seu receptor nuclear, se transforma em fator de transcrição gênica, que é reconhecido por regiões promotoras no DNA e modula a transcrição de uma série de proteínas. Seqüências de reconhecimento do complexo estrogênio/receptor têm sido detectadas na região promotora do gene que codifica a eNOS, sugerindo que o estrogênio aumenta a expressão gênica dessa enzima (Tostes et al., 2003; Orshal et al., 2004). Foi demonstrado ainda que a ovariectomia promove redução significativa da expressão e atividade da eNOS em diferentes leitos vasculares, e que o tratamento das fêmeas ovariectomizadas com estradiol restaura a expressão e atividade dessa enzima para os níveis observados em fêmeas não-castradas (Dantas et al., 2001). Outros estudos têm demonstrado que o estrogênio pode aumentar a atividade da eNOS por mecanismos não-genômicos. Por meio do tratamento de células endoteliais em cultura com um composto impermeável à membrana celular (ligado à albumina), Kim *et al.* observaram que o estrogênio promove indução rápida da liberação de NO. Isso sugere a existência de um sítio de ação para o estradiol na membrana

plasmática cuja ativação desencadeia a cascata de segundos mensageiros que levam à ativação rápida da eNOS (Kim et al., 1999; Tostes et al., 2003).

1.2.3 ÓXIDO NÍTRICO E ESTROGÊNIO

O NO é sintetizado nos organismos vivos, principalmente, por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) que convertem o aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. A atividade da NOS é controlada por citocinas, efetores e fatores de sinalização do NO para conexão do sistema imunológico com os sistemas cardiovascular, nervoso e endócrino (Bergendi et al., 1999).

O NO é um gás hidrofóbico e uma vez gerado será capaz de difundir-se através da membrana plasmática das células endoteliais. É responsável por controlar o tônus vascular, conhecido como Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (EDRF), responsável então pela vasodilatação e por inibir alguns processos como: agregação plaquetária, adesão de leucócitos ao endotélio, produção de endotelinas (peptídios com potente ação vasoconstritora) e causa também variação na força de contração e na frequência cardíaca (Nohl, 1993). O NO é liberado quando ocorre: aumento do fluxo sanguíneo, aumento do estresse de cisalhamento (*shear stress*), aumento da pressão sanguínea arterial, provocando então o relaxamento do vaso. Assim, podemos ver que o tônus vasodilatador depende do NO que é regulado localmente, sendo este um mecanismo de adaptação local que contribuirá para manter a pressão arterial dentro de valores normais.

O estrogênio pode interferir positivamente nos mecanismos reguladores do tônus vascular, promovendo cárdio-proteção. A cárdio-proteção estrogênio-

dependente é mediada em parte pela inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes e pela síntese aumentada de NO. Várias observações dão suporte a esta última suposição:

- 1) O NO está relacionado com várias ações cardioprotetoras como, por exemplo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e crescimento de células do músculo liso vascular (Dubey, 1994; Dubey et al., 1995; Aslan et al., 2001);
- 2) O tratamento de células endoteliais em cultura com 17β - estradiol estimula a atividade da NOS constitutiva (Hishikawa et al., 1995);
- 3) Anéis de aorta retirados de fêmeas liberam mais NO do que o dos machos e esta maior liberação está correlacionada com os níveis circulantes de estradiol (Hayashi et al., 1992);
- 4) O bloqueio farmacológico da eNOS atenua a vasodilatação da circulação uterina induzida por estradiol (Van-Buren et al., 1992). Em humanos, os níveis circulantes de NO aumentam com o desenvolvimento folicular e se correlacionam com os níveis de 17β - estradiol (Rosseli et al., 1994).

Embora existam indicações claras de que a função endotelial está alterada pelo estrogênio, os efeitos sobre o tônus vascular e conseqüentemente sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca, dependem da concentração do estrogênio, tempo e via de administração.

1.3 HOMOCISTEÍNA

Estudos têm demonstrado que a proteção antioxidante dada pelo estrogênio pode diminuir a oxidação da homocisteína.

A homocisteína é um metabólito importante gerado no metabolismo do aminoácido (aa) metionina, sendo que as maiores vias do metabolismo da homocisteína ocorrem nos rins e no fígado (Figura 2A). Possui duas rotas essenciais: a transmetilação catalisada pela metionina sintase e a transulfuração catalisada pela cistationina β sintase que formará cistationina e posterior conversão à cisteína, um precursor da glutathione (GSH). A importância desta segunda via é manter o “pool” intracelular de GSH e a sua regulação sob condições de estresse oxidativo. Alterações no processo de transulfuração, que usa a vitamina B₆ como co-fator, podem comprometer a capacidade tampão redox celular relacionada com a patofisiologia de diferentes distúrbios relacionados com a homocisteína (Andersson et al., 2000; Dimitrova et al., 2002a).

No ciclo da remetilação, a homocisteína regenera a metionina. Essa transformação depende da aquisição de um grupo metil numa reação catalisada pela metionina sintase (Figura 2A). A vitamina B₁₂ (cobalamina) é um co-fator essencial para o funcionamento dessa enzima. O ácido fólico é outro elemento essencial na via de remetilação, pois ele é o elemento essencial do ciclo do folato, responsável pela conversão da homocisteína em metionina através da enzima metionina sintase. A deficiência do folato está correlacionada com o desenvolvimento de aterosclerose e com doença vascular cerebral e cardíaca (Title et al., 2000; Dimitrova et al., 2002a). O tratamento com folatos e vitaminas do complexo B (B₆ e B₁₂) pode interromper o crescimento da área da placa aterosclerótica em pacientes com concentrações elevadas de homocisteína (Tavares et al., 2000). Deficiências de folato, vitamina B₆ ou B₁₂ podem levar à descompensação do metabolismo da homocisteína e à hiperhomocisteinemia.

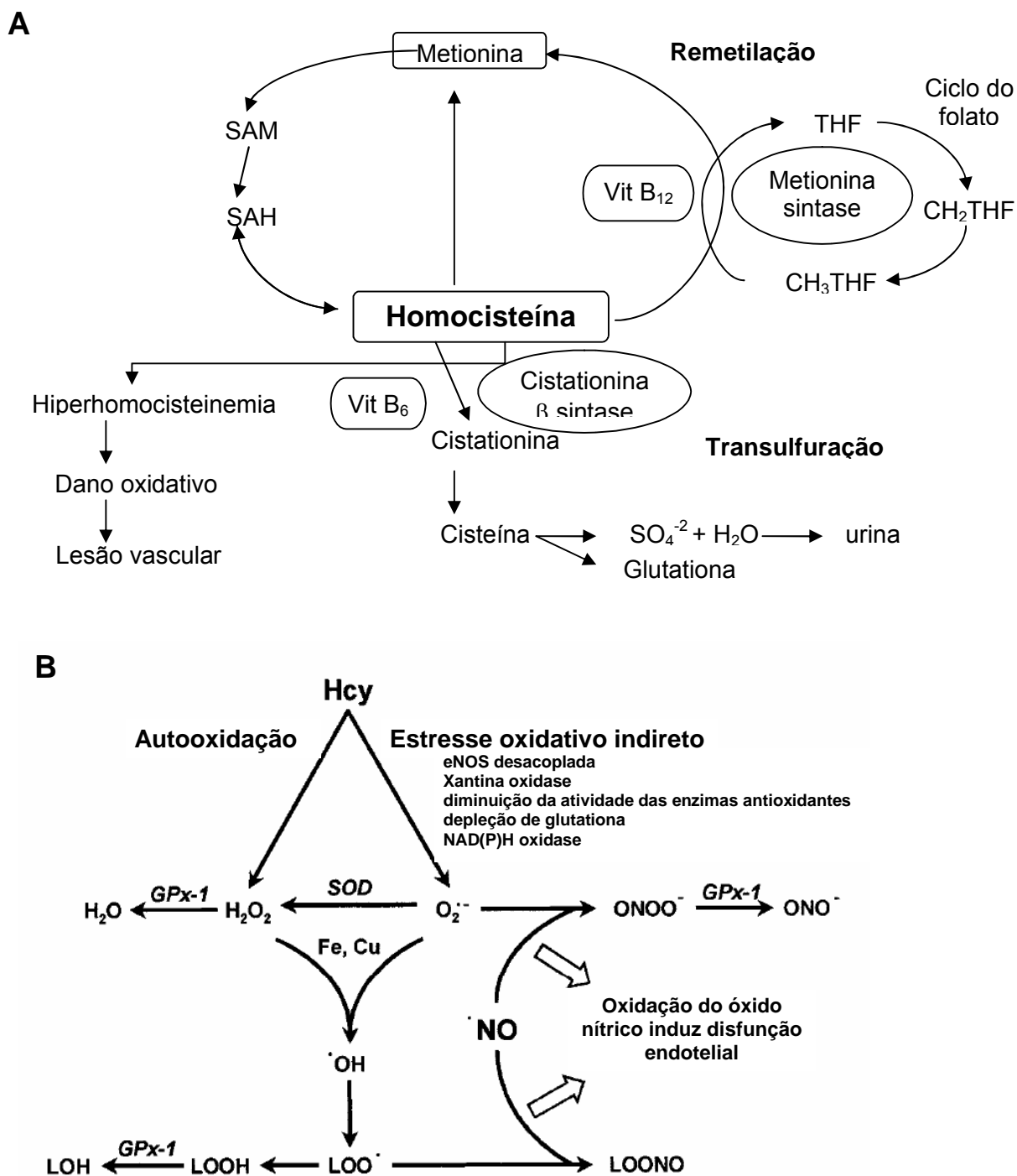


Figura 2: A - Hcy é gerada em um ciclo através da S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (SAH). A remetilação da Hcy revertida a metionina é realizada pela vit B₁₂, dependente de metionina sintase. Hcy é também convertida à cisteína através da via de transulfuração, iniciada pela vit B₆ dependente de cistationina β-sintase. O ciclo do folato gera 5-metiltetrahydrofolato (CH₃THF) para a remetilação da Hcy. THF- tetrahydrofolato, CH₂THF- 5-10-metilenotetrahydrofolato, SO₄⁻² -ânion sulfato (adaptado de Jacobsen, 1998). B - Mecanismo de geração de EAO pela Hcy. A auto-oxidação produz H₂O₂, efeitos oxidativos indiretos geram superóxido. Estes na presença de metais de transição geram o radical hidroxil. O radical hidroxil promove a lipoperoxidação e diminuindo a biodisponibilidade do NO produzindo o peroxinitrito. (adaptado de Dayal, 2002)

Concentrações elevadas de homocisteína estão associadas com o aumento do risco de aterosclerose e trombose, por isso a hiperhomocisteinemia é considerada um fator de risco independente no desenvolvimento de trombose arterial e venosa (Signorello et al., 2002).

A homocistinúria é um erro inato do metabolismo de aminoácidos sulfurados causado por uma severa deficiência na atividade da cistationina β -sintase, caracterizada por um acúmulo de homocisteína e metionina, resultando em alterações principalmente no sistema nervoso central e sistema vascular. Tem sido demonstrado que este distúrbio leva a um aumento no dano celular pela formação do ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil que podem ser gerados diretamente pelo processo de auto-oxidação da homocisteína (Figura 2B). As EAO geradas durante a oxidação da homocisteína podem ser iniciadoras de lipoperoxidação, podendo levar a uma lesão oxidativa do endotélio (Figura 2B) (Signorello et al., 2002).

Em 1969, McCully fez uma observação clínica ligando concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína com doença vascular. Relatou trombose arterial extensa e aterosclerose grave em duas autópsias de crianças com concentrações elevadas de homocisteína plasmática e homocistinúria. Com base nessas observações, propôs que níveis elevados de homocisteína poderiam causar doença vascular aterosclerótica (McCully, 1969). A teoria de McCully da aterosclerose foi pela primeira vez comprovada na prática clínica por Wilcken e Wilcken em 1976, que compararam níveis de homocisteína em pacientes com doença vascular aterosclerótica com controles (Wilcken & Wilcken, 1976).

Estudos sugerem um papel realmente importante para a homocisteína no desenvolvimento de doença vascular, pois ela pode promover oxidação do LDL-

colesterol, proliferação de células musculares lisas, ativação de plaquetas e fatores de coagulação, e disfunção endotelial. Portanto, alterações no metabolismo da homocisteína têm papel potencial na patogênese da aterosclerose (Kuller & Evans, 1998; Kanani et al., 1999; Cole, 2001).

Boushey e colaboradores, resumiram num artigo de revisão um grande número de evidências convincentes, associando níveis elevados de homocisteína e doença vascular. Baseados nos dados da literatura, concluíram que o aumento de 5µmol/L nos níveis de homocisteína total conferia o mesmo aumento de risco para doença vascular que um aumento de 20mg/dL nos níveis de colesterol total (Boushey et al., 1995).

A disfunção endotelial pode ser a causa básica para a ação pró-aterogênica associada à hiperhomocisteinemia, e é manifestada pelo prejuízo na regulação do tônus vascular, do fluxo sanguíneo e perda da função antitrombótica das células endoteliais (Weiss et al., 2000; Sydow & Boger, 2001).

A homocisteína possui um grupo sulfidril reativo (-SH), que pode sofrer oxidação a dissulfeto (RSSR), como demonstrado na reação 9, em pH fisiológico na presença de oxigênio (Jacobsen, 2000).



Reação 9: Exemplo de reação global de oxidação.

A produção de radicais livres durante a oxidação da homocisteína favorece a disfunção endotelial. Quando adicionada ao plasma, a homocisteína é rapidamente auto-oxidada, originando homocistina e homocisteína tiolactona, bem como espécies ativas de oxigênio consideradas citotóxicas, tais como o

superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. Foi demonstrado ainda que a homocisteína diminui a expressão e inibe a atividade da glutathione peroxidase pelas células endoteliais, favorecendo a peroxidação lipídica (Domagala et al., 1998; Welch & Loscalzo, 1998; Lawrence de Koning et al., 2003).

A hiperhomocisteinemia estimula a proliferação de células musculares lisas pela inativação do óxido nítrico a partir dos peróxidos lipídicos produzidos pela oxidação da homocisteína, gerando peroxinitrito, que deixa o endotélio mais vulnerável aos danos promovidos pela homocisteína (Welch et al., 1997; Domagala et al., 1998; Lawrence de Koning et al., 2003).

Romerio e colaboradores sugerem que o peroxinitrito, um potente oxidante, gerado pela oxidação do NO pelo ânion superóxido, este produzido pela auto-oxidação da homocisteína, é o principal mediador da lipoperoxidação na hiperhomocisteinemia (Romerio et al., 2004). Outro estudo mostra que a lipoperoxidação causada pela homocisteína é dependente do superóxido, mas não do peróxido de hidrogênio (Heydrick et al., 2003).

Um outro possível mecanismo pelo qual a hiperhomocisteinemia pode promover a aterogênese é por meio da redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, um potente agente antiagregante que exerce um importante papel na regulação da função plaquetária. Ou ainda porque a hiperhomocisteinemia leva a uma diminuição do transporte de arginina, importante para a biossíntese do óxido nítrico (Domagala et al., 1998; Leoncini et al., 2003; Becker et al., 2005).

Outros estudos sugerem que o endotélio vascular, em pacientes com deficiência de cistationina β -sintase, tem maior susceptibilidade para o dano induzido pela homocisteína, e que esta induz a proliferação celular além de impedir a regeneração do dano da célula endotelial (Dimitrova et al., 2002b). O

potencial da homocisteína produzir doença vascular está ligado quer à ação direta desta sobre o endotélio e o sistema de agregação-coagulação, quer à ação indireta sobre outros mediadores de aterosclerose, como oxidação do colesterol LDL e efeito mitogênico no músculo liso da parede vascular (Tsai et al., 1996).

A homocisteína também causa dano diretamente na matriz vascular, por afetar a função bioquímica e biossintética das células vasculares, além de aumentar a lipoperoxidação e a formação de oxicolesterol altamente aterogênico (Kanani et al., 1999).

Pacientes com hiperhomocisteinemia têm uma piora na vasodilatação dependente do endotélio, enquanto a vasodilatação independente do endotélio não é afetada significativamente. Podendo este resultado ser relacionado com o dano oxidativo causado pela homocisteína na parede do vaso, uma vez que foi demonstrado em estudos “in vitro” que a homocisteína aumenta o estresse oxidativo (Viridis et al., 2001).

As propriedades vasodilatadoras das células endoteliais normais ficam afetadas pelo excesso de homocisteína, devido principalmente à diminuição do óxido nítrico, pelo aumento do ânion superóxido (Viridis et al., 2001).

Estudos demonstraram que altas concentrações de estrogênio, utilizado em terapia de reposição hormonal, estão associadas com um decréscimo na concentração sérica de homocisteína (Dimitrova et al., 2002a). Considerando que o estrogênio já está descrito amplamente como um antioxidante não enzimático, envolvido na proteção cardiovascular e visto que este possui influência no metabolismo da homocisteína, o presente estudo visa elucidar alterações bioquímicas e fisiológicas desta interação.

2. HIPÓTESE

Sendo que a hiperhomocisteinemia está associada com o aumento do estresse oxidativo e que os estrogênios apresentam propriedades antioxidantes, o presente estudo busca testar a hipótese de que a retirada dos estrogênios poderia alterar o perfil oxidativo e, assim, piorar a disfunção endotelial e miocárdica promovida pela homocisteína em ratas.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar primeiramente o efeito de substâncias acumuladas na homocistinúria sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos jovens e adultos. Em adição, avaliar o efeito da hiperhomocisteinemia, aguda e crônica, sobre parâmetros de estresse oxidativo e também parâmetros hemodinâmicos em ratas adultas na presença ou ausência de estrogênio.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Homocistinúria – ratos jovens e adultos
 - 1) Verificar o estresse oxidativo através das medidas de LPO, dosagem de carbonilas, atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST, em coração de ratos submetidas ao modelo experimental de homocistinúria.
 - 2) Verificar o efeito do folato sobre parâmetros oxidativos em coração de ratos submetidas ao modelo experimental de homocistinúria.
- Hiperhomocisteinemia aguda – ratas adultas castradas

- 1) Verificar o efeito da hiperhomocisteinemia sobre o estresse oxidativo através das medidas de LPO, carbonilas, capacidade antioxidante total, atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST, em coração e aorta de ratas submetidas ou não a castração.
- 2) Verificar o efeito sistêmico da hiperhomocisteinemia sobre o estresse oxidativo através das medidas de LPO, capacidade antioxidante total, atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST, em sangue de ratas submetidas ou não a castração.
- 3) Avaliar o metabolismo do NO através de seus metabólitos nitritos e nitratos, em coração e plasma de ratas submetidas ou não a castração.
- 4) Avaliar os seguintes parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial média e frequência cardíaca

- Hiperhomocisteinemia crônica – ratas adultas castradas

- 1) Verificar o efeito da hiperhomocisteinemia sobre o estresse oxidativo através das medidas de LPO, carbonilas, atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST, em coração de ratas submetidas ou não a castração.
- 2) Avaliar o metabolismo do NO através de seus metabólitos nitritos e nitratos, em coração de ratas submetidas ou não a castração.
- 3) Avaliar os seguintes parâmetros relativos à mecânica cardíaca: frequência cardíaca, pressão ventricular esquerda sistólica, pressão ventricular esquerda diastólica, primeira derivada temporal positiva da pressão (+dP/dt), a primeira derivada temporal negativa da pressão (-dP/dt) e hipertrofia cardíaca.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizadas ratos Wistar machos e fêmeas provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, sendo quatro animais por caixa. Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (21°C) e ciclo “claro-escuro” de 12 horas. Água e ração comercial foram oferecidas “ad libitum”.

4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Experimento 1:

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais, n=8 por grupo:

Grupo 1 - Controle

Grupo 2 - Homocisteína

Estes grupos com ratos imaturos (machos e fêmeas) receberam tratamento crônico com homocisteína que iniciou no 6° dia de vida e terminou no 28° dia com doses crescentes de homocisteína (i.p.): do 6° ao 13° dia, 0,3 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal, do 14° ao 20° dia, 0,4 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal e do 21° ao 28° dia, 0,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal (Streck et al., 2002). Uma hora após a última dose os animais foram mortos por decapitação.

Experimento 2:

Foram utilizados 30 ratos, divididos em 4 grupos:

Grupo I - Salina (n=8)

Grupo II - Folato (n=6)

Grupo III - Homocisteína (Hcy) (n=9)

Grupo IV - Folato + Hcy (n=7)

Protocolo de administração de Hcy e Folato em ratos Wistar:

Os animais receberam uma administração intraperitoneal diária de ácido fólico (5 mg/kg) (Lalonde et al., 1993) e/ou duas injeções diárias de Hcy (0,3-0,6 μ mol/g p.c.) (Streck et al., 2002) do 6° ao 28° dia de vida. Os animais controles receberam semelhantes volumes de salina. Aos 80 dias, os animais foram mortos por decapitação.

Experimento 3:

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais, n=8 por grupo:

Grupo I – NAIVE controle: (NAIVE: animais que não foram submetidos a nenhum tipo de estresse cirúrgico) fêmeas intactas, nas quais foi administrada solução salina nas mesmas condições da homocisteína.

Grupo II – NAIVE homocisteína: fêmeas intactas, submetidas ao tratamento com homocisteína, conforme protocolo descrito posteriormente.

Grupo III – Sham controle: fêmeas submetidas à cirurgia fictícia de castração, nas quais foi administrada solução salina.

Grupo IV – Sham homocisteína: fêmeas submetidas à cirurgia fictícia de castração, submetidas ao tratamento com homocisteína.

Grupo V – Castrada controle: fêmeas castradas, nas quais foi administrada solução salina.

Grupo VI – Castrada homocisteína: fêmeas castradas, submetidas ao tratamento com homocisteína.

Estes grupos de ratas adultas foram castradas no 50º dia de vida e, após uma semana de castração, receberam tratamento agudo com homocisteína intraperitonal (0,6 $\mu\text{mol/g}$ peso) de 8 em 8 horas por 72 horas. Uma hora após a última dose foram mortos por decapitação.

Experimento 4:

Foram utilizados 32 animais, sendo n=8 em cada grupo, distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo I – Sham controle: são fêmeas submetidas à cirurgia fictícia de castração, e que receberam água “ad libitum”.

Grupo II – Castrada controle: são fêmeas castradas, e que receberam água “ad libitum”.

Grupo III – Sham metionina: são fêmeas submetidas à cirurgia fictícia de castração, submetidas ao tratamento com metionina.

Grupo IV – Castrada metionina: são fêmeas castradas, submetidas ao tratamento com metionina.

Estes grupos de ratas foram castradas no 70º dia de vida e receberam metionina na água de beber por 30 dias na dose de 1 g/kg/dia (Ungvari et al., 1999; Hagar, 2002). Com controle diário da ingesta de água. Logo após o final do tratamento os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical.

4.3 COLETA DE SANGUE

No experimento 2 e 3 o sangue foi coletado ao final do tratamento para posteriores dosagens. O sangue dos animais foi coletado através de punção do plexo venoso retro – orbital com um tubo de microhematócrito com uma das extremidades quebrada em bisel (Halpern, 1951). Para isso, os animais foram previamente anestesiados com éter etílico. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), os eritrócitos e o plasma retirados. O plasma foi congelado em freezer a -80°C para posteriores dosagens de estresse oxidativo e hormônios. Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%), novamente centrifugados e aliquotados. Uma parte foi ressuspensa em soro para medida de lipoperoxidação, ao restante foi adicionado uma solução de ácido acético 1mM e sulfato de magnésio 4mM, e as amostras foram congeladas em freezer a -80°C para posteriores dosagens das enzimas antioxidantes.

4.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS

Os animais foram mortos por decapitação nos experimentos 1, 2 e 3 e por deslocamento cervical no experimento 4. Os corações, fígados e aortas foram retirados. A aorta foi retirada, congelada em nitrogênio líquido e macerada, após diluída em cloreto de potássio (KCl) 1,15% (5mL por g de aorta) e procedido da mesma forma que para o tecido. Os corações e fígados foram pesados e homogeneizados em ultra-Turrax em KCl 1,15% (5mL por g de tecido para coração e 9mL por mg de tecido para fígado), fluoreto de fenil metil sulfonila

(PMSF) na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 μ L por mL de KCl adicionado). A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 10min em centrífuga refrigerada (Sorvall RC %B – SM 24). O sobrenadante foi aspirado, separado em alíquotas e congelado em freezer (-70°C), sendo utilizado posteriormente para as análises bioquímicas (Llesuy et al., 1985).

4.5 CASTRAÇÃO (OVARIECTOMIA)

A castração foi realizada em ratas fêmeas com técnicas apropriadas e de uso corrente em nosso laboratório. As fêmeas foram anestesiadas com quetamina (90 mg/kg de peso do animal) e xilazina (10mg/kg de peso do animal), por via intraperitoneal. Foi feita uma incisão na pele e tecido subcutâneo entre a última costela e a coxa, a cerca de 1 cm da linha mediana. Após, uma segunda incisão atingiu a camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal. O ovário foi exposto, efetuada uma ligadura abaixo da trompa uterina, retirado o ovário e suturada a incisão da pele em planos separados, repetindo o procedimento no outro ovário (Waynforth & Flecknell, 1992).

4.6 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL

4.6.1 CANULAÇÃO ARTERIAL

O procedimento cirúrgico bem como o cuidado pós-operatório, foram baseados na descrição feita por Waynforth e Flecknell (1992). Um dia antes do sacrifício dos animais, estes foram anestesiados novamente com quetamina (90

mg/Kg de peso corporal) e xilazina (10mg/Kg de peso corporal) e receberam cateteres na artéria carótida, exteriorizados na região dorsal do pescoço. Os cateteres foram confeccionados com tubos de Tygon PE-90, conectados a tubos de polietileno PE-50 (Clay Adams, USA). A desobstrução das cânulas se deu através da lavagem com heparina sódica (0,01 mL de Liquemine - Roche, 5000U) em 0,1 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%, antes de cada registro de pressão. A implantação das cânulas foi feita 24 horas antes da realização do registro de pressão arterial.

4.6.2 REGISTRO E PROCESSAMENTO DE SINAL

Após as 72 horas de tratamento (experimento 3) foram feitos os registros de pressão batimento-a-batimento nos animais acordados. Teve-se o cuidado de mantê-los em local silencioso, evitando qualquer fator externo que interferisse na medida da pressão. Era feita também uma adaptação, colocando-se os ratos na sala onde eram feitos os registros uns 15 minutos antes. O tempo de registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) foi de 15 minutos.

Os registros foram adquiridos a partir da conexão da cânula, introduzida na carótida, a um transdutor de pressão (P23Db, Gould-Statham, Oxford, CA, USA) acoplado a um codificador de sinais Hewlett Packard (HP 8805) que se encontrava ligado à placa analógico-digital CODAS (AT/MCA CODAS-DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohion, USA) por um seletor de canais, em um computador 486 (66 MHz e 8Mb RAM). A frequência de amostragem para realizar os registros de PA e FC foi de 2000 Hz. O programa utilizado (CODAS) permite trabalhar diretamente com a onda de pulso, que é vista na tela do computador, e

os dados podem ser gravados em disco rígido. Neste mesmo programa, podem-se executar cálculos a partir dos valores obtidos, assim é possível trabalhar com valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) para cada batimento. A FC é obtida a partir do inverso do período, entre um pico e outro, multiplicado por 60 (segundos). Após gravados os sinais em disco rígido, gera-se uma planilha que pode ser analisada em programa Excel for Windows, a partir da qual se obtém valores de PAM e FC e seus respectivos gráficos, para cada animal experimental registrado.

4.6.3 REGISTRO DAS PRESSÕES VENTRICULARES ESQUERDAS

Na quarta semana após o início do tratamento (experimento 4) os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de quetamina (90 mg/Kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (10mg/Kg de peso corporal) por via intraperitoneal. Foi utilizado, para a canulação do ventrículo esquerdo via artéria carótida direita, um cateter de polietileno (PE50) conectado a um transdutor de pressão (Strain-Gauge-Narco Biosystem Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) e acoplado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). O catéter foi inserido até o ventrículo e sua posição foi determinada pela observação da onda característica de pressão ventricular. Após 5 minutos de estabilização, foram registradas a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE), frequência cardíaca (FC) e as derivadas positiva ($+dP/dt \rightarrow$ índice de contratilidade) e negativa ($-dP/dt \rightarrow$ índice de relaxamento), expressas em mmHg/s. Os sinais analógicos foram digitalizados (Windaq – Data Acquisition System) com taxa de amostragem de

2000 Hz (Li et al., 2000). A PSVE foi determinada utilizando-se o programa comercial Windaq associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a detecção dos valores máximos e mínimos da curva de pressão, batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão ventricular. A PDFVE foi determinada pela detecção manual do ponto de inflexão no traçado da onda de pressão diastólica do ventrículo esquerdo. Foram realizadas 20 detecções por registro.

4.7 DOSAGEM HORMONAL

O método utilizado para dosar os estrogênios foi de quimiluminescência por imunoensaio competitivo. O aparelho utilizado para esta medida foi o IMMUNOLITE 2000, com os seguintes reagentes: substrato quimiluminescente dioxietano (L2SUBM), reagente estradiol Wedge (L2E2A2), que é constituído pela combinação de estradiol com fosfatase alcalina e esferas recobertas com um anticorpo altamente específico para o estradiol (L2E212). O método se baseia na competição, pelo anticorpo específico para estradiol, das moléculas de hormônio da amostra analisada com as moléculas do estradiol ligadas à fosfatase alcalina.

A quantidade absoluta de hormônio na amostra foi calculada através de uma curva padrão. Esta curva é obtida pela incubação de quantidades variadas de hormônio autêntico com quantidades idênticas de anticorpos e de hormônio marcado. A dosagem hormonal foi realizada no Laboratório Weinmann.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, em 1951, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/ml.

4.9 ANÁLISE DE NITRITOS+NITRATOS (NO_x)

Os nitratos foram determinados como nitritos totais (nitrito inicial mais nitrito reduzido a partir de nitratos) após sua redução usando nitrato redutase de *Aspergillus* sp. na presença de NADPH. A concentração de nitritos foi determinada usando o reagente de Griess, onde um agente cromóforo com forte absorvância em 540 nm é formado pela reação do nitrito com uma mistura de naftil-etilenodiamina (0,1%) e sulfonilamida (1%). A absorvância foi medida em espectrofotômetro para dar a concentração de nitrito. Uma curva padrão foi estabelecida com concentrações seriais de nitrito de sódio (10^{-8} a 10^{-3} mol/L). Os resultados são expressos em μM de NO_x (Granger et al., 1999).

4.10 LIPOPEROXIDAÇÃO POR QUIMILUMINESCÊNCIA (QL)

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios

por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. A quimiluminescência (QL) foi medida em contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer). O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,5 mL de uma solução reguladora de KCl 140mmol/L, fosfatos 20 mmol/L, (pH 7,4), na qual foi adicionado 0,5 mL de homogeneizado ou 10 μ L de eritrócito diluído em soro fisiológico. Os resultados são expressos em contagens por segundo (cps), por miligrama de proteína, segundo Gonzalez Flecha et al., 1991.

4.11 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico, para medir espectrofotometricamente a formação de um produto de coloração rósea. Para tanto, foi utilizada uma alíquota de 0,25 mL de homogeneizado, à qual foram adicionados 0,75 mL de ácido tricloroacético a 10%, que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Esta mistura foi, então, agitada e centrifugada durante 3 minutos a 1000g. Foram retirados 0,5 mL do sobrenadante e a este foram adicionados 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, que reagiu com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e resfriada. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro. Utilizou-se padrão de tetrametoxipropano. Os resultados são expressos em η mol de malondialdeído (MDA) por mg de proteína (Buege & Aust, 1978).

4.12 ANÁLISE DE CARBONILAS

A avaliação das carbonilas foi realizada de acordo com o método descrito por Reznick & Packer (1994). Este método consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que podem ser medidas espectrofotometricamente. É uma técnica com alta reprodutibilidade podendo detectar níveis de carbonilas em vários sistemas. Utilizada para medir dano à proteína, uma vez que carbonilas são formadas a partir de quebras da ligação C-N dos aa que sofreram dano oxidativo.

O método consiste em incubar amostra de tecido ou plasma com 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mmol/L) e 2.5mol/L HCl por 1h em temperatura ambiente, no escuro. As amostras foram agitadas a cada 15 min e após foi adicionado TCA 20% (p/v). A seguir ficaram no gelo por 10 min e em seguida foram centrifugadas por 5 min a 1000 g, foi coletada a proteína precipitada. Essas proteínas foram lavadas uma vez com TCA 10% e mais 3 vezes com etanol:acetato de etila (1:1) (v/v). O precipitado final foi dissolvido em guanidina 6mol/L, em banho de 37°C por 10 min, e lido a 360nm. Os resultados são expressos em η mol de carbonilas por mg de proteína (Reznick and Parker, 1994).

4.13 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

Este método é importante para avaliar a capacidade antioxidante total dos fluidos biológicos e pode determinar a capacidade do sistema em resistir às condições de estresse oxidativo. Ainda, valores diminuídos podem ser associados a patologias promovidas por aumentadas concentrações de radicais livres.

O método consiste em incubar uma mistura de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (ABAP - 10 mM), usado como uma fonte de radicais livres, com luminol (10 μ M) em tampão glicina (0,1 mM - pH 8,6). Esta mistura foi levada ao contador e a luminescência surgiu da oxidação do luminol pelos radicais livres. A adição de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) reduziu quase que completamente a emissão de luz, demonstrando um tempo de indução que está linearmente relacionado com a concentração de Trolox. Foi elaborada uma curva de calibração com Trolox nas concentrações de 0,2 à 1 μ M. O homogeneizado de tecido foi adicionado ao invés do Trolox e se observou um tempo de indução que também está relacionado com a quantidade de homogeneizado adicionado. A quantidade total de antioxidantes presente no tecido pode ser avaliada (em unidades de Trolox) por interpolação da medida do tempo de indução na curva de calibração obtida com o Trolox (Evelson et al., 2001).

4.14 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

As glutionas transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutationa com vários xenobióticos, tendo um importante papel na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto 1 cloro-2,4 dinitro benzeno (CDNB), sendo a conjugação deste com GSH utilizada para quantificar-se sua atividade. A formação do composto corado dinitro-fenil-glutaciona (DNP-SG), foi medida espectrofotometricamente a 340nm. Para realização deste ensaio foram utilizados 850 μ L de solução tampão fosfato de sódio 0,2mol/L (pH = 6,5), 50 μ L de GSH, 50 μ L de homogeneizado de tecido ou eritrócitos e 150 μ L de CDNB (20mmol/L). A

atividade da GST foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Mannervik & Gluthenberg, 1981).

4.15 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A enzima GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Logo, sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.

A amostra foi previamente preparada adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, transformando-a em cianometahemoglobina. Mede-se então, a atividade da glutathiona peroxidase em espectrofotômetro a 340nm, em um meio de reação que contém: solução tampão fosfato 140 mmol/L e EDTA 1mmol/L, (pH 7,5;), NADPH 0,24 mmol/L; azida sódica 1mmol/L, utilizada para inibir a atividade da catalase; GSH 5 mmol/L; glutathiona redutase (GR) 0,25 U/mL e, por fim, hidroperóxido de tert- butil 0,5 mmol/L.

Na cubeta, foram adicionados 330 μL de tampão, 50 μL de homogeneizado de tecido, 500 μL de NADPH, 10 μL de azida sódica, 50 μL de GSH e 10 μL de GR. A absorbância foi registrada por aproximadamente 3 minutos. Foram adicionados 50 μL de hidroperóxido de tert-butyl e a diminuição da absorbância, devido ao consumo de NADPH, foi monitorada por um tempo médio de 5 minutos. Os resultados são expressos em ηmol por minuto por mg de proteína, segundo Flohé & Gunzler (1984).

4.16 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A técnica utilizada para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração, nem a atividade da enzima em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utilizou-se a quantificação em unidade relativa. A oxidação do pirogalol foi detectada espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 973 μ L de tampão Tris 50mmol/L (pH 8,2), 8 μ L de pirogalol 24mmol/L, 4 μ L de catalase 30 μ mol/L. O aumento na absorbância foi acompanhado a 420nm durante 2 minutos. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Foi também feita uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (Sigma, 0,25U, 0,5U e 1U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados são expressos em U SOD/mg proteína, segundo Marklund, 1985.

4.17 CATALASE (CAT)

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo do H₂O₂.

Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a realização deste ensaio foram utilizados uma solução tampão fosfato a 50mmol/L (pH=7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3mol/L.

Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 μ L do tampão fosfato e 10 μ L de amostra do tecido. A cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 μ L do H₂O₂ e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância a 240nm. Os resultados são expressos em μ mol por miligramas de proteína (Aebi, 1984).

4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias e os desvios padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a comparação entre os grupos foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via, complementado com o teste de Student-Newmann-Keuls. Para comparação entre 2 grupos foi utilizado teste t Student para dados não pareados. Para as análises de correlações foi utilizado o teste de Pearson.

As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$. O software GraphPad InStat, versão 3.00 para Windows, foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

5. RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1:

Dois grupos de ratos jovens (28 dias). 1) grupo controle: ratos intactos com salina e 2) grupo homocisteína: ratos intactos com homocisteína, que tiveram o tratamento com homocisteína iniciado no 6° dia de vida e receberam tratamento crônico com homocisteína nas seguintes doses:

6 - 13° dia: 0,3 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal.

14 - 20° dia: 0,4 $\mu\text{mol/g}$

21 - 28° dia: 0,6 $\mu\text{mol/g}$.

No 28° dia os animais foram mortos por decapitação. As medidas de estresse oxidativo foram realizadas em homogeneizado de tecido cardíaco.

A LPO através da medida de quimiluminescência não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e homocisteína, como mostrado na figura 3. Da mesma forma, a atividade da enzima antioxidante catalase (figura 4) também é semelhante entre os grupos. Já as atividades das enzimas SOD e GST apresentaram-se aumentadas no grupo homocisteína em relação ao controle; a SOD apresentou um aumento de 24% (figura 5) e a GST de 38% (figura 6).

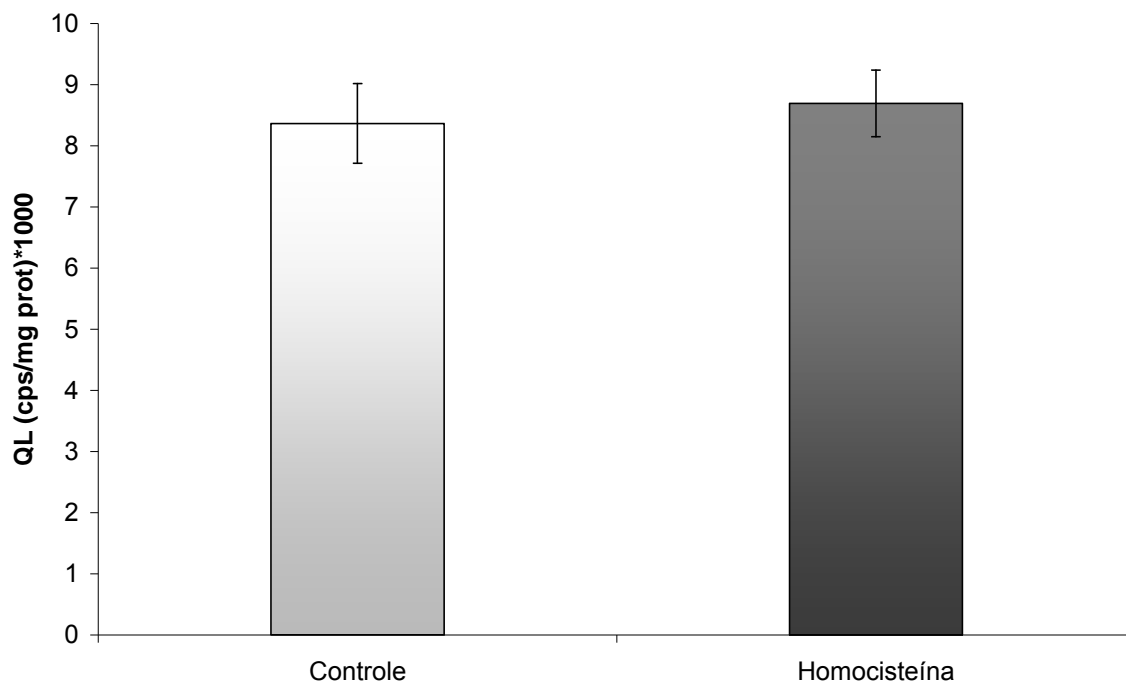


Figura 3: Lipoperoxidação avaliada por quimiluminescência (em cps/mg prot) em homogeneizado cardíaco (n=8/grupo).

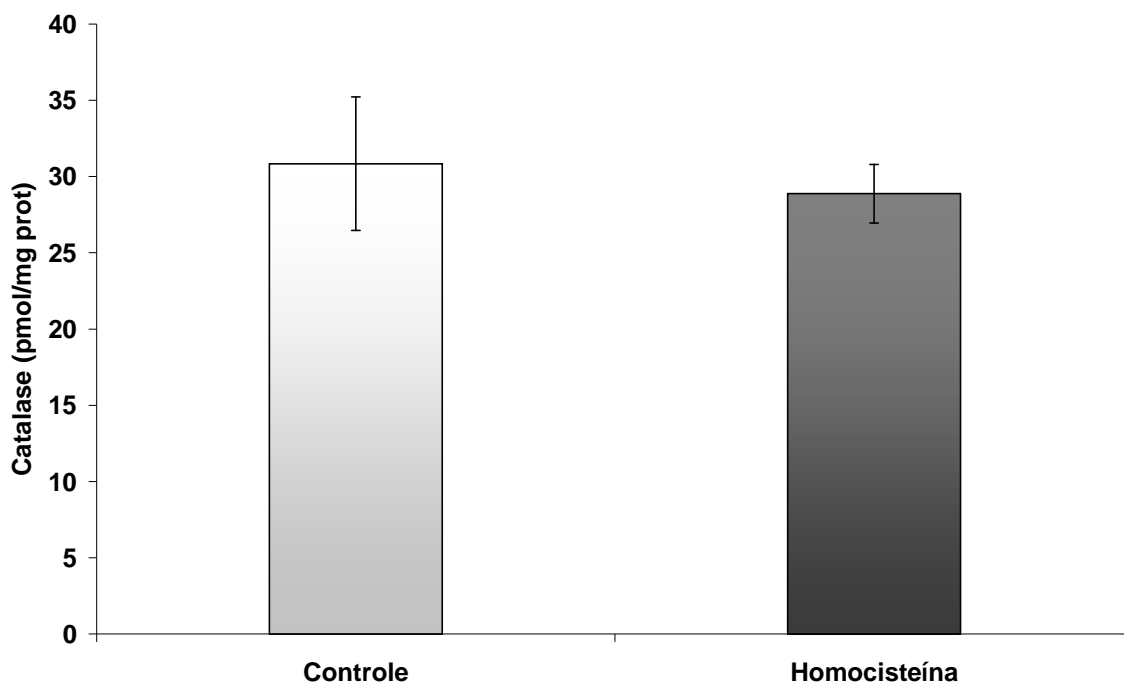


Figura 4: Atividade da catalase (em pmol/mg prot) em homogeneizado cardíaco (n=8/grupo).

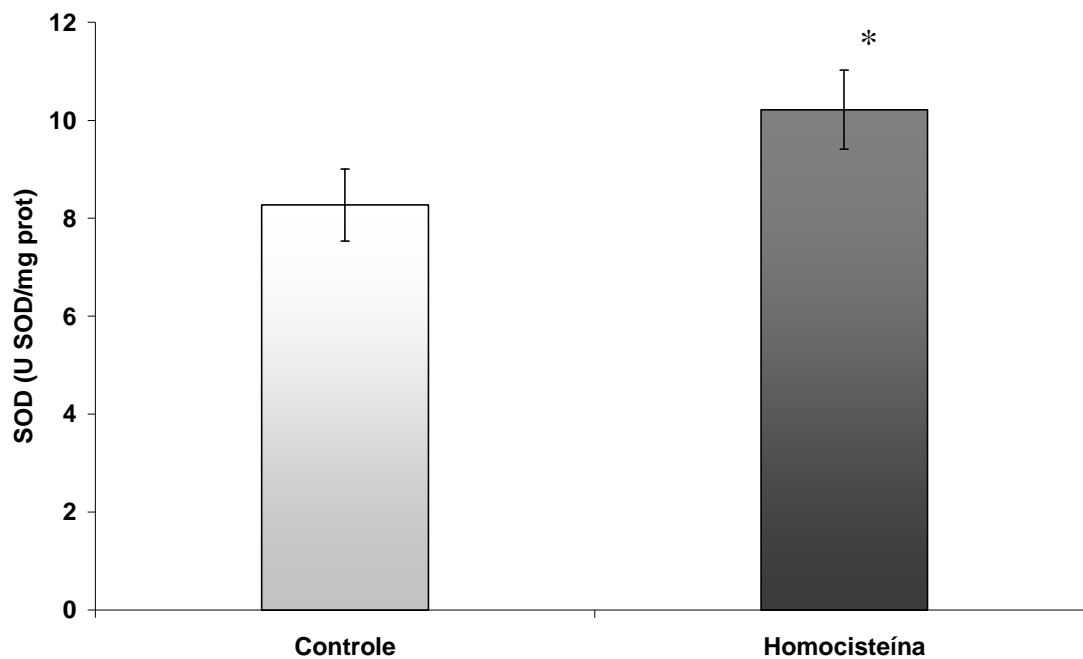


Figura 5: Atividade da SOD (em U/mg prot) em homogeneizado cardíaco (n=8/grupo). (*) $P<0.05$ quando comparado ao grupo controle. Utilizando média \pm dpm e teste t-student.

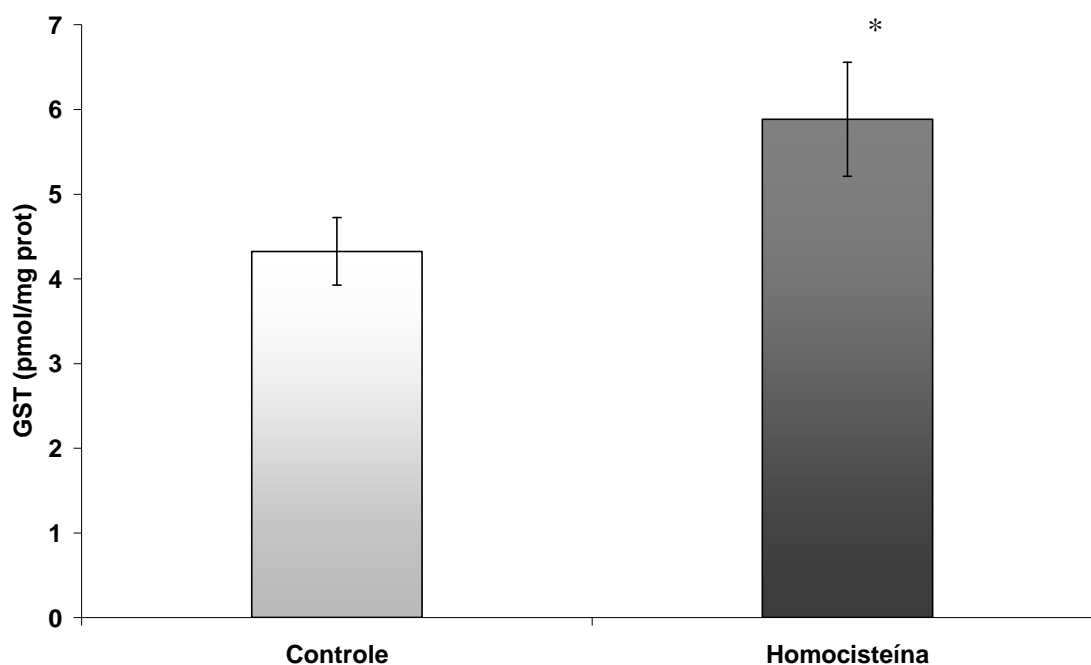


Figura 6: Atividade da GST (em μ mol/mg prot) em homogeneizado cardíaco (n=8/grupo). (*) $P<0.05$ quando comparado ao grupo controle. Utilizando média \pm dpm e teste t-student.

5.2 EXPERIMENTO 2:

Os animais foram divididos em 4 grupos: (n=30)

I - Salina (n=8)

II - Folato (n=6)

III - Homocisteína (Hcy) (n=9)

IV - Folato + Hcy (n=7)

Protocolo de administração de Hcy e Folato em ratos Wistar:

Os animais receberam 1 administração intraperitoneal diária de ácido fólico (5 mg/Kg) (Lalonde et al., 1993) e/ou 2 injeções diárias de Hcy intraperitoneal (0,3-0,6 $\mu\text{mol/g p.c.}$) (Streck et al., 2002) do 6º ao 28º dias de vida. Os animais controles receberam semelhantes volumes de salina. Aos 80 dias, os animais foram mortos.

A LPO avaliada através do método de TBARS apresentou um aumento de 200% no grupo III em relação ao grupo I ($P < 0.001$). No grupo IV, os valores da LPO foram restabelecidos a níveis semelhantes ao grupo I (figura 7).

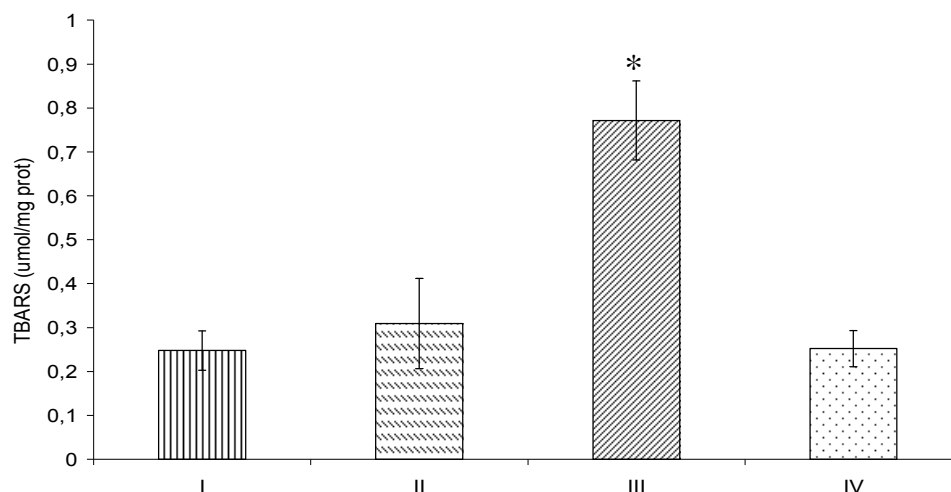


Figura 7: Lipoperoxidação avaliada por TBARS ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco. (*) $P < 0,001$ quando comparado aos demais grupos. Utilizando média \pm dpm e ANOVA. I = salina (n=8), II = folato (n=6), III = homocisteína (n=9), IV = folato + homocisteína (n=7).

O dano à proteína foi avaliado pela técnica de dosagem de carbonilas. Observamos na figura 8 um dano 50% maior no grupo III quando comparado ao grupo I ($P = 0,002$). E, novamente, o grupo que recebeu folato (IV) restabeleceu os valores a níveis semelhantes ao grupo I.

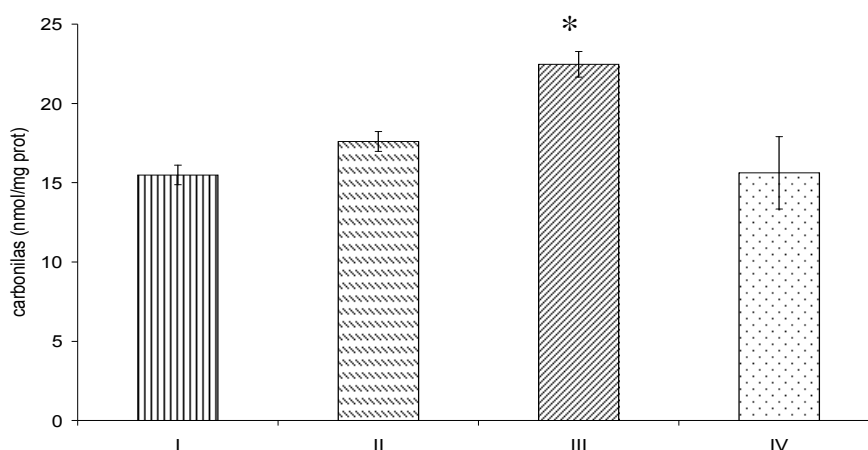


Figura 8: Análise de carbonilas (proteínas oxidadas) ($\eta\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco. (*) $P < 0,002$ quando comparado aos demais grupos. Utilizando média \pm dpm e ANOVA. I = salina (n=8), II = folato (n=6), III = homocisteína (n=9), IV = folato + homocisteína (n=7).

As atividades enzimáticas antioxidantes avaliadas foram a catalase, SOD e GST. Na figura 9, observa-se que a catalase teve sua atividade aumentada em 300% no grupo III quando comparada aos demais grupos ($P<0,001$).

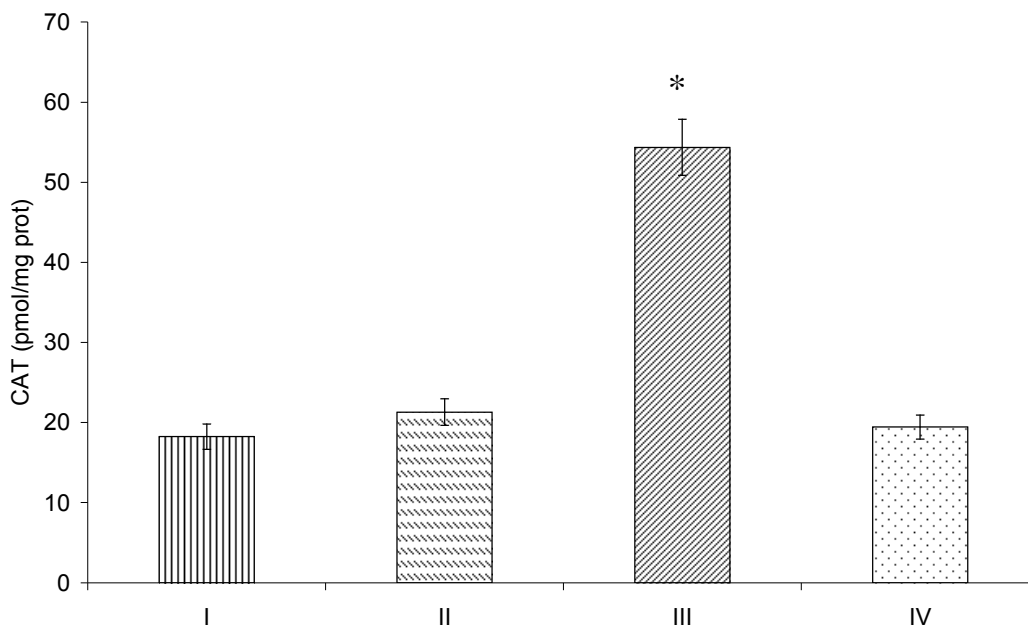


Figura 9: Atividade da catalase ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco. (*) $P<0,001$ quando comparado aos demais grupos. Utilizando média \pm dpm e ANOVA. I = salina (n=8), II = folato (n=6), III = homocisteína (n=9), IV = folato + homocisteína (n=7).

Quando correlacionamos a lipoperoxidação, avaliada pelo método TBARS, com a atividade da enzima catalase observamos uma importante correlação positiva ($r=0,7678$; $p<0,0001$). Mostrando que os animais que tiveram aumento de lipoperoxidação apresentaram a atividade da catalase aumentada (figura 10).

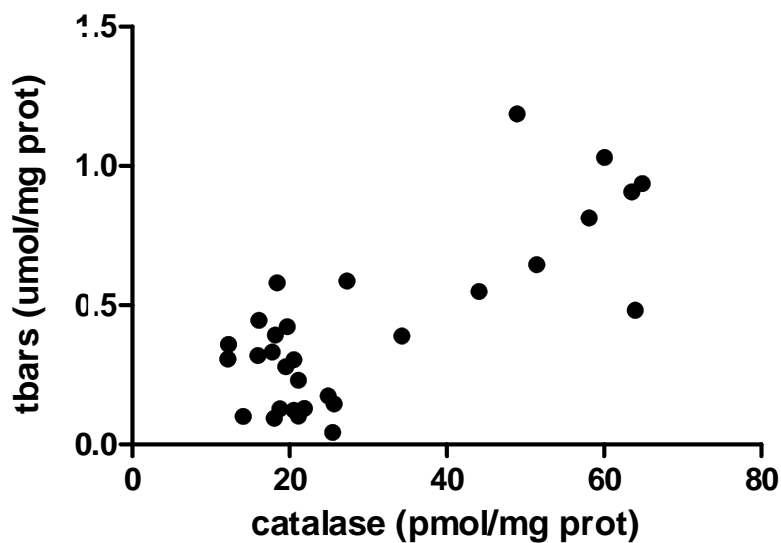


Figura 10: Correlação entre o TBARS ($\mu\text{mol/mg prot}$) e a atividade da Catalase ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco. ($r=0,7678$; $p<0,0001$)

A SOD teve sua atividade diminuída em 22% no grupo III e 20% no grupo IV quando comparada ao grupo I ($P<0,05$). Mostrando que a Hcy reduz a atividade da SOD e o tratamento com folato não restabelece a atividade desta enzima (figura 11).

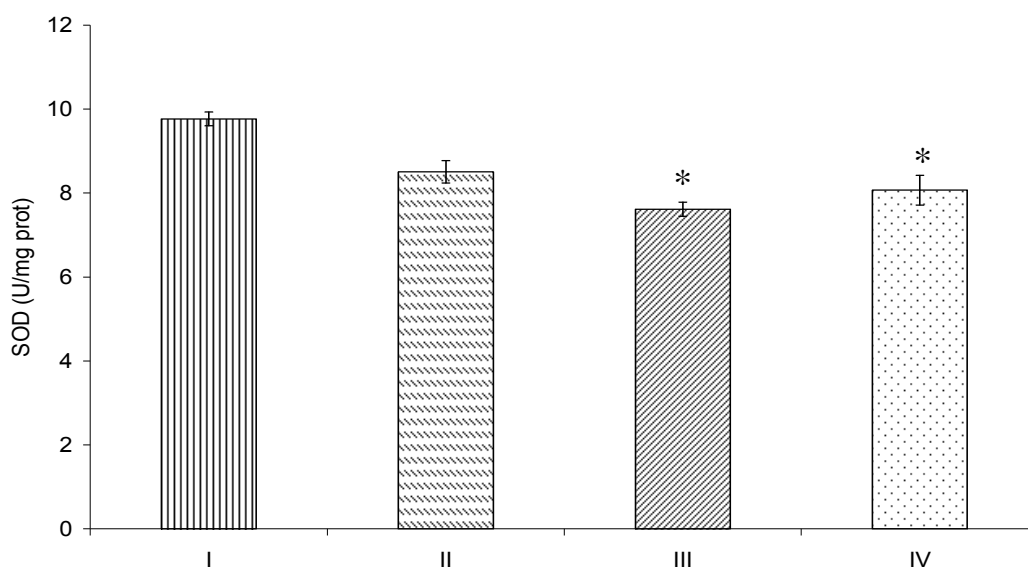


Figura 11: Atividade da SOD (U/mg prot) em homogeneizado cardíaco.

(*) $P<0,05$ quando comparado ao grupo I. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

I = salina (n=8), II = folato (n=6), III = homocisteína (n=9), IV = folato + hcy (n=7).

Já a atividade da enzima antioxidante GST apresentou um aumento de 80% no grupo III quando comparada aos demais grupos ($P<0,002$). Ou seja, o tratamento com folato (grupo IV) reverteu o aumento da atividade da GST causado pela Hcy (figura 12).

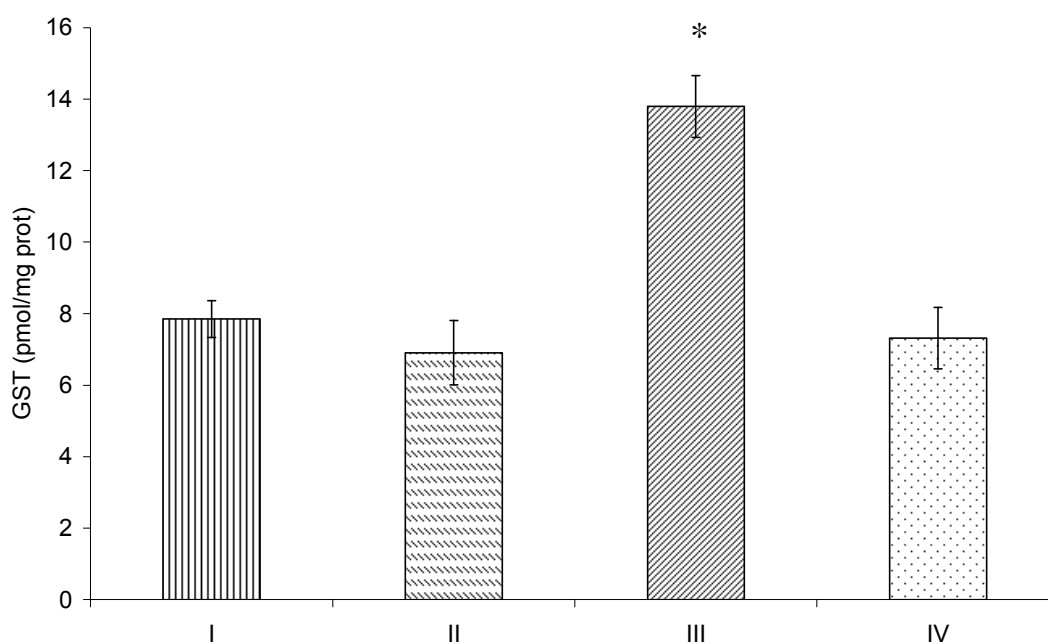


Figura 12: Atividade da GST ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco.

(*) $P<0,002$ quando comparado aos demais grupos. Utilizando média \pm dpm e ANOVA. I = salina (n=8), II = folato (n=6), III = homocisteína (n=9), IV = folato + hcy (n=7).

5.3 EXPERIMENTO 3:

Os animais (ratas 50 dias) foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais (n=8/grupo):

Grupo I - NAIVE controle: intactas, recebendo solução salina.

Grupo II - NAIVE Hcy: intactas, tratadas com homocisteína.

Grupo III - Sham controle: submetidas à cirurgia fictícia de castração, recebendo solução salina.

Grupo IV - Sham Hcy: submetidas à cirurgia fictícia de castração, tratadas com homocisteína.

Grupo V – Castrada controle: castradas, recebendo solução salina.

Grupo VI - Castrada Hcy: castradas, tratadas com homocisteína.

Estes grupos de ratas adultas foram castradas no 50º dia de vida e receberam tratamento agudo com homocisteína (0,6 $\mu\text{mol/g}$ peso) de 8 em 8 horas por 72 horas e foram mortos 1 hora após a última injeção.

Dosagem Hormonal:

Os hormônios foram medidos para que houvesse uma avaliação da variação hormonal após a castração. Para isso, foram medidos os níveis de 17 β -estradiol.

Os níveis hormonais foram avaliados (em pg / mL) no plasma. Observou-se significativa redução dos níveis de 17 β -estradiol no grupo castrado em relação ao controle (Figura 13). Os níveis de 17 β -estradiol foram 53% menores no grupo III (14,3 \pm 1,1) em relação ao grupo V (30,7 \pm 2,8).

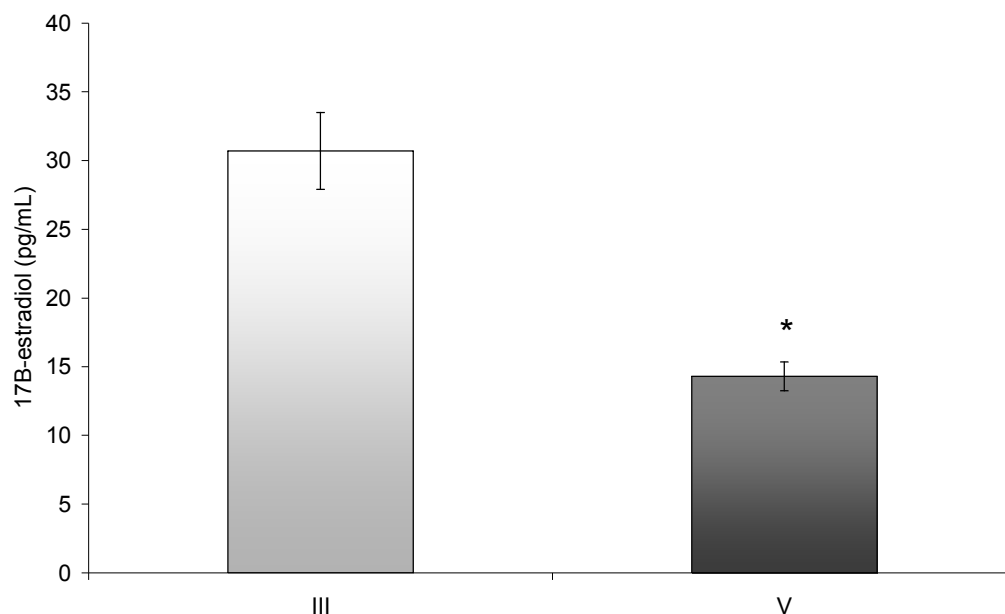


Figura 13: Dosagem de 17 β -estradiol (em pg/mL) em plasma. III - Sham Controle (n=6) e V - castrada controle (n=6).

(*) $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (III). Utilizando média \pm dpm e test t student.

Pressão Arterial Média e Freqüência Cardíaca:

Observamos uma diferença significativa na pressão arterial média (mmHg) quando comparamos o grupo VI com o grupo V, mostrando que a Hcy, na ausência de estrogênio, aumenta a PAM. Já a freqüência cardíaca (bpm) não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1: Pressão arterial média (mmHg) e freqüência cardíaca (bpm) I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy. (n=4/grupo)

| | I | II | III | IV | V | VI |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| PAM | 84,3 \pm 2,8 | 85,5 \pm 3,8 | 84,3 \pm 3,5 | 91,2 \pm 3,3 | 85,0 \pm 3,0 | 96,2 \pm 2,2* |
| FC | 337 \pm 20 | 366 \pm 24 | 357 \pm 24 | 361 \pm 34 | 352 \pm 25 | 387 \pm 20 |

(*) $P < 0.05$ quando comparamos o grupo VI ao grupo V (teste t student).

5.3.1 CORAÇÃO:

A análise dos metabólitos do NO em tecido cardíaco apresentou-se aumentada no grupo VI em relação ao grupo I (67%), IV (21%) V (45%), observado na figura 14, os demais grupos não apresentaram diferenças significativas.

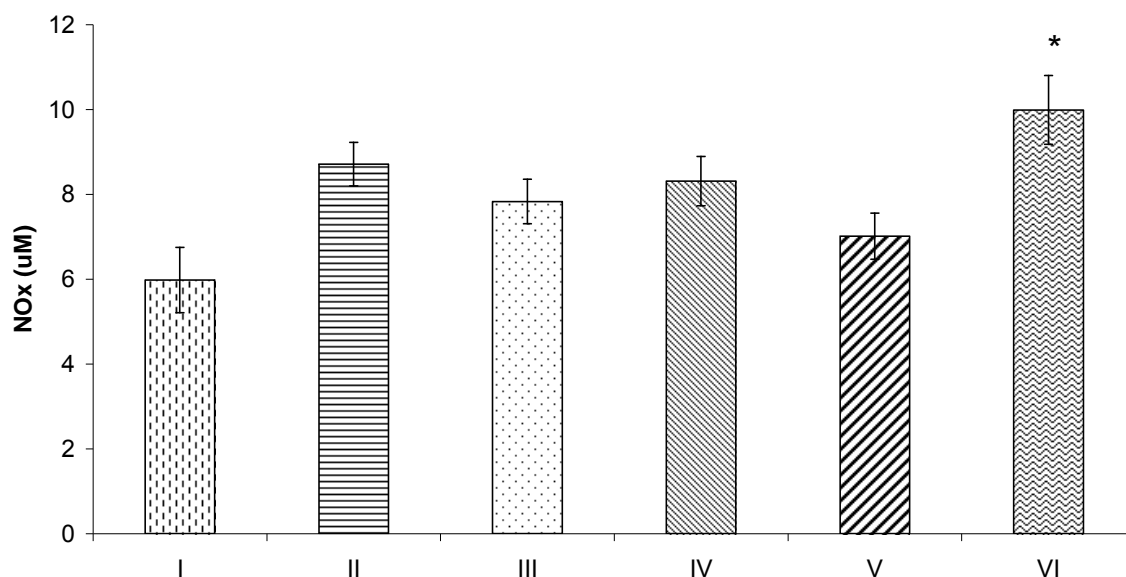


Figura 14: Nitratos+Nitritos (μM) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI - Castrada Hcy.

(*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos I, IV e V. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

Quando comparamos os níveis de nitratos com a pressão arterial observamos uma correlação positiva ($r=0,7565$; $p < 0,0001$). Mostrando que os

animais que tiveram níveis aumentados de nitratos também apresentaram aumento na pressão arterial (figura 15).

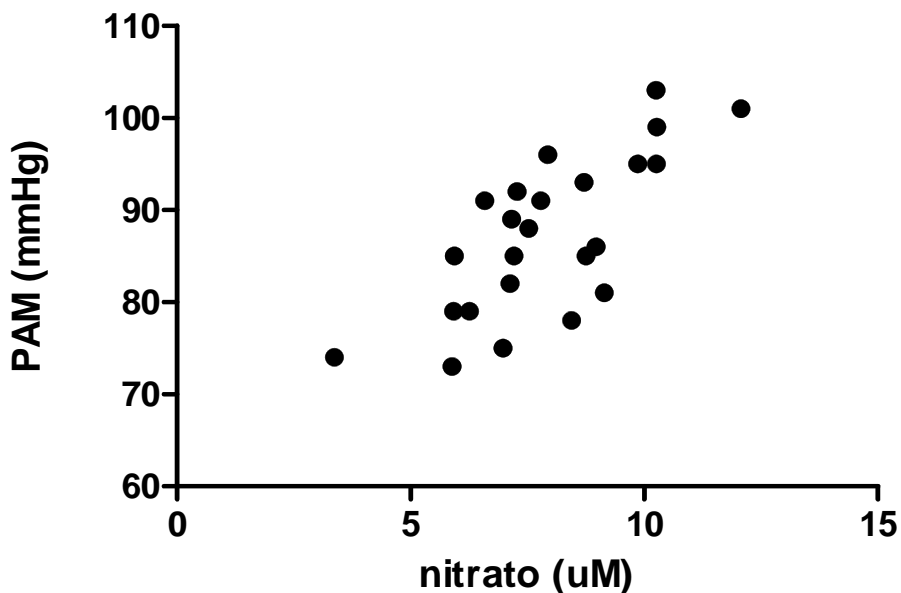


Figura 15: Correlação entre os níveis de nitratos (μM) e pressão arterial média (mmHg) em homogeneizado cardíaco. ($r=0,7565$; $p<0,0001$), foram utilizados os 24 animais que tinham registro de pressão.

A LPO apresentou-se aumentada no grupo VI em relação aos grupos II (40%), IV (48%) e V (70%), como mostra a figura 16, os demais grupos estudados não apresentaram diferenças significativas entre si.

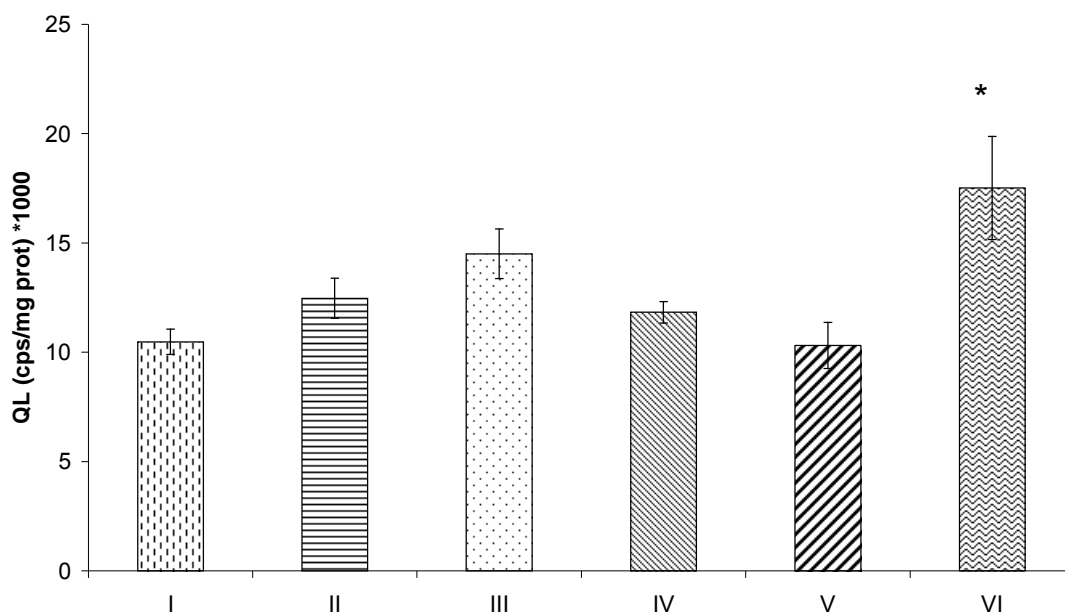


Figura 16: Lipoperoxidação avaliada por quimiluminescência (cps/mg prot) em homogeneizado cardíaco (n=8/grupo). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy.

(*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos II, IV e V. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

Observamos uma correlação positiva ($r=0,8498$; $p < 0,0001$) entre a quimiluminescência e a PAM, demonstrando que os animais que tiveram aumento da lipoperoxidação foram os mesmos que apresentaram a pressão arterial elevada. Sugerindo que o aumento da pressão pode estar sendo provocado pelas EAO (figura 17).

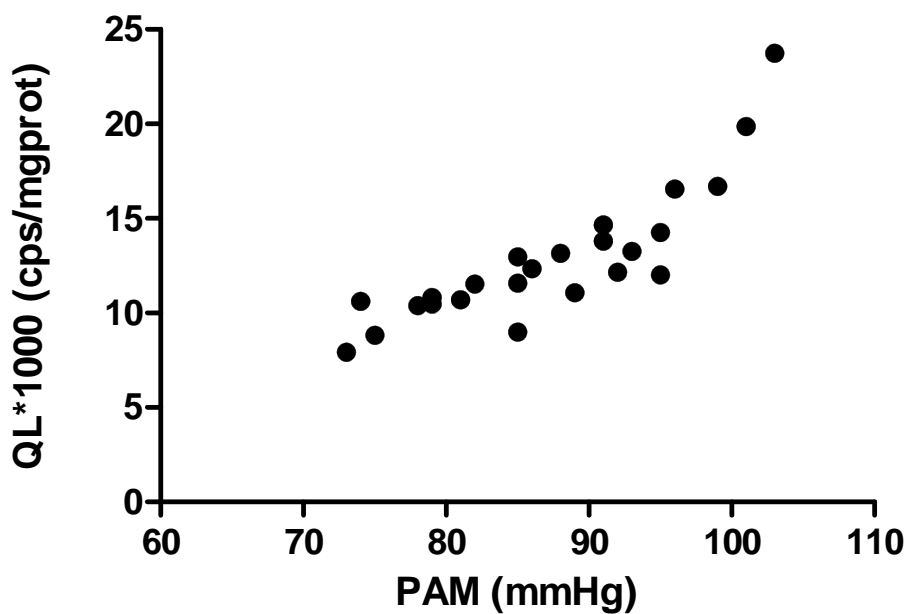


Figura 17: Correlação entre quimiluminescência (cps/mg prot) e pressão arterial média (mmHg) em homogeneizado cardíaco. ($r=0,8498$; $p<0,0001$), foram utilizados os 24 animais que tinham registro de pressão.

Na figura 18, observamos que a oxidação de proteínas, avaliada pelo método das carbonilas, não houve diferenças significativas na oxidação de proteínas entre os grupos estudados.

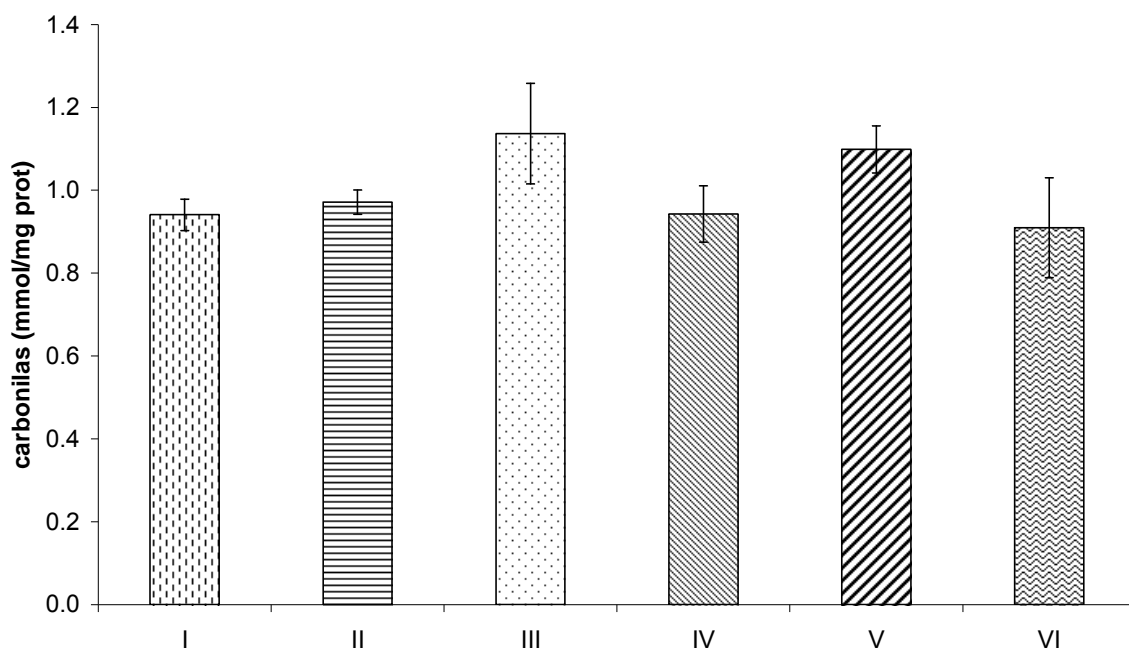


Figura 18: Análise de carbonilas (mmol/mg prot) em homogeneizado cardíaco (n=8/grupo). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy.

A capacidade antioxidante total, avaliada pela técnica do TRAP (figura 19), apresentou-se diminuída no grupo VI em relação aos grupos II (74%), IV (52%) e V (50%).

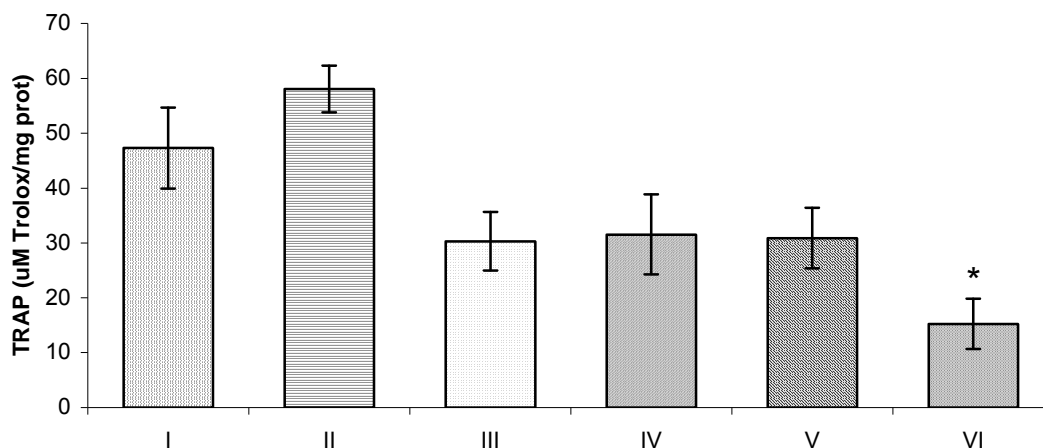


Figura 19: Análise do TRAP (μM trolox/mg prot) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy. (*) $P<0,05$ quando comparado aos grupos II, IV e V. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

A atividade da enzima GST diminuiu no grupo VI em relação aos grupos II (60%), IV (74%) e V (74%), figura 20.

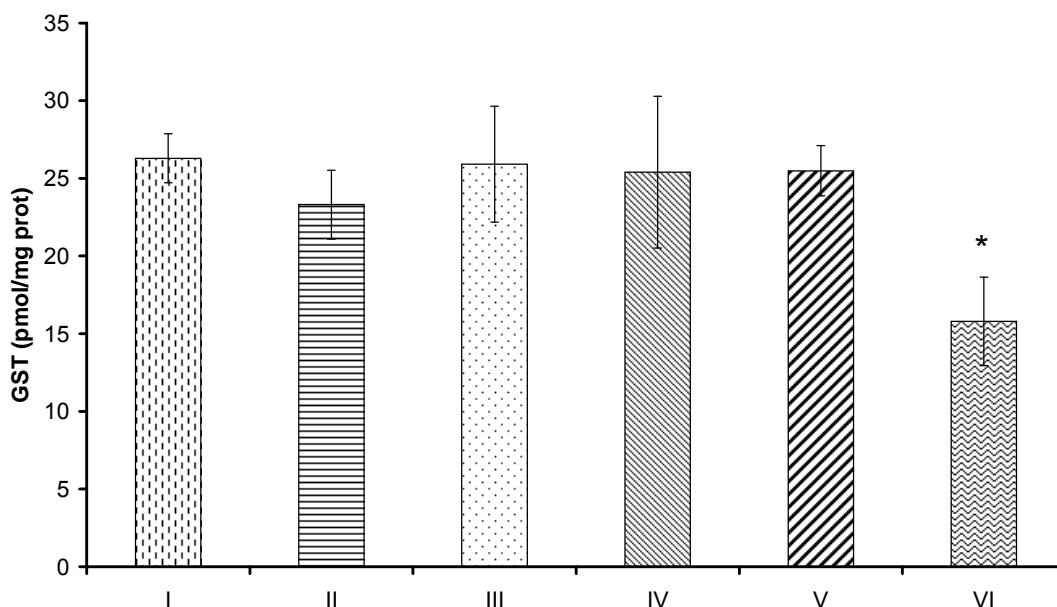


Figura 20: Atividade da GST ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy. (*) $P<0.05$ quando comparado aos grupos II, IV e V. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

Aqui também observamos uma correlação negativa ($r=0,6520$; $p<0,0006$) entre a atividade da enzima GST e a lipoperoxidação. Mostrando que os animais que tiveram aumento de lipoperoxidação apresentaram a GST diminuída (figura 21).

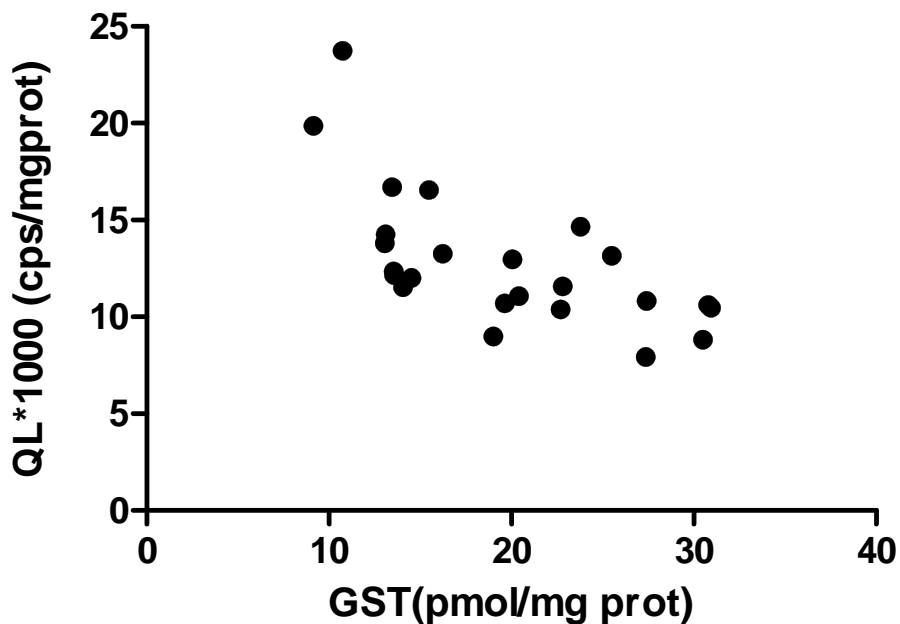


Figura 21: Correlação entre quimiluminescência (cps/mg prot) e a atividade da GST ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco. ($r=0,6520$; $p<0,0006$)

A atividade de enzima antioxidante GPx diminuiu no grupo VI em relação ao grupo V (40%). Em relação aos demais grupos, não houve diferenças significativas (figura 22).

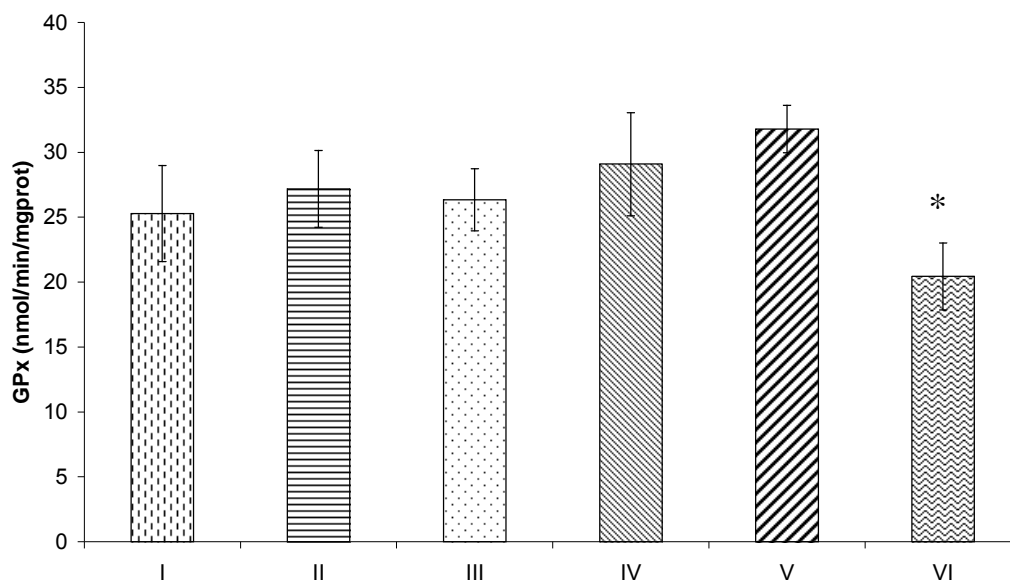


Figura 22: Atividade da GPx ($\eta\text{mol/min/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy.

(*) $P < 0,05$ quando comparado ao grupo V. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

As enzimas SOD e CAT não apresentaram diferenças significativas nas suas atividades entre os grupos estudados (tabela 2).

Tabela 2: Atividade das enzimas SOD (U/mg prot) e catalase ($\rho\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy.

| | SOD | CAT |
|-----|------------------|------------------|
| I | 9,90 \pm 1,72 | 26,50 \pm 3,16 |
| II | 12,04 \pm 1,25 | 28,92 \pm 2,16 |
| III | 17,19 \pm 3,84 | 27,59 \pm 3,97 |
| IV | 12,29 \pm 1,33 | 29,29 \pm 2,60 |
| V | 15,21 \pm 3,51 | 23,74 \pm 2,90 |
| VI | 10,32 \pm 0,91 | 34,06 \pm 4,32 |

5.3.2 AORTA:

A atividade da enzima GST em aorta diminuiu no grupo VI em relação aos grupos II (54%) e IV (59%). Já os grupos II e IV apresentaram-se aumentados em relação aos seus respectivos controles I (93%) e III (137%). O grupo VI não diferiu do seu grupo controle V (figura 23).

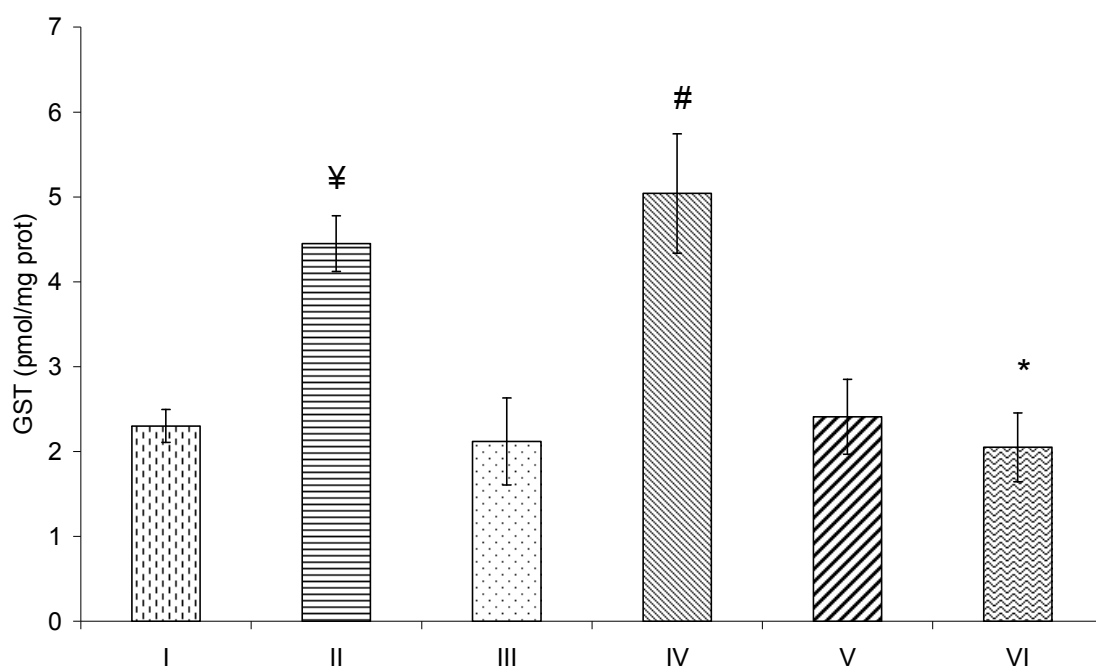


Figura 23: Atividade da GST ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado de aorta ($n=6/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI - Castrada Hcy. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

(*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos II e IV.

(#) $P < 0,05$ quando comparado ao grupo III.

(¥) $P < 0,05$ quando comparado ao grupo I.

A atividade da enzima antioxidante GPx aumentou no grupo VI em relação ao grupo II (100%); o grupo IV também apresentou-se aumentado em relação ao grupo II (70%). O grupo V apresentou-se aumentado em relação ao grupo I (82%) (figura 24).

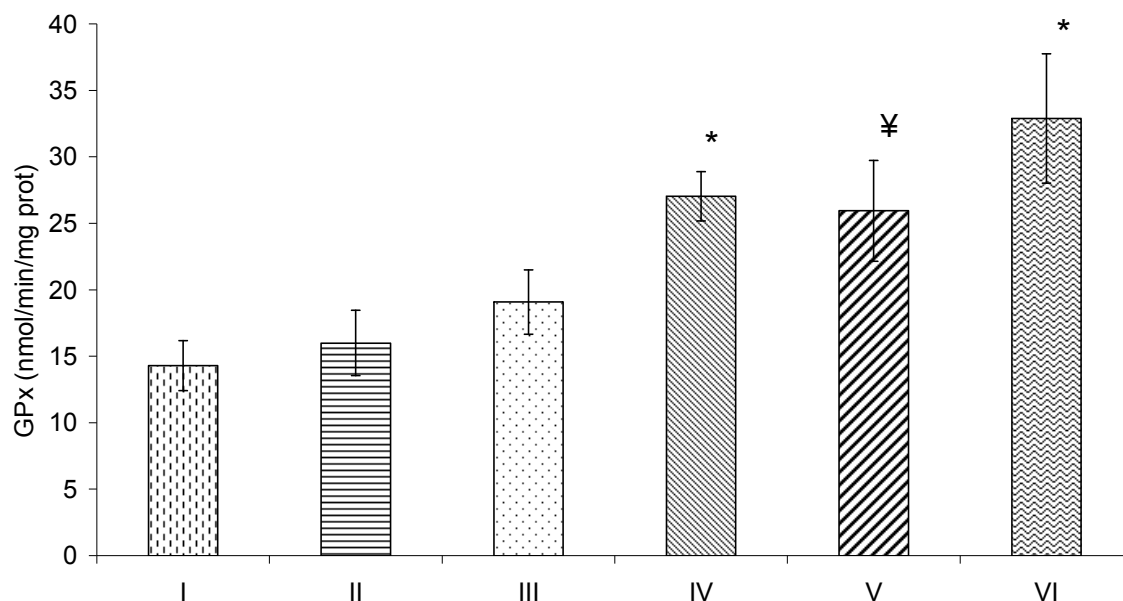


Figura 24: Atividade da GPx (η mol/min/mg prot) em homogeneizado de aorta ($n=6$ /grupo). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

(*) $P<0,05$ quando comparado ao grupo II.

(¥) $P<0,05$ quando comparado ao grupo I.

5.3.3 SANGUE:

A análise dos metabólitos de NO em plasma, figura 25, apresentou-se diminuída no grupo VI em relação ao grupo V (40%), os demais grupos não apresentaram diferenças significativas.

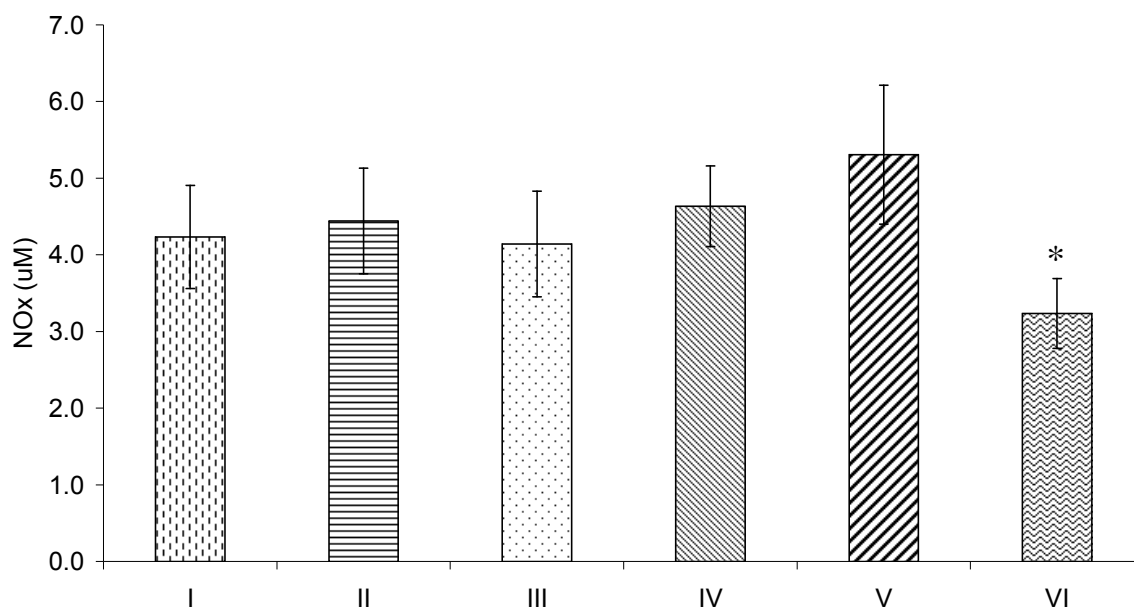


Figura 25: A – Nitratos+Nitritos (μM) em plasma ($n=8/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy.

(*) $P<0,05$ quando comparado ao grupo V. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

A LPO apresentou-se diminuída no grupo VI em relação aos grupos IV (43%) e V (42%). O grupo II também se apresentou diminuído em relação ao grupo I (33%). Os demais grupos estudados não apresentaram diferenças significativas entre si (figura 26).

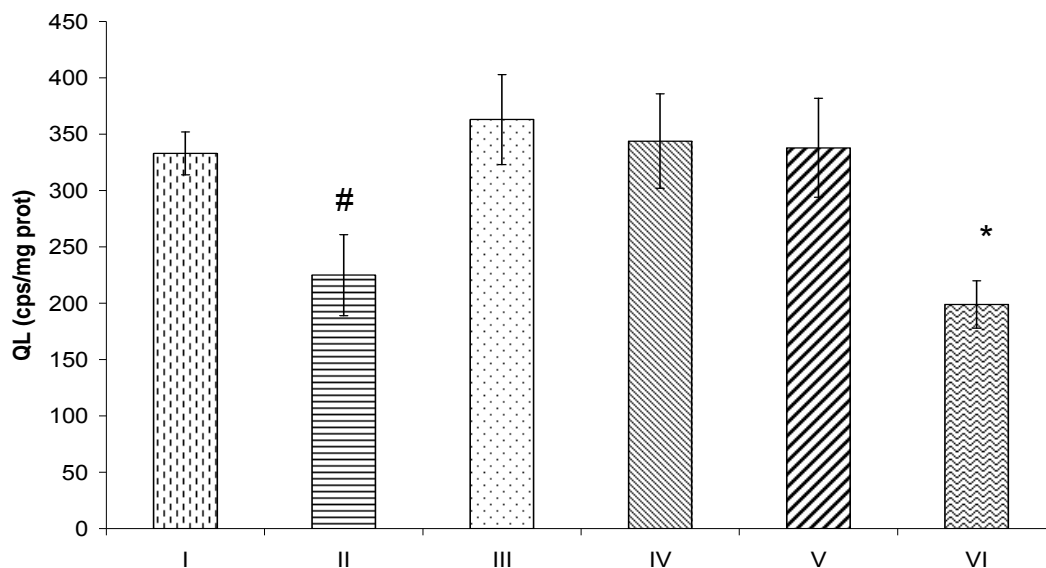


Figura 26: Lipoperoxidação avaliada por quimiluminescência (cps/mg prot) em eritrócitos (n=8/grupo). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy. Utilizando média±dpm e ANOVA.

(*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos IV e V.

(#) $P < 0,05$ quando comparado ao grupo I.

A atividade da enzima GST diminuiu no grupo VI em relação ao grupo II (58%) (figura 27), no entanto não apresentou diferença significativa com os demais grupos. As enzimas antioxidantes SOD e CAT não apresentaram diferenças significativas nas suas atividades entre os grupos estudados (tabela 3).

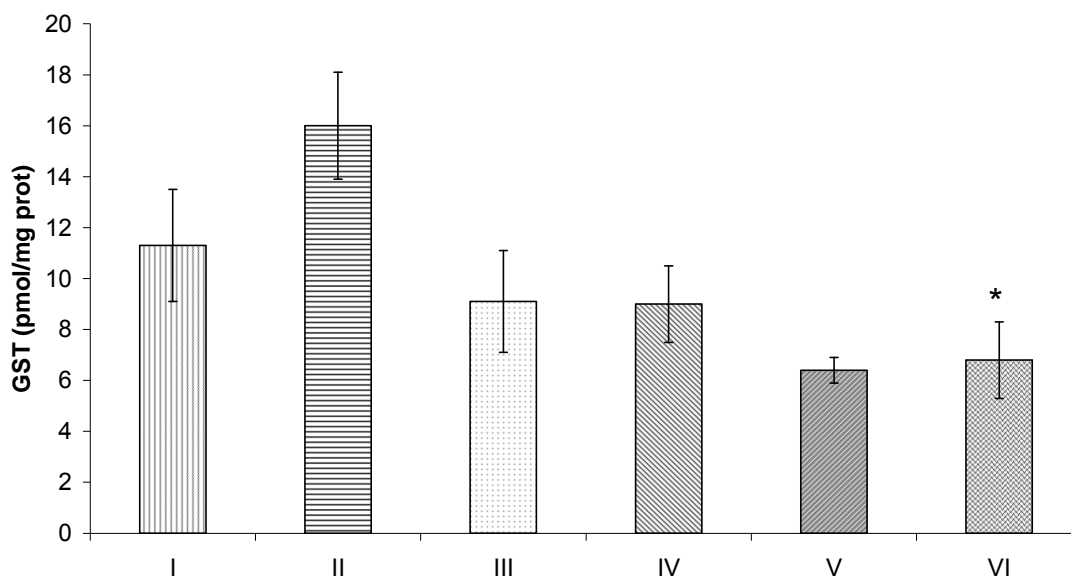


Figura 27: Atividade da GST ($\mu\text{mol/mg prot}$) em eritrócitos ($n=8/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy.

(*) $P < 0,05$ quando comparado ao grupo II. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

Tabela 3: Atividade das enzimas SOD (U/mg prot) e catalase ($\mu\text{mol/mg prot}$) em eritrócitos ($n=8/\text{grupo}$). I - NAIVE controle, II - NAIVE Hcy, III - Sham Controle, IV - Sham Hcy, V - Castrada controle e VI – Castrada Hcy.

| | SOD | CAT |
|-----|------------------|------------------|
| I | 12,88 \pm 3,01 | 11,18 \pm 0,67 |
| II | 11,15 \pm 1,60 | 15,25 \pm 2,48 |
| III | 11,53 \pm 1,64 | 15,73 \pm 2,30 |
| IV | 16,35 \pm 2,33 | 12,86 \pm 2,73 |
| V | 10,73 \pm 2,02 | 19,22 \pm 2,73 |
| VI | 17,82 \pm 2,48 | 19,54 \pm 1,84 |

5.4 EXPERIMENTO 4:

Os animais (ratas de 70 dias) foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais (n=8/grupo):

Grupo I – Sham controle: fêmeas submetidas à cirurgia fictícia de castração e que receberam água “ad libitum”.

Grupo II – Castrada controle: fêmeas castradas e que receberam água “ad libitum”.

Grupo III – Sham metionina: fêmeas submetidas à cirurgia fictícia de castração, submetidas ao tratamento com metionina.

Grupo IV – Castrada metionina: fêmeas castradas, submetidas ao tratamento com metionina.

Estes grupos de ratas adultas foram castradas no 70º dia de vida e receberam metionina na água de beber por 30 dias na dose de 1 g/kg/dia (Ungvari et al., 1999; Hagar, 2002). Ao final do tratamento foram anestesiadas, canuladas, para análise da hemodinâmica cardíaca, e mortas por deslocamento cervical.

Hemodinâmica Cardíaca:

Nestes animais, foi avaliada a pressão intraventricular esquerda e, na tabela 4, observamos os seguintes parâmetros: pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDFVE), pressão sistólica ventrículo esquerdo (PSVE), derivada positiva (+dP/dt), derivada negativa (-dP/dt), frequência cardíaca (FC) e hipertrofia cardíaca (HC). Observamos, na figura 28, que a PDFVE apresentou-se

aumentada no grupo IV em relação aos grupos I (108%), II (116%) e III (51%). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

Tabela 4: pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDFVE em mmHg), pressão sistólica ventrículo esquerdo (PSVE em mmHg), derivada positiva (+dP/dt em mmHg/s), derivada negativa (-dP/dt em mmHg/s), frequência cardíaca (FC em bpm) e hipertrofia cardíaca (HC em mg/g). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina. (n=8/grupo)

| | PDFVE | PSVE | -dP/dt | +dP/dt | FC | HC |
|-----|-------------|-------|-----------|----------|--------|-----------|
| I | 8,49±1,56 | 136±9 | -6014±332 | 7290±388 | 228±6 | 2,59±0,12 |
| II | 8,20±1,43 | 129±6 | -6763±132 | 6967±267 | 229±15 | 2,68±0,11 |
| III | 12,29±1,17 | 121±4 | -5425±328 | 6484±494 | 216±12 | 2,88±0,14 |
| IV | 18,55±1,46* | 132±8 | -5472±406 | 6725±223 | 233±9 | 2,68±0,13 |

(*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III. Utilizando média±dpm e ANOVA.

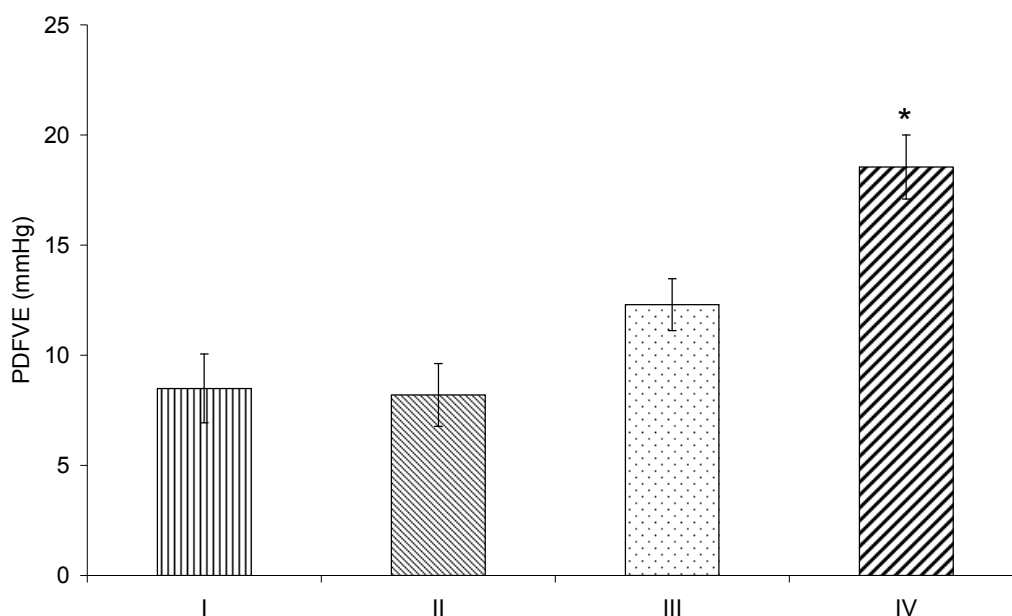


Figura 28: Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) em mmHg (n=8/grupo) I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

(*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III. Utilizando média±dpm e ANOVA.

5.4.1 CORAÇÃO:

A análise dos nitritos + nitratos em tecido cardíaco apresentou-se diminuída no grupo IV em relação ao grupo I (40%), II (36%), III (33%), observado na figura 29.

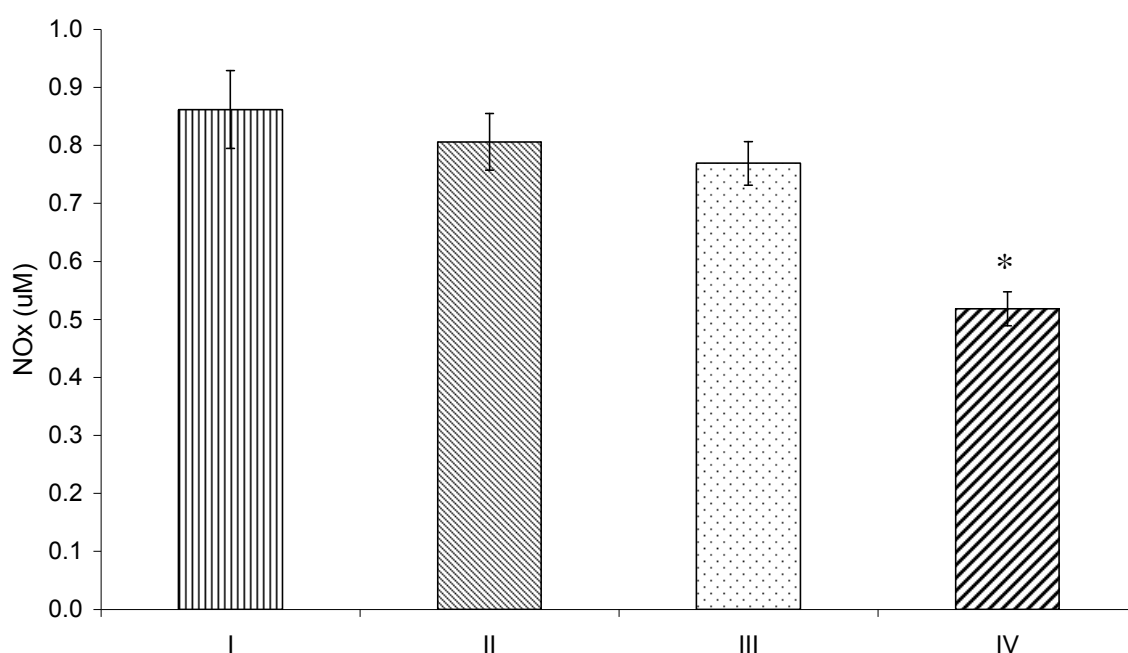


Figura 29: Nitratos+Nitritos (μM) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

(*) $P<0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

Observamos também que houve uma correlação negativa ($r=0,8708$; $p<0,0001$) entre a PDFVE e os metabólitos de NO, mostrando que os animais que tiveram aumento de pressão ventricular apresentaram uma menor biodisponibilidade do NO (figura 30).

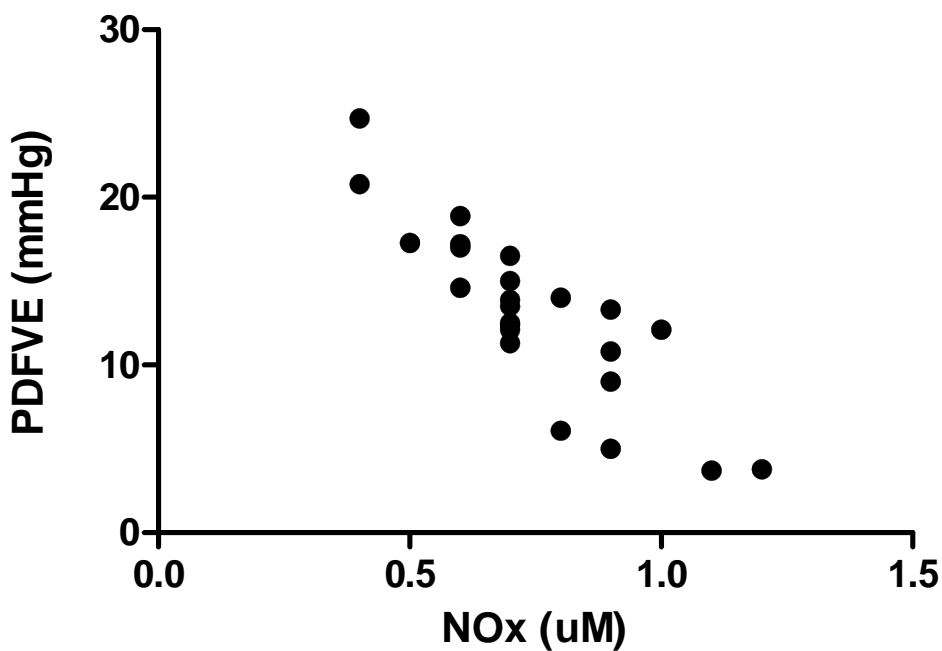


Figura 30: Correlação entre PDFVE (mmHg) e a NOx (μM) em homogeneizado cardíaco. ($r=0,8708$; $p<0,0001$)

A LPO avaliada pelo método das substâncias reativas ao ácido tio-barbitúrico (TBARS) apresentou-se aumentada no grupo IV em relação aos grupos I (200%), II (92%) e III (103%), como mostra a figura 31. Observamos ainda um aumento na LPO no grupo II em relação ao grupo I (50%).

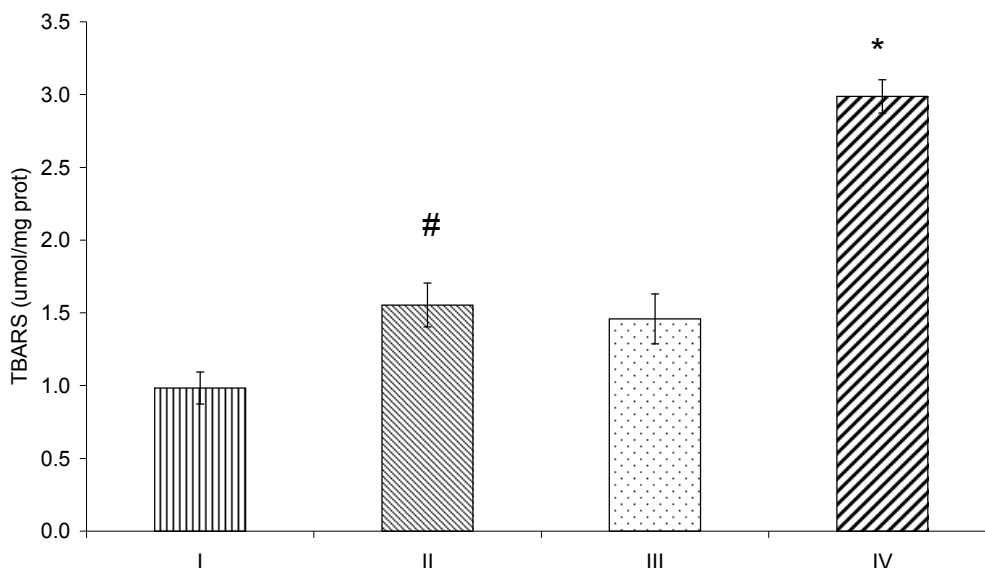


Figura 31: Lipoperoxidação avaliada por TBARS ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

(*) $P<0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III.

(#) $P<0,05$ quando comparado ao grupo I.

Observamos também que houve uma correlação positiva ($r=0,7956$; $p<0,0001$) entre a PDFVE e o TBARS, mostrando que os animais que tiveram aumento de pressão ventricular também apresentaram a lipoperoxidação aumentada (figura 32).

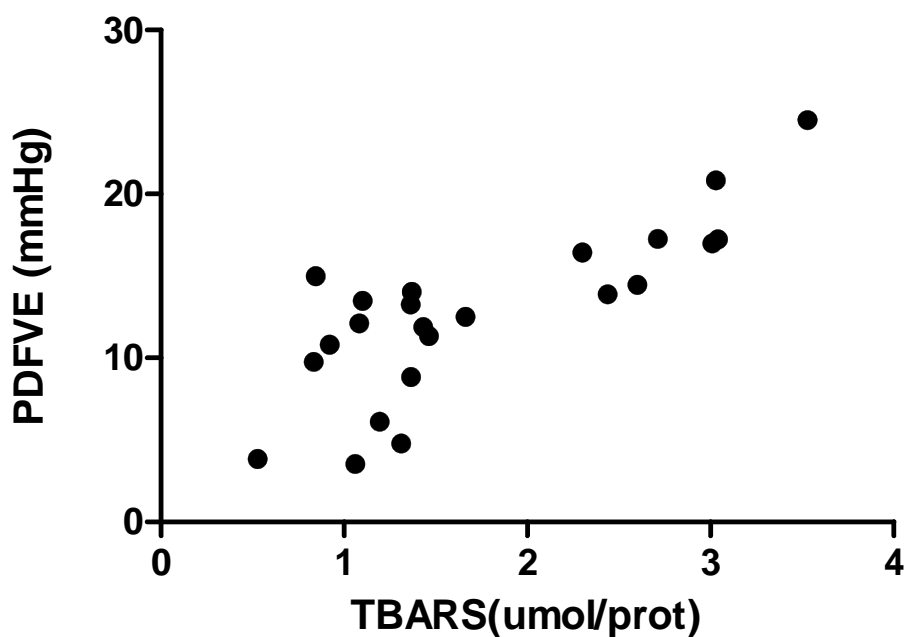


Figura 32: Correlação entre TBARS ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot) e PDFVE (mmHg) em homogeneizado cardíaco. ($r=0,7956$; $p<0,0001$)

Na figura 33, observamos que a oxidação de proteínas avaliada pelo método das carbonilas apresentou-se aumentada no grupo IV em relação aos grupos I (96%), II (110%) e III (66%); os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

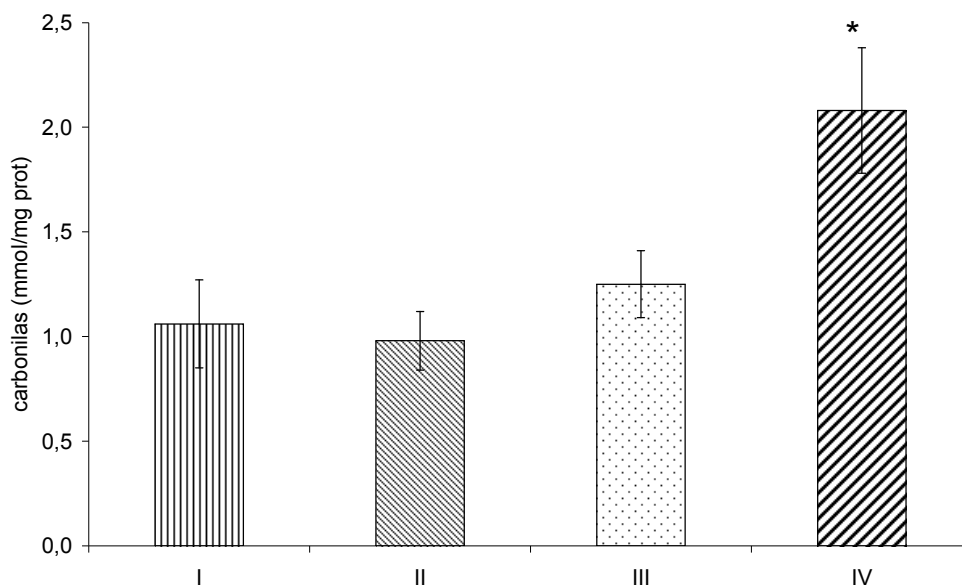


Figura 33: Análise de carbonilas (mmol/mg prot) em homogeneizado cardíaco (n=8/grupo). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina. (*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

A atividade da enzima GST aumentou no grupo IV em relação aos grupos I (31%) e II (50%); os demais grupos não mostraram diferenças significativas entre si (figura 34).

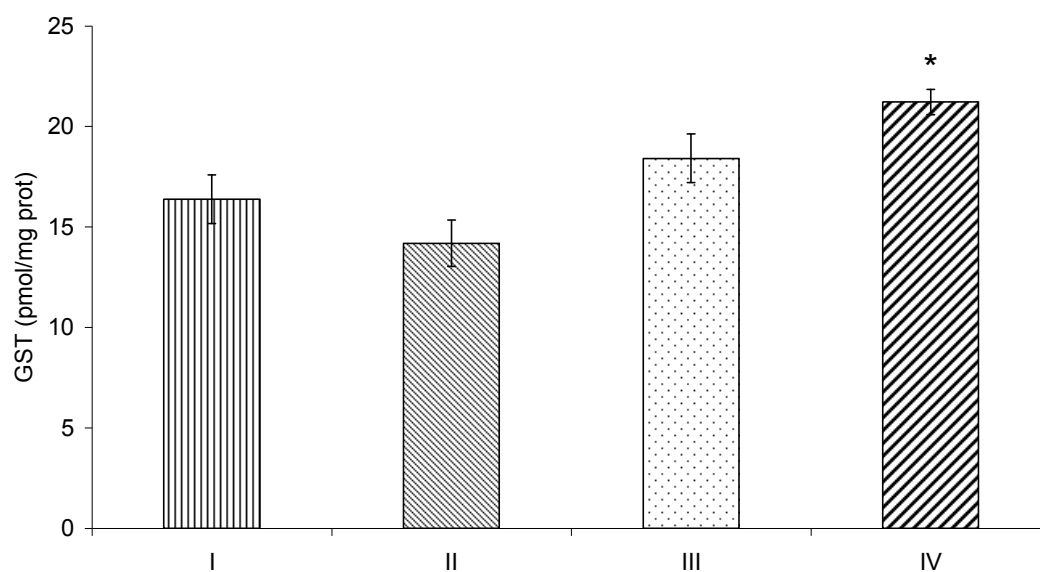


Figura 34: Atividade da GST ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

(*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos I e II. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

A atividade da enzima antioxidante GPx aumentou no grupo IV em relação aos grupos I (37%), II (34%) e III (25%); os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si (figura 35).

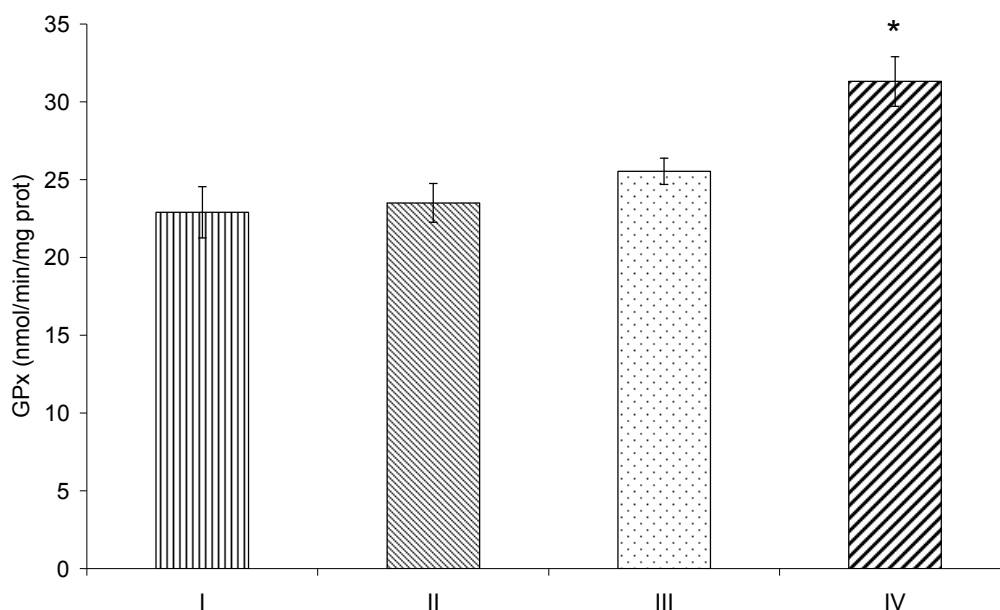


Figura 35: Atividade da GPx ($\eta\text{mol/min/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina. (*) $P<0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

Também observamos uma correlação positiva ($r=0,7936$; $p<0,0001$) entre a atividade da enzima GPx e a lipoperoxidação. Mostrando que os animais que tiveram aumento de lipoperoxidação apresentaram a GPx aumentada (figura 36).

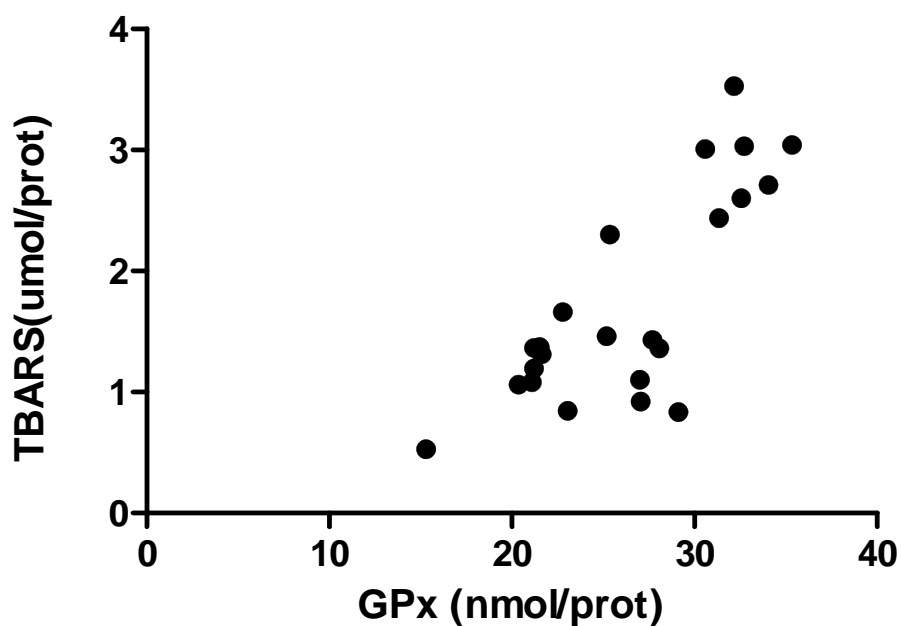


Figura 36: Correlação entre TBARS ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) e a atividade da GPx ($\text{nmol}/\text{mg prot}$) em homogeneizado cardíaco. ($r=0,7936$; $p<0,0001$)

A atividade de enzima antioxidante SOD aumentou no grupo IV em relação ao grupo III (36%); em relação aos demais grupos, não houve diferenças significativas (figura 37).

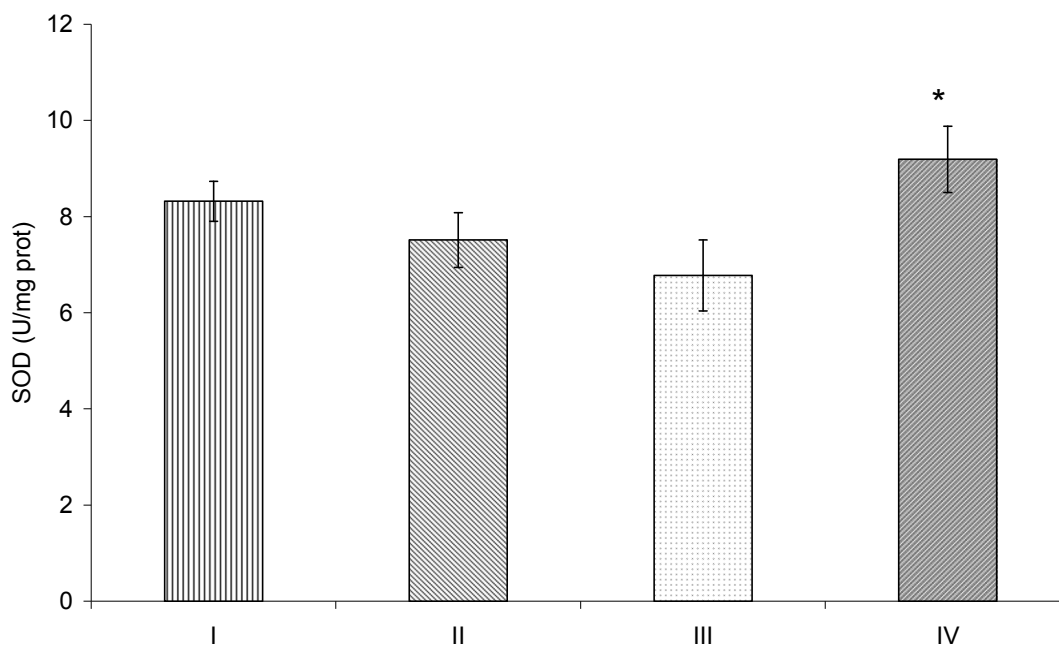


Figura 37: Atividade da SOD (U/mg prot) em homogeneizado cardíaco (n=8/grupo). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

(*) $P < 0,05$ quando comparado ao grupo III. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

A atividade de enzima antioxidante catalase aumentou no grupo IV em relação ao grupo III (26%); em relação aos demais grupos, não houve diferenças significativas (figura 38).

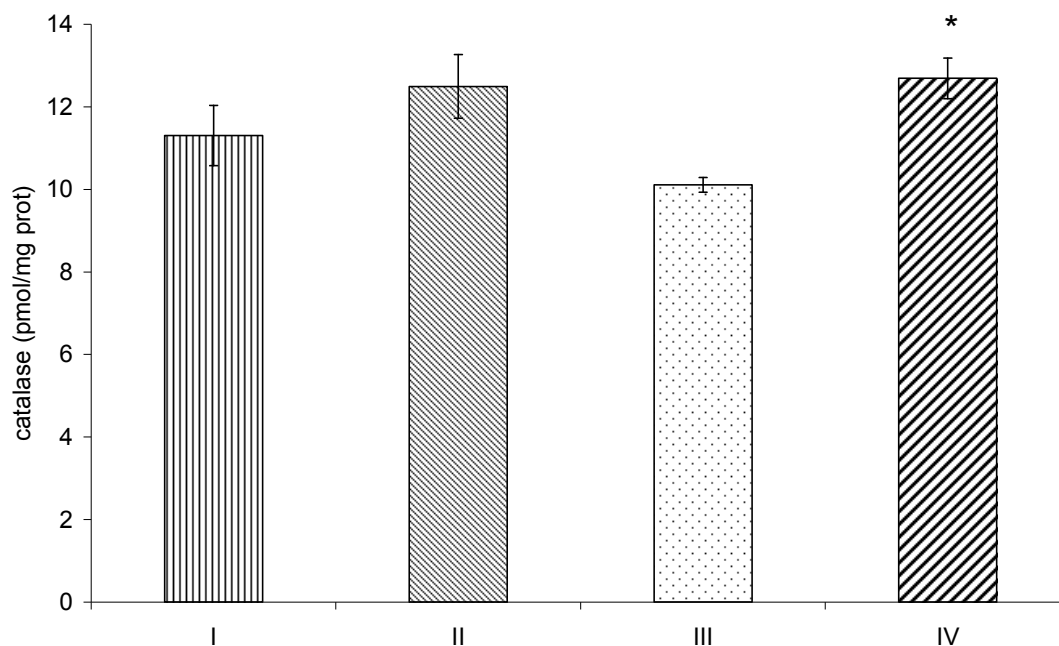


Figura 38: Atividade da catalase ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado cardíaco ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

(*) $P < 0,05$ quando comparado ao grupo III. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

5.4.2 FÍGADO:

A análise dos metabólitos do NO em tecido hepático, figura 39, não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados.

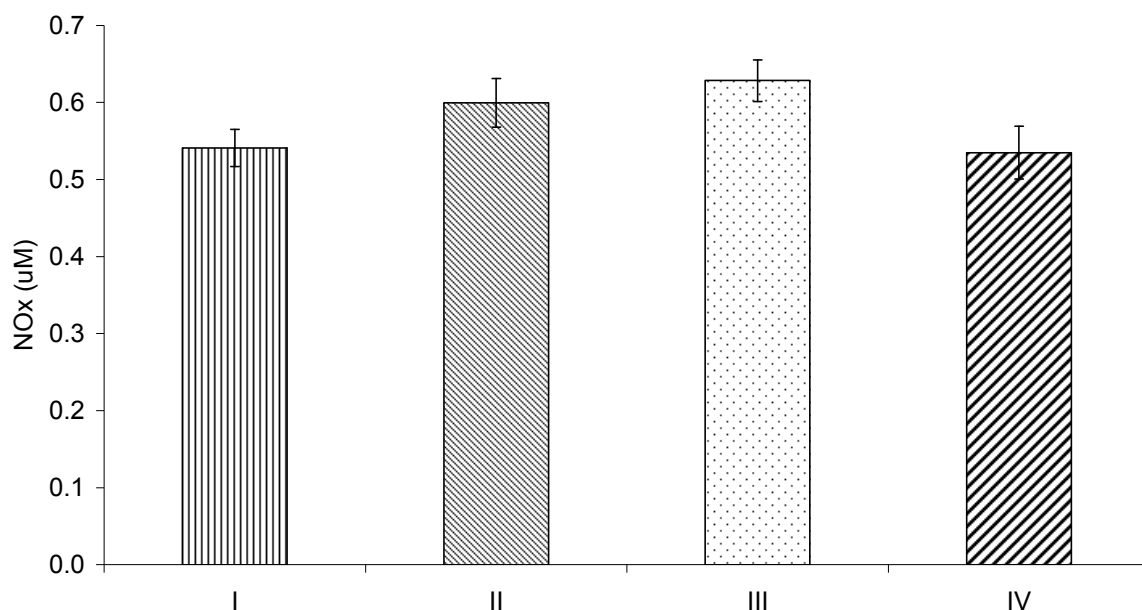


Figura 39: A – Nitratos+Nitritos (μM) em homogeneizado hepático ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

A LPO avaliada pelo método das substâncias reativas ao ácido tio-barbitúrico (TBARS) apresentou-se aumentada no grupo IV em relação aos grupos I (180%), II (77%) e III (180%), como mostra a figura 40. Observamos ainda um aumento na LPO no grupo II em relação ao grupo I (60%).

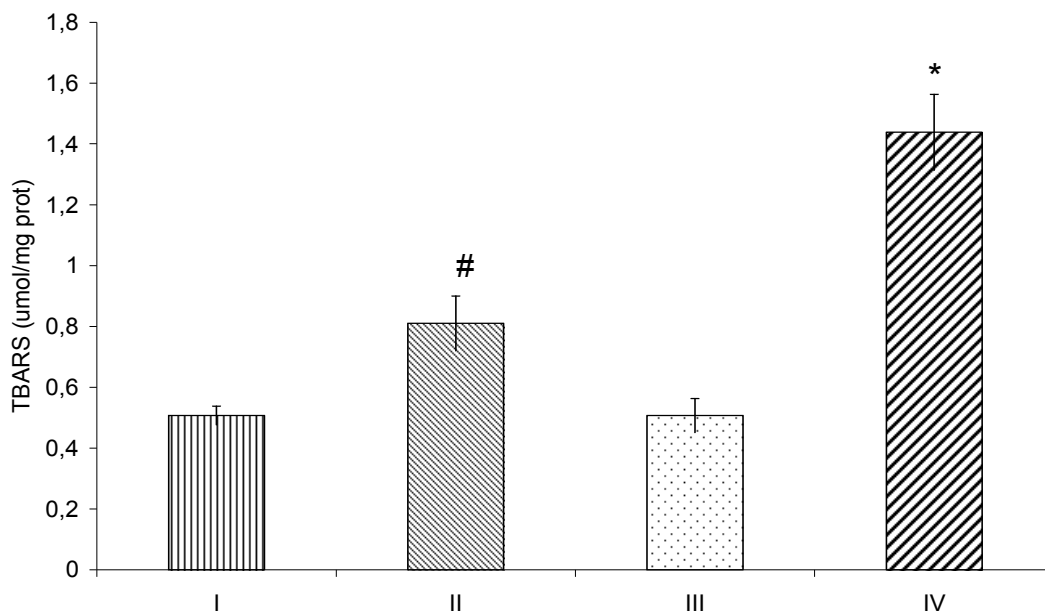


Figura 40: Lipoperoxidação avaliada por TBARS ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado hepático ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

(*) $P<0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III.

(#) $P<0,05$ quando comparado ao grupo I.

Na figura 41, observamos que a oxidação de proteínas avaliada pelo método das carbonilas apresentou-se aumentada no grupo IV em relação aos grupos I (196%), II (127%) e III (89%); os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

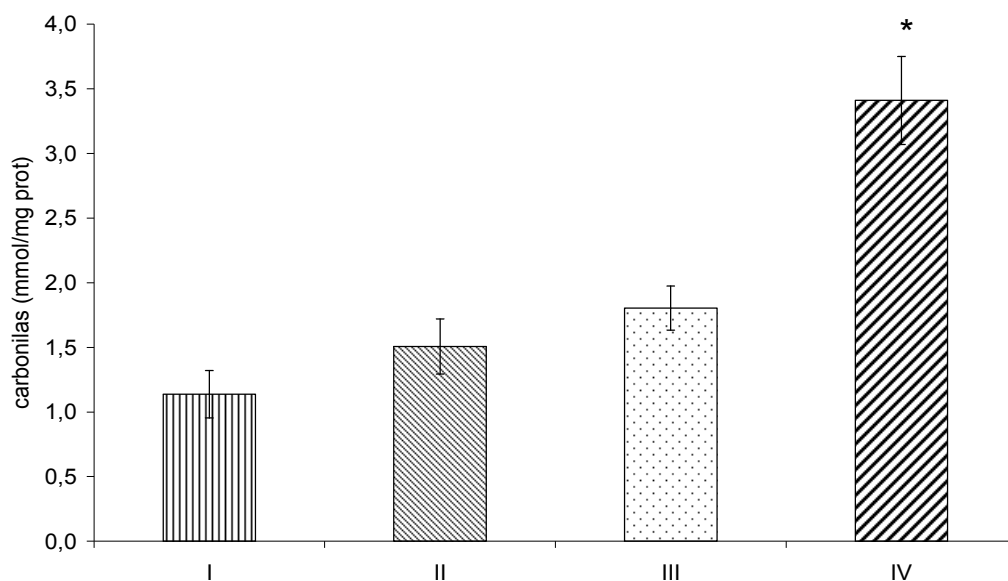


Figura 41: Análise de carbonilas (mmol/mg prot) em homogeneizado hepático (n=8/grupo). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina. (*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

A atividade da enzima GST diminuiu no grupo IV em relação ao grupo I (30%); em relação aos demais grupos, não houve diferenças significativas (figura 42).

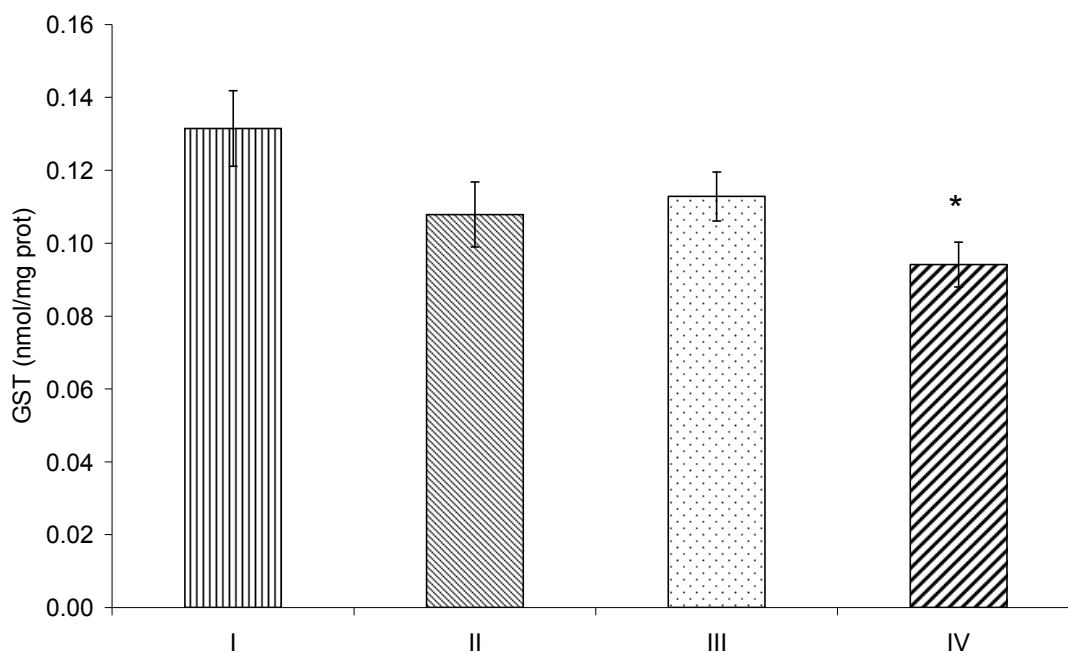


Figura 42: Atividade da GST ($\eta\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado hepático ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

(*) $P < 0,05$ quando comparado ao grupo I. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

A atividade de enzima antioxidante GPx não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados, figura 43.

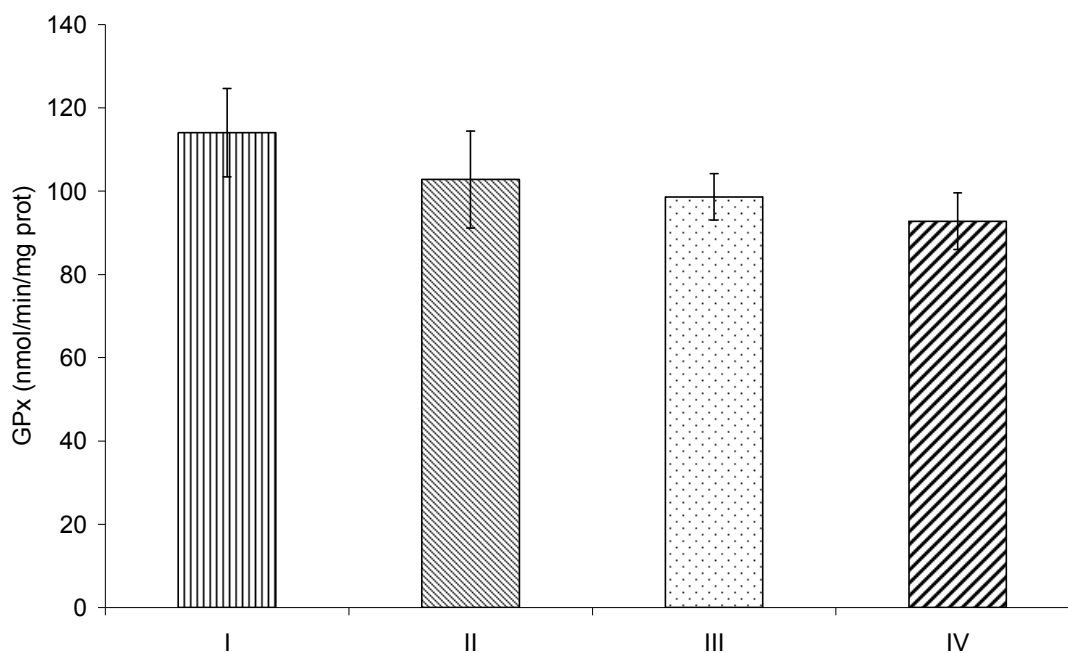


Figura 43: Atividade da GPx (η mol/min/mg prot) em homogeneizado hepático (n=8/grupo). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

A atividade de enzima antioxidante SOD diminuiu no grupo IV em relação aos grupos I (30%), II (20%) e III (26%); os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si (figura 44).

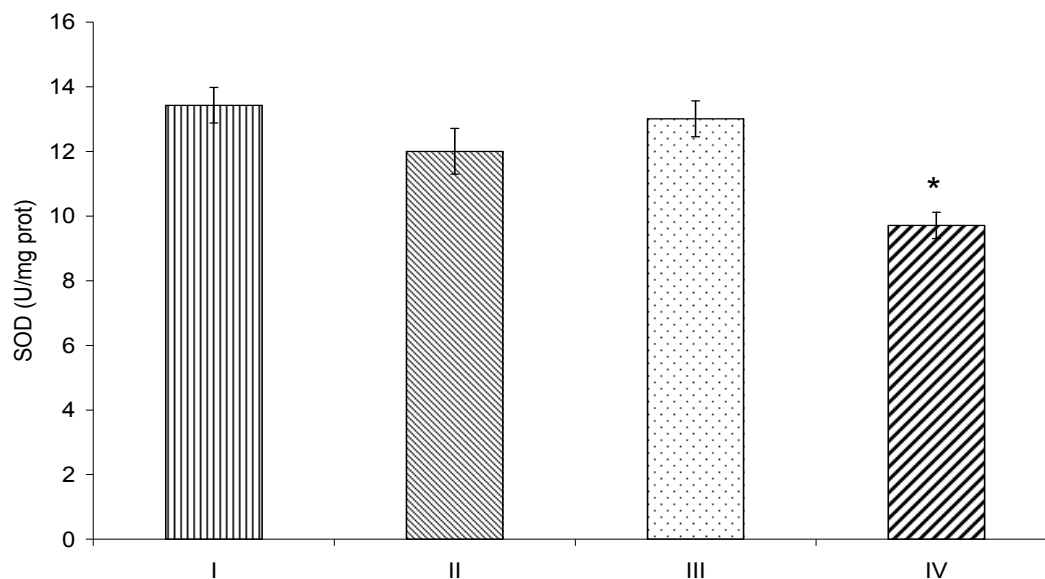


Figura 44: Atividade da SOD (U/mg prot) em homogeneizado hepático (n=8/grupo). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina. (*) $P < 0,05$ quando comparado aos grupos I, II e III. Utilizando média \pm dpm e ANOVA.

A atividade de enzima antioxidante catalase não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados (figura 45).

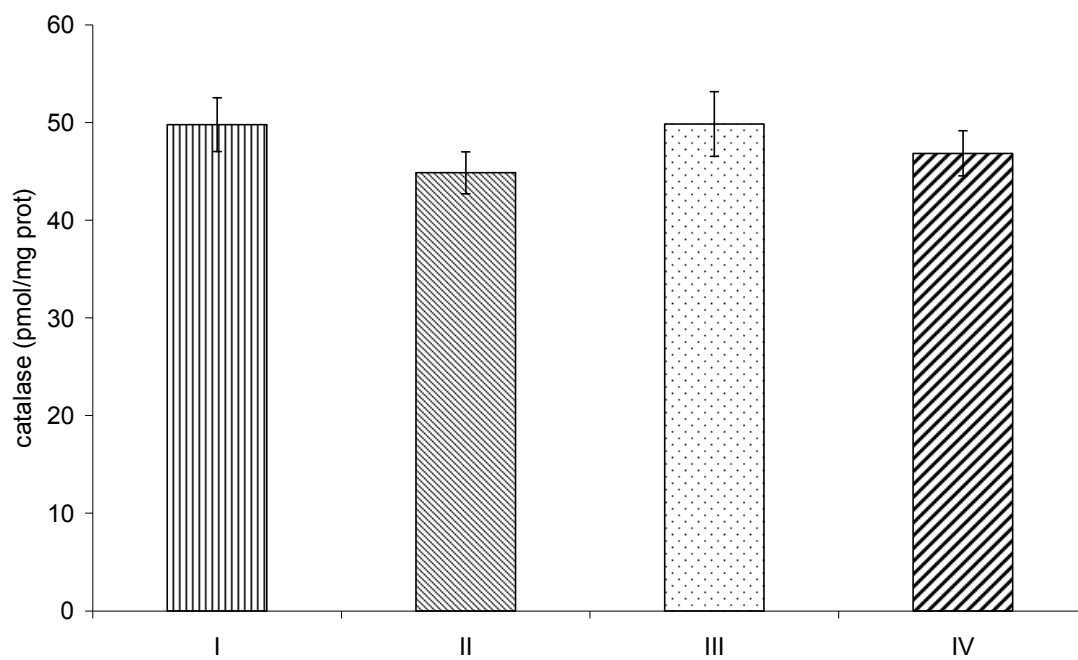


Figura 45: Atividade da catalase ($\mu\text{mol/mg prot}$) em homogeneizado hepático ($n=8/\text{grupo}$). I - Sham controle, II - Castrada controle, III - Sham metionina, IV - Castrada metionina.

6. DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTO 1:

Sabe-se que a homocisteína aumenta o estresse oxidativo, por ser facilmente oxidada e gerar radicais livres. Uma vez na circulação a homocisteína é rapidamente auto-oxidada formando homocistina, dissulfetos mistos e também as espécies ativas de oxigênio (Baydas et al., 2006). É sabido também que ela atua nos vasos promovendo a disfunção endotelial, especialmente por oxidar o LDL colesterol (Romerio et al., 2004). Também já está amplamente estudado o efeito do acúmulo de homocisteína sobre a função endotelial. Por este motivo, procuramos elucidar, neste trabalho, como funciona o dano oxidativo gerado pela homocisteína sobre o tecido cardíaco, uma vez que o aumento dos níveis de Hcy é considerado um fator de risco para doença cardiovascular (Perry, 1999).

Inicialmente, testamos o efeito crônico da Hcy no coração, num modelo de homocistinúria. A homocistinúria é um erro inato do metabolismo de aminoácidos sulfurados, causado pela deficiência da enzima cistationina β -sintase. 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 metionina sintase. As concentrações 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 da enzima cistationina β -sintase apresentam concentrações plasmáticas de homocisteína acima de 200 $\mu\text{mol/L}$, e de metionina até 2000 $\mu\text{mol/L}$ (Mudd et al., 2001). Pacientes com homocistinúria desenvolvem, prematuramente, doença vascular

oclusiva, levando à trombose arterial e venosa (Davi et al., 2001; Robert et al., 2005). A patogenia da lesão vascular determinada pela HHcy inclui lesão da célula endotelial, crescimento da musculatura lisa vascular, maior adesividade plaquetária, aumento da oxidação do LDL-colesterol com deposição na parede vascular e ativação direta da cascata da coagulação (Durand et al., 2001). O modelo de homocistinúria utilizado neste estudo está descrito na literatura, e induz uma elevação nos níveis de homocisteína sanguínea para aproximadamente 500 $\mu\text{mol/L}$, promovendo uma hiperhomocisteinemia severa, semelhante à encontrada na homocistinúria (Streck et al., 2002). Neste experimento, foram utilizados ratos jovens (machos e fêmeas), sexualmente imaturos, portanto sem a influência do estrogênio, que foram mortos logo após o término do tratamento de três semanas. No nosso estudo observou-se aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST no grupo tratado com Hcy em relação ao controle. Uma vez que a homocisteína aumenta a geração de EAO durante a sua oxidação (Baydas et al., 2006), acredita-se que estas enzimas têm suas atividades aumentadas por aumento nos substratos, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. A GST também tem um importante papel na detoxificação de xenobióticos, por isso ela está aumentada devido à intoxicação causada pela homocisteína. Resultados semelhantes foram encontrados por Vilaseca-Busca e colaboradores onde a atividade da SOD apresentou-se aumentada na homocistinúria provavelmente devido a um aumento na produção de EAO (Vilaseca-Busca et al., 2002). Já a catalase não apresentou alterações no experimento 1 o que pode ser devido a uma inibição por NO. No entanto, não houve aumento do dano oxidativo, avaliado através da LPO. Sugere-se que, neste período de tratamento, as atividades enzimáticas aumentadas foram

suficientes para reverter o dano causado pela Hcy, ou ainda pode ter compensado pela presença de antioxidantes não enzimáticos. Campolo e colaboradores demonstraram que o aumento da Hcy aumenta a glutathiona reduzida (GSH), mas não altera LPO no plasma de humanos tratados com metionina (Campolo et al., 2006). Estudos em humanos mostram que há um aumento da LPO na homocistinúria em pacientes adolescentes e adultos (14 a 51 anos) e que isto está associado a um maior risco cardiovascular e trombótico (Davi et al., 2001). Outro estudo também mostrou um aumento da LPO em fígado de camundongos, com hiperhomocisteinemia severa causada por deficiência da cistationina β -sintase (Robert et al., 2005). Não foi encontrado na literatura um modelo de homocistinúria que avalie o estresse oxidativo cardíaco.

O dano oxidativo ao miocárdio pode contribuir para agravar o quadro da HHcy já que além da disfunção endotelial isso poderia contribuir para a disfunção miocárdica.

6.2 EXPERIMENTO 2

Neste experimento, foi utilizado o mesmo modelo descrito no experimento 1 que induz uma elevação nos níveis de homocisteína sanguínea para aproximadamente $500\mu\text{mol/L}$, promovendo uma hiperhomocisteinemia severa, semelhante à encontrada na homocistinúria (Streck et al., 2002). No entanto, 12 horas após o término do tratamento a concentração plasmática de homocisteína retorna aos valores normais (Streck et al., 2004). Utilizando as mesmas doses de homocisteína do experimento anterior e o mesmo tempo de tratamento, porém analisando os animais já adultos com 80 dias de vida, foi observado o estresse

oxidativo 52 dias após o término do tratamento. O objetivo foi verificar o efeito da hiperhomocisteinemia (HHcy) severa, a longo prazo, sob parâmetros oxidativos no tecido cardíaco. Este tratamento simula a homocistinúria, como foi citado anteriormente. Para isso foram utilizados ratos machos, ou seja, sem influência do estrogênio, uma vez que já foi demonstrado que os androgênios não influenciam no estresse oxidativo (Barp et al., 2002). Foi observado, neste modelo, um aumento do dano oxidativo aos lipídios e às proteínas. Sabe-se que a HHcy estimula a formação de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio, promovendo um aumento no estresse oxidativo (Welch et al., 1997; Hogg, 1999; Streck et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, onde modelos de homocistinúria apresentam um aumento de LPO e aumento de dano às proteínas em fígado e plasma (Davi, 2001; Robert, 2005). No entanto, nos animais que receberam Hcy e folato foi observado que a LPO e o dano a proteínas volta para valores semelhantes aos dos controles, ou seja o folato impede o dano oxidativo no coração destes animais. O folato é um co-substrato do ciclo de remetilação da metionina, que impede a formação de Hcy; por isso, o tratamento com ácido fólico reduz a concentração plasmática de homocisteína (Thambyrajah et al., 2000). Hagar demonstrou que o tratamento com folato, em ratos infartados, reduz significativamente o dano oxidativo do miocárdio (Hagar, 2002). Já Malinow e colaboradores observaram uma redução da Hcy plasmática em pacientes, com doença cardíaca isquêmica, que consumiram cereais fortificados com ácido fólico (Malinow et al., 1999). Observamos também um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e GST, bem como uma diminuição na atividade da SOD. É sabido que altas concentrações de peróxido de hidrogênio ativam a catalase, no entanto, esse grande aumento nas espécies

ativas de oxigênio pode inibir a atividade enzimática da SOD, o que se chama de inativação oxidativa (Li et al., 1999). Já o aumento observado na GST reflete a detoxificação da Hcy, sendo que esta enzima é a principal responsável pelos processos de detoxificação de xenobióticos. Heydrick e colaboradores sugerem o aumento nos níveis de Hcy está associada a um aumento da LPO dose dependente, e que esta não é inibida pelo aumento da catalase, mas é inibida pelo aumento da SOD. E que altas doses de Hcy não alteram a atividade da GPx, em cultura de células endoteliais (Heydrick et al., 2004). Já Baydas e colaboradores e Huang e colaboradores demonstraram que o aumento na concentração plasmática de Hcy inibe a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a GPx (Huang et al., 2001; Baydas et al., 2005). Quando protegemos estes animais com folato, as atividades da catalase e da GST retornam a valores controles, o que comprova ou reforça que o aumento da atividade enzimática foi devido ao aumento na geração de EAO pela Hcy. Isso também é demonstrado na correlação positiva encontrada entre a LPO e a atividade da catalase. Como discutido anteriormente, o folato reduz os níveis de homocisteína e assim reduz o dano oxidativo, retornando a atividade das enzimas aos seus valores basais.

6.3 EXPERIMENTO 3

Neste experimento foram utilizadas ratas sexualmente maduras castradas ou não. A castração foi realizada para que tivéssemos grupos com e sem estrogênio, sendo que a retirada dos estrogênios foi feita para simular a menopausa. Já está estabelecido que na menopausa ocorre um aumento dos níveis de Hcy e também um aumento no risco cardiovascular (Hak et al., 2000;

Chagas et al., 2003; Mosca et al., 2006). Por outro lado também já está bem estabelecido na literatura que a Hcy causa disfunção endotelial (Kuller & Evans, 1998; Kanani et al., 1999; Cole, 2001) e que o estrogênio tem ação antioxidante (Ayres et al., 1998; Strehlow et al., 2003; Wierman, 2007). Então nosso próximo passo foi estudar a influência do estrogênio no efeito oxidativo causado pela homocisteína em coração, aorta e efeito sistêmico em termos de estresse oxidativo, observando algumas alterações hemodinâmicas. A escolha dos tecidos foi feita com base nos nossos objetivos. Primeiramente queríamos avaliar o efeito no miocárdio, sendo que a Hcy é um fator de risco cardiovascular (Perry, 1999). Na aorta queríamos comprovar o efeito sobre o endotélio e a avaliação sistêmica foi realizada para observarmos o balanço entre os tecidos através dano oxidativo sistêmico. Neste modelo foi avaliado agudamente o efeito da Hcy em animais castradas ou não. O modelo de HHcy utilizado foi o descrito por Scherer e colaboradores, que causa hiperhomocisteinemia severa (Scherer et al., 2007). Primeiramente, foi feita análise hormonal para confirmar a diminuição dos níveis de 17β -estradiol, após uma semana de castração. O grupo castrado apresentou níveis significativamente menores de 17β -estradiol, como já havia sido demonstrado em trabalhos prévios realizados em nosso laboratório (Barp et al., 2002).

Inicialmente, os animais foram cateterizados sob anestesia e após foram realizadas as medidas hemodinâmicas em animal acordado. A avaliação hemodinâmica apresentou diferenças significativas na pressão arterial média apenas quando comparamos os animais castrados que receberam ou não a Hcy. Observou-se que a Hcy aumenta a pressão arterial somente na ausência de estrogênio. Já a frequência cardíaca não apresentou alterações significativas

entre os grupos estudados, como demonstrado na literatura. Herrmann e colaboradores demonstram não haver variação na pressão arterial, porém observaram uma elevação da pressão diastólica ventricular esquerda (Herrmann et al., 2006). Já Ungvari e colaboradores não observaram diferenças na pressão arterial medida em artéria femural (Ungvari et al., 1999). Ambos os trabalhos utilizaram tratamento crônico para indução de HHcy moderada, enquanto no nosso trabalho utilizamos tratamento agudo para HHcy severa. Em contrapartida a estes resultados, Mariotti e colaboradores demonstraram que a HHcy diminui a pressão sangüínea avaliada pelo método de pletismografia caudal e não altera produção de óxido nítrico (NO) plasmático (Mariotti et al., 2006).

O NO é amplamente conhecido como vasodilatador, porém sabe-se que ele tem um importante papel na atividade cardíaca. Estudos recentes mostram que inibindo a vasodilatação NO – dependente, aumenta-se o índice de eventos cardiovasculares, uma vez que o NO tem um importante papel na regulação do metabolismo cardíaco, modulando a respiração mitocondrial. O NO atenua a respiração mitocondrial por inibir os complexos I e II da cadeia de transporte de elétrons e por interação com a citocromo oxidase (Suematsu et al., 2007). O NO também atua na modulação da resposta cardíaca à isquemia/reperfusão. Além de atuar como molécula cardioprotetora, e ser essencial para o funcionamento normal do coração (Xu et al., 2004). Becker e colaboradores demonstraram que a HHcy inibe a regulação do consumo de oxigênio cardíaco pelo NO, e este efeito é proporcional a concentração plasmática de Hcy. Sugerem também que a redução da biodisponibilidade do NO pelo ânion superóxido é o maior impacto ao metabolismo cardíaco causado pela Hcy, causando uma piora na vasodilatação (Becker et al., 2005).

Visto esta importante função do NO no coração, achamos interessante verificar os níveis de nitritos + nitratos (NOx) neste tecido. Os níveis de NOx estão aumentados nas ratas castradas com Hcy. Estudos demonstram que a HHcy reduz a biodisponibilidade do NO (Suematsu et al., 2007). Enquanto o estrogênio aumenta a atividade da NOS e aumenta a produção de NO no coração (Xu et al., 2004). Neste trabalho sugere-se que os níveis de NOx estão aumentados no coração, pois a HHcy reduz a biodisponibilidade de NO aumentando seus metabólitos. Como este tratamento é agudo é possível que estes metabólitos ainda não tenham sido secretados. Quando correlacionamos a pressão arterial com os níveis de NOx, observamos uma correlação positiva, mostrando que os animais com maiores níveis destes metabólitos, supostamente com menores concentrações de NO, apresentam uma maior pressão arterial. Dantas e colaboradores mostram que a inativação do NO pelo ânion superóxido pode colaborar para a disfunção endotelial e para a hipertensão, e que o estrogênio por sua propriedade antioxidante tem efeito protetor contra o dano endotelial (Dantas et al., 1999).

Quando analisamos o estresse oxidativo, observamos um aumento na lipoperoxidação cardíaca, analisada pela técnica de quimiluminescência, no grupo que recebeu Hcy e tinha baixa concentração de estrogênio. Isso demonstra um aumento do dano oxidativo nestes animais, uma vez que não têm o efeito antioxidante oferecido pelo estrogênio. Já o grupo com estrogênio que recebeu Hcy não apresentou aumento da LPO. Quando correlacionamos a pressão arterial com a LPO, observamos uma correlação positiva, mostrando que os animais que apresentaram maior dano oxidativo também tiveram a pressão arterial mais elevada. Estes animais são os que receberam Hcy e tinham baixa concentração

de estrogênio. Estes dados são corroborados por dados encontrados na literatura que demonstram que a HHcy aumenta estresse oxidativo (EO) e a LPO no sistema nervoso (Streck et al., 2003; Matté et al., 2004), e que o EO promove dano cardíaco (Ungvari et al., 1999). Outro estudo mostra que o 17 β -estradiol diminui a expressão de pró-oxidantes em células endoteliais e recupera a função cardíaca pós isquemia em coração de ratas (Xu et al., 2004). Neste experimento não foi observado dano oxidativo a proteínas, provavelmente pelo tempo do tratamento, uma vez que o dano a proteínas ocorre mais lentamente que o dano a lípidios. Quando analisamos a capacidade antioxidante total nestes animais, observamos uma diminuição nos antioxidantes não enzimáticos, avaliados em conjunto pela técnica do TRAP, no grupo que recebeu Hcy e tinha baixa concentração de estrogênio. Isso demonstra um maior dano oxidativo neste grupo que teve aumento na LPO e diminuição da capacidade antioxidante total. Estudos mostram que a Hcy in vitro induz a LPO e diminui as defesas antioxidantes não enzimáticas, gerando um quadro de estresse oxidativo (Streck et al., 2003; Matté et al., 2004). Observamos também que apenas a cirurgia já é um fator de estresse oxidativo uma vez que os grupos em que foi feita a cirurgia fictícia apresentaram uma menor capacidade antioxidante total quando comparado com os animais intactos.

Spencer e colaboradores demonstraram que a combinação de estrogênio com Hcy bloqueia significativamente a ação da Hcy (Spencer et al., 2004).

No coração observamos que houve um aumento do estresse oxidativo nos animais castrados que receberam Hcy, uma vez que a QL apresentou-se aumentada e houve uma diminuição nas enzimas GST e GPx, que são as enzimas dependentes de glutathione. Novamente observamos que a diminuição na

atividade enzimática da GPx e GST só são observadas no grupo com Hcy e com baixa concentração de estrogênio, mostrando um efeito pró-oxidante da Hcy no coração destes animais.

Suematsu e colaboradores demonstraram que o aumento do estresse oxidativo pela Hcy reduz a atividade da GPx, diminui a biodisponibilidade de NO e aumenta os níveis de superóxido (Suematsu et al., 2007).

O risco de infarto aumenta em 12% na HHcy moderada e de 20 a 30% dos pacientes com doença coronariana apresenta HHcy moderada. Estes danos estão associados ao poder oxidante da Hcy, uma vez que ela aumenta os níveis de ânion superóxido e de peroxinitrito que são potentes oxidantes, além de diminuir o NO e a atividade da NO sintase endotelial (eNOS), que tendem a manter a função cardíaca (Spencer et al., 2004).

Quando correlacionamos a LPO com a atividade da GST observamos uma correlação negativa, mostrando que os animais que apresentaram maior dano oxidativo tiveram uma menor atividade antioxidante desta enzima. Isto sugere que os animais que receberam Hcy, mas tinham a presença do estrogênio como antioxidante, têm um menor dano oxidativo que os animais castrados e que receberam Hcy, provavelmente porque o estrogênio impede o dano oxidativo causado pela Hcy.

Robin e colaboradores demonstraram que em tecido sanguíneo e hepático, não há variação nos níveis de NOx após suplementação com metionina. E ainda que a Hcy possa aumentar os níveis plasmáticos de cisteína e de GSH em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Robin et al., 2004).

Neste modelo foram avaliados também alguns parâmetros em aorta. No entanto, devido à dificuldade em fazer a coleta desta artéria, por ela se apresentar

muito frágil nos animais que receberam Hcy, e romper facilmente enquanto era retirada, só foi possível avaliar a atividade de duas enzimas antioxidantes. As enzimas escolhidas foram a GST e a GPx por participarem do metabolismo da glutathiona e por terem se mostrado alteradas no tecido cardíaco. Na aorta observamos que a Hcy por si só, independente da ação do estrogênio, aumenta os níveis de GST tentando reverter o dano causado pela Hcy. No entanto nos animais que receberam Hcy e estavam castrados não houve um aumento da GST. Possivelmente a formação de muitas EAO, inibiu a atividade enzimática da GST (inativação oxidativa). Já a GPx apresentou-se aumentada quando houve a castração, independente da presença de Hcy, mostrando que só a retirada dos estrogênios já promove uma resposta adaptativa do sistema antioxidante enzimático para combater o dano oxidativo em aorta. Este dano também é observado quando temos Hcy e o estresse cirúrgico no grupo sham. Ou seja, tanto a castração quanto a Hcy promovem aumento da atividade da GPx para reverter o dano oxidativo causado por estes procedimentos. Barp e colaboradores demonstraram que a castração induz um aumento do estresse oxidativo (Barp et al., 2002). Já Chagas e colaboradores sugerem que a Hcy causa um efeito lesivo direto ao endotélio e que este processo é dependente da biodisponibilidade de oxigênio. Os autores sugerem um mecanismo de dano via radicais livres pelo aumento do peróxido de hidrogênio (Chagas et al., 2003).

Em experimentos em anel de aorta isolados observou-se que a Hcy causa uma redução da biodisponibilidade do NO e um importante aumento do estresse oxidativo (Eberhardt et al., 2000). Outro estudo demonstra que a HHcy, causada por altas doses de metionina, produz um efeito angiotóxico na aorta. Este efeito é

acompanhado de extenso dano endotelial, degeneração celular e características degenerativas no processo mitocondrial (Matthias et al., 1996).

Também foi avaliado com este protocolo experimental, o estresse oxidativo sistêmico, como marcadores periféricos, uma vez que é uma análise minimamente invasiva e a mais utilizada na clínica médica. Observamos sistemicamente que a LPO apresenta-se diminuída, bem como a atividade da GST e os metabólitos do NO. Acredita-se que o vaso é o primeiro órgão-alvo de dano causado pela Hcy, até pelo seu aspecto após o tratamento. Então para proteger o vaso do dano oxidativo, possivelmente, são mobilizados antioxidantes de outros órgãos. Palace e colaboradores demonstraram que órgãos como o coração, o fígado e os rins podem depletar suas reservas de antioxidantes para diminuir o estresse oxidativo sistêmico em resposta ao insulto isquêmico ao miocárdio (Palace et al., 1999).

6.4 EXPERIMENTO 4

Outro objetivo deste trabalho foi ver o efeito da hiperhomocisteinemia crônica, em ratas castradas e não-castradas. Porém, devido ao alto custo da Hcy, fomos buscar na literatura um tratamento alternativo. O que encontramos foi que o tratamento crônico com metionina na água de beber causa uma hiperhomocisteinemia moderada, com valores de homocisteína entre 15 – 30 μ mol/L (Welch & Loscalzo, 1998). Uma vez que a única fonte de Hcy no organismo é o metabolismo da metionina, a administração crônica deste aminoácido essencial pode levar à HHcy. O modelo de HHcy utilizado foi baseado no estudo de Ungavari et al., 1999, o qual demonstrou uma elevação da

concentração plasmática de Hcy para valores de 23,6 $\mu\text{mol/L}$, indicando HHcy moderada. Em um estudo realizado por Hanratty et al., 2001, foram considerados dois grupos de pacientes, tendo o primeiro recebido metionina oral e o outro recebido homocisteína oral. Foi observado um aumento na homocisteína plasmática e na concentração de metionina do primeiro grupo, sendo que no segundo grupo foi observado um aumento na homocisteína plasmática, com pouco efeito na concentração de metionina. Ambos os tratamentos indicaram danos endoteliais, sugerindo que a homocisteína é o agente causador.

Após estabelecido o modelo, o objetivo foi o de demonstrar a disfunção no ventrículo esquerdo em ratos, submetidos à hiperhomocistemia (HHcy), a qual foi correlacionada com o estresse oxidativo do miocárdio e redução de metabólitos do NO.

Como já demonstrado por outros autores, a Hcy contribui para a mortalidade cardiovascular por ações no miocárdio, em adição aos efeitos vasculares (Joseph et al., 2002; Joseph et al., 2003). Uma elevada concentração da Hcy plasmática tem sido associada a danos no endotélio vascular, contribuindo para doenças das artérias coronarianas, trombose e doenças cerebrovasculares (Hermann et al., 2006). A HHcy pode também exercer efeitos deletérios no coração, causando remodelamento cardíaco adverso, que se caracteriza por fibrose intersticial e perivascular, resultando no aumento de rigidez do miocárdio (Joseph et al., 2002). No entanto, o mecanismo pelo qual a elevação da Hcy pode levar à redução da função mecânica do coração ainda está sob investigação. Estudos destes mecanismos ainda são raros. Recentemente, tem observado um aumento na concentração da Hcy plasmática em pacientes com

insuficiência cardíaca congestiva (ICC), representado um fator de risco adicional (Vassan et al., 2003).

Neste estudo, objetivamos investigar a função ventricular por meio do cateterismo cardíaco de ratos com HHcy. Foi verificada uma elevação significativa da PDFVE nas ratas com ausência de estrogênio. A menopausa foi induzida por ovariectomia bilateral. Este procedimento foi utilizado baseado na observação de que os níveis de Hcy aumentam significativamente em mulheres após a menopausa. Isto pode justificar, em parte, o aumento do risco de doenças cardiovasculares nessas mulheres (Verhoef et al., 1999; Sundstrom et al., 2004).

Uma vez que Spencer et al., 2004 demonstraram que a combinação de Hcy e estrogênio inibem significativamente os efeitos adversos da Hcy, foi observada somente a disfunção ventricular na ausência deste hormônio. Este resultado reforça a característica cardioprotetora do estrogênio. Também achamos um decréscimo na quantidade de nitritos+nitratos (NOx) no miocárdio de ratos submetidos à ovariectomia e que receberam metionina, quando comparados a outros grupos. Foi demonstrada uma correlação negativa bastante forte entre NOx e PDFVE, indicando uma possível participação do decréscimo da biodisponibilidade do NO na disfunção ventricular (Elahi et al., 2007). Esta redução da biodisponibilidade do NO pode também ser resultante de uma supressão indireta da atividade da NO sintase endotelial (eNOS) pela Hcy (Zhang et al., 2000). Outro mecanismo para explicar a redução na biodisponibilidade do NO é devido à formação de peroxinitrito, resultante da reação entre o NO e o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual é reconhecido como sendo produzido pela reação de oxidação da Hcy (Ungavari et al., 2002). Assim, a medida dos marcadores de estresse oxidativo no miocárdio passa a ser de interesse. Neste trabalho foi

avaliado o dano oxidativo a lipídios por meio do TBARS. Este marcador está aumentado em animais castrados, demonstrando que o estrogênio inibe o estresse oxidativo no miocárdio. Barp et al., 2002, demonstraram este efeito uma semana após a castração. Quando associados a castração e a hiperhomocisteinemia, o estresse oxidativo foi potencializado e também se verificou dano a proteínas avaliados por carbonilas. Estes achados corroboram o estudo de Bayes et al., 2003, onde foi verificada uma associação entre a HHcy induzido por metionina e a lipoperoxidação. Devi e colaboradores também demonstraram que a HHcy aumenta o TBARS em miocárdio de ratos SHR, sugerindo que a HHcy aumenta o estresse oxidativo e a LPO miocárdica (Devi et al., 2006).

A terapia de reposição hormonal em ratas castradas ou administração de SOD mimético foram associadas com uma melhor recuperação cardíaca após isquemia-reperfusão (Xu et al., 2004). O estrogênio tem sido associado também como protetor contra o estresse oxidativo induzido por Hcy, prevenindo injúria endotelial (Dimitrova et al., 2002b).

Um dos resultados obtidos neste trabalho foi a verificação do aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST no grupo com ausência de estrogênio associado com a administração da metionina. De fato, as enzimas antioxidantes parecem responder ao desequilíbrio no estresse oxidativo aumentando suas atividades numa tentativa de minimizar o dano oxidativo. Resultados similares foram produzidos no nosso laboratório com a utilização de outras situações de estresse oxidativo. Neste trabalho foi demonstrado que as enzimas antioxidantes também se encontravam elevadas quando o estresse oxidativo era induzido pela administração de tiroxina (Araujo et al., 2006).

Como a Hcy pode levar à produção do ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio (Chambers et al., 1999; Perna et al., 2003), o aumento da atividade antioxidante pode ser devido a uma elevação nos substratos dessas enzimas. A atividade da SOD e os metabólitos do NO apresentaram um padrão de oscilação oposto. Isto significa que quanto maior a atividade da SOD, menor a quantidade de metabólitos de NO. Esta alteração foi verificada em ratas castradas submetidas a tratamento com metionina. A atividade aumentada da SOD pode ser devida a um aumento da produção do ânion superóxido, o qual por sua vez inativa o NO, conforme citado anteriormente. No grupo que recebeu metionina com concentração fisiológica de estrogênio, a atividade da SOD não foi alterada, sugerindo que a produção do superóxido pode também estar inalterada (Perna et al., 2003; Suematsu et al., 2006).

De fato, o estrogênio pode preservar a biodisponibilidade do NO não apenas pelo aumento da produção de NO, mas também por sua ação *scavenger*, reduzindo ou inibindo o estresse oxidativo (Viridis et al., 2000).

Nossos dados demonstram uma associação entre a HHcy e a disfunção ventricular em ratas menopausadas, o qual foi correlacionado com a diminuição da biodisponibilidade de NO, bem como com o aumento do dano oxidativo no miocárdio. Estes achados demonstram a importância da restituição do balanço NO/redox em mulheres menopáusicas de maneira a melhorar a função cardíaca na HHcy, influenciando favoravelmente o prognóstico da insuficiência cardíaca.

Outro objetivo deste estudo foi verificar o efeito crônico da metionina como causadora de HHcy sobre o fígado. O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização da metionina e da homocisteína, principalmente pela rota de transulfuração da Hcy à cistationina (Robin et al., 2004).

No fígado não foram observadas alterações nos metabólitos do NO. Ji e Kaplowitz sugerem que a HHcy piora quadros de doenças hepáticas e que a biodisponibilidade do NO é importante no balanço redox nestes casos (Ji & Kaplowitz, 2004). A lipoperoxidação hepática, avaliada pelo método do TBARS, apresentou-se aumentada no grupo castrado que recebeu metionina. Observou-se também um aumento no dano a proteínas avaliado pelo método das carbonilas. Robert e colaboradores demonstraram que há um aumento nas carbonilas em fígado de camundongos com deficiência da cistationina β -sintase e que esta deficiência é uma das causas da hiperhomocisteinemia (Robert et al., 2005).

Outros estudos também mostram que a LPO é um importante mecanismo na patogênese do dano hepático. E que o aumento nos níveis de Hcy promove um aumento da LPO e do estresse oxidativo em fígado de ratos (Huang et al., 2001; Robin et al., 2004).

Outro resultado obtido neste experimento foi a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST. Alguns estudos sugerem que a homocisteína atua inibindo a atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático. Huang e colaboradores demonstraram que o aumento nos níveis de Hcy, por depleção de folato, resulta em uma diminuição da atividade da GPx e da SOD, sem alterar a atividade da catalase em tecido hepático (Huang et al., 2001). Já Robin e colaboradores mostraram uma diminuição significativa na atividade das enzimas antioxidantes GPx e glutatona redutase em fígado de ratos SHR (Robin et al., 2004). Estes dados no tecido hepático sugerem um grande dano oxidativo no fígado, pois durante a metabolização da Hcy, ocorre a sua auto-oxidação e a geração de espécies ativas de oxigênio.

7. Conclusão

- 1) A administração crônica de homocisteína a animais neonatos não aumenta o dano oxidativo cardíaco avaliado imediatamente após o término do tratamento, provavelmente pela aumentada atividade antioxidante no miocárdio.
- 2) A homocisteína, administrada cronicamente a ratos neonatos, induz aumento do dano oxidativo ao miocárdio quando estes animais se tornam maduros, sendo que esses danos foram minimizados pela suplementação com folato. Estes dados sugerem que o folato atua como protetor cardiovascular na hiperhomocisteinemia.
- 3) O dano oxidativo miocárdico foi induzido no miocárdio de fêmeas castradas tratadas agudamente com homocisteína, efeito esse que não se observa na presença de níveis estrogênicos fisiológicos. Estes dados apontam para um efeito cárdio-protetor do estrogênio na hiperhomocisteinemia.
- 4) O tratamento crônico com metionina induz disfunção diastólica do ventrículo esquerdo que foi associada à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), assim como ao aumento do dano oxidativo no miocárdio. Estes achados sugerem a importância do balanço NO/redox na melhora da função cardíaca na hiperhomocisteinemia.

8. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105: 121-126, 1984.
- ANDERSSON, A.; HULTBERG, B.; LINDGREN, A. Redox status of plasma homocysteine and other plasma thiols in stroke patients. *Atherosclerosis*, 151:535-539, 2000.
- ARAUJO, A.S.R.; RIBEIRO, M.F.M.; ENZVEILER, A.; SCHENKEL, P.; FERNANDES, T.R.G.; PARTATA, W.A.; IRIGOYEN, M.C.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 249: 133-139, 2006.
- ARNAL, J.F.; CLAMENS, S.; PECHET, C.; NEGRE-SALVAYRE, A.; ALLERA, C.; GIROLAMI, J.P.; SALVAYRE, R.; BAYARD, F. Ethinylestradiol does not enhance expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:4108-4113, 1996.
- ASLAN, M.; RYAN, T.M.; ADLER, B.; TOWNES, T.M.; PARKS, D.A.; THOMPSON, J.A.; TOUSSON, A.; GLADWIN, M.T.; PATEL, R.P.; TARPEY, M.M.; BATINIC-HABERLE, I.; WHITE, C.R.; FREEMAN, B.A. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(26):15215-15220, 2001.
- AYRES, S.; ABPLANALP, W.; LIU, J.H.; SUBBIAH, M.T.R. Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 β on lipid peroxidation and damage. *The American Journal of Physiology*. 274(37):E1002-E1008, 1998.
- BARP, J., ARAÚJO, A.S.R., FERNANDES, T.R.G., LLESUY, S., BELLÓ-KLEIN, A., SINGAL, P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 35(9): 1075-81, 2002.

- BARRET-CONNOR, E. & BUSH, T.L. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA*, 256(14):1861-1867, 1991.
- BAYDAS, G.; OZER, M.; YASAR, A.; KOZ, S.T.; TUZCU, M. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochemistry (Moscow)*, 71 Suppl 1:S91-S95, 2006.
- BAYÉS, B., PASTOR, M.C., BONAL, J., JUNCA, J., HERNANDEZ, J.M., RIUTORT, N., FORASTER, A., ROMERO, R. Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxidation and mortality in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(1): 106-12.
- BECKER, J.S., ADLER, A., SCHNEEBERGER, A., HUANG, H., WANG, Z., WALSH, E., KOLLER, A., HINTZE, T.H. Hyperhomocysteinemia, a cardiac metabolic disease: role of nitric oxide and the p22phox subunit of NADPH oxidase. *Circulation*, 111(16): 2112-2118, 2005.
- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z. & FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65: 1865-1874, 1999.
- BOUSHEY, C.J.; BERESFORD, A.S.; OMENN, G.S.; MOTULSKY, A.G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, 274:1049-1057, 1997.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (Buenos Aires)* 58: 350-356, 1998.
- BRANN, D.W.; HENDRY, L.B.; MAHESH, V.B. Emerging diversities in the mechanisms of action of steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 52(2):113-133, 1995.
- BRETT, D.S. Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. *Journal of Cell Science*, 116: 9-15, 2003.
- BUEGE, J.Á.; AUST, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymology*, 52:302-309, 1978.

- CAMPOLO, J.; DE CHIARA, B.; CARUSO, R.; DE MARIA, R.; SEDDA, V.; DELLANOCE, C.; PAROLINI, M.; CIGHETTI, G.; PENCO, S.; BAUDO, F.; PARODI, O. Methionine challenge paradoxically induces a greater activation of the antioxidant defence in subjects with hyper- vs. normohomocysteinemia. *Free Radical Research*, 40(9):929-935, 2006.
- CHAGAS, A.C.P.; FARIA-NETO, J.R.; LUZ, P.L. Hiper-homocisteinemia como Causa da Disfunção Endotelial. In LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. eds. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares*, São Paulo, Atheneu, 311-322, 2003.
- CHAMBERS, J.C., MCGREGOR, A., JEAN-MARIE, J., OBEID, O.A., KOONER, J.S. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation*, 99(9), 1156-1160, 1999.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59(3):527-625, 1979.
- COLE, D.E.C. Homocysteine as a risk factor in cardiovascular disease. *Diabetes and Cardiovascular Disease: Etiology, Treatment and Outcomes*. Edited by Aubie Angel et al., Kluwer Academic, 2001.
- DANTAS, A.P.; SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z.B.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34(4):914-919, 1999.
- DANTAS, A.P.V.; PASSAGLIA, R.C.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B.; CARVALHO, M.H.C. Estrogen can modulate endothelial function in spontaneously hypertensive rats by an antioxidant mechanism. *FASEB J.*, 15: A784, 2001.
- DAVI, G.; DI MINNO, G.; COPPOLA, A.; ANDRIA, G.; CERBONE, A.M.; MADONNA, P.; TUFANO, A.; FALCO, A.; MARCHESANI, P.; CIABATTONI, G.; PATRONO, C. Oxidative stress and platelet activation in homozygous homocystinuria. *Circulation*, 104(10):1124-1128, 2001.

- DAYAL, S.; BROWN, K.L.; WEYDERT, C.J.; OBERLEY, L.W.; ARNING, E. BOTTIGLIERI, T.; FARACI, F.M.; LENTZ, S.R. Deficiency of Glutathione Peroxidase-1 Sensitizes Hyperhomocysteinemic Mice to Endothelial Dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:1996-2002, 2002.
- DEVI, S.; KENNEDY, R.H.; JOSEPH, L.; SHEKHAWAT, N.S.; MELCHERT, R.B.; JOSEPH, J. Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. *Cardiovascular Pathology*, 15(2):75-82, 2006.
- DI, T.; SULLIVAN, J.A.; RUPNOW, H.L.; MAGNESS, R.; BIRD, I.M. Pregnancy induces expression of cPLA₂ in ovine uterine artery but not systemic artery endothelium. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 6(6):301-306, 1999.
- DIMITROVA, K.R.; DeGROOT, K.W.; MYERS, A.K.; KIM, Y.D. Estradiol and homocysteine. *Cardiovascular Research*, 53:577-588, 2002. (a)
- DIMITROVA, K.R.; DeGROOT, K.W.; PACQUING, A.M. SUYDERHOUD, J.P., PIROVIC, E.A., MUNRO, T.J., WIENEKE, J.A., MYERS, A.K., KIM, Y.D. Estradiol prevents homocysteine-induced endothelial injury in male rats. *Cardiovascular Research*, 53:589-596, 2002. (b)
- DOMAGALA, T.B.; UNDAS, A.; LIBURA, M.; SZCZEKLIK, A. Pathogenesis of vascular disease in hyperhomocysteinaemia. *J Cardiovasc Risk*, 5(4):239-47, 1998.
- DOURADO, V.Z.; TANNI, S. E.; VALE, S.A. MÁRCIA MARIA FAGANELLO, M.M.; SANCHEZ, F.F.; GODOY I. Systemic manifestations in chronic obstructive pulmonary disease. *Jornal brasileiro de pneumologia*. 32(2):161-171, 2006.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Ver*, 82(1):47-95, 2002.
- DUBEY, R. K. Vasodilator-derived nitric oxide inhibits angiotensin II and fetal calf serum-induced growth of arteriolar smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 269: 402-408, 1994.

- DUBEY, R. K.; JACKSON, E. K. & LÜSCHER, T. F. Nitric oxide inhibits angiotensin II -induced migration of rat aortic smooth muscle cell: role of cyclic-nucleotides and angiotensin 1 receptors. *J. Clin. Invest.* 96: 141-149, 1995.
- DURAND, P.; PROST, M.; LOREAU, N.; LUSSIER-CACAN, S.; BLACHE, D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest*, 81(5):645-672, 2001.
- EBERHARDT, R.T.; FORGIONE, M.A.; CAP, A.; LEOPOLD, J.A.; RUDD, M.A.; TROLLIET, M.; HEYDRICK, S.; STARK, R.; KLINGS, E.S.; MOLDOVAN, N.I.; YAGHOUBI, M.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J.; FARBER, H.W.; COHEN, R.; LOSCALZO, J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.*, 106(4):483-491, 2000.
- ELAHI, M.M., NASEEM, K.M., MATATA, B.M. Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. *The FEBS Journal*, 274(4): 906-923, 2007.
- EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.;LLESUY, S.; LISSI, E.A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):261-266, 2001.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*,43(1):61-68, 1997.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymology*, 105:114-121, 1984.
- FRIDOVICH, I. *Superoxide Dismutases. Annal Review of Biochemistry.* 44:147-157, 1975.
- GANONG, W.F. *Fisiologia Médica.* 17^aed. Rio de Janeiro: editora Prentice – Hall do Brasil LTDA, 1995.

- GENUTH, M.S. O Sistema Endócrino. In: BERNE, R. M. & LEVY, M. N. (ed) *Fisiologia*. 3^o ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996.
- GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated Chemiluminescence: an Assay for Oxidative Stress in Biopsies of Liver, Heart and Muscle. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 10:41-47, 1991.
- GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology*, 301:58-61, 1999.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBI, W.B. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22):7130-7139, 1974.
- HAGAR, H.H. Folic acid and vitamin B(12) supplementation attenuates isoprenaline-induced myocardial infarction in experimental hyperhomocysteinemic rats. *Pharmacological Research*, 46(3): 213-219, 2002.
- HAK, A.E.; POLDERMAN, K.H.; WESTENDORP, I.C.; JAKOBS, C.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J.C.; STEHOUWER, C.D. Increased plasma homocysteine after menopause. *Atherosclerosis*, 149(1):163-168, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th ed. Oxford University Press, 1999.
- HALPERN, B. N.; PACAUD, A. Technique de prélèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophtalmique. *Comptes Rendu de la Société du Biologie*. 145: 1465 – 1466, 1951.
- HANRATTY, C.G., MCGRATH, L.T., MCAULEY, D.F., YOUNG, I.S., JOHNSTON, G.D. The effects of oral methionine and homocysteine on endothelial function. *Heart*, 85(3): 326-330, 2001.
- HAYASHI, T.; FUKUTO, J.M.; IGNARRO, L.J. & CHAUDHURI, G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits:

implications for atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 11259-11263, 1992.

HAYASHI, T.; JAYACHANDRAN, M.; SUMI, D.; THAKUR, N.K.; ESAKI, T.; MUTO, E.; KANO, H.; ASAI, Y.; IGUCHI, A. Physiological concentration of 17beta-estradiol retards the progression of severe atherosclerosis induced by a high-cholesterol diet plus balloon catheter injury: role of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20(6):1613-1621, 2000.

HERRMANN, M., TABAN-SHOMAL, O., HÜBNER, U., BÖHM, M., HERRMANN, W. A review of homocysteine and heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 8: 571-576, 2006.

HEYDRICK, S.J.; WEISS, N.; THOMAS, S.R.; CAP, A.P.; PIMENTEL, D.R.; LOSCALZO, J.; KEANEY Jr., J.F. L- Homocysteine and L-Homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(5):632-640, 2004.

HISHIKAWA, K.; NAKAKI, T.; MARUMO, T.; SUZUKI, H.; KATO, R.; SARUTA, T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.*, 360(3):291-293, 1995.

HOGG, N. The effect of cyst(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(1):28-33, 1999.

HUA, C. & HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87(10):840-844, 2000.

HUANG, R.F.; HSU, Y.C.; LIN, H.L.; YANG, F.L. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *The Journal of Nutrition*, 131(1):33-38, 2001.

JACOBSEN, D,W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem.*, 44(8):1833-1843, 1998.

- JACOBSEN, D.W. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20(5):1182-1184, 2000.
- JI, C. & KAPLOWITZ, N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol*, 10(12):1699-1708, 2004.
- JOSEPH, J., JOSEPH, L., SHEKHAWAT, N.S., DEVI, S., WANG, J., MELCHERT, R.B., HAUER-JENSEN, M., KENNEDY, R.H. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285(2): H679-H686, 2003.
- JOSEPH, J., WASHINGTON, A., JOSEPH, L., KOEHLER, L., FINK, L.M., HAUER-JENSEN, M., KENNEDY, R.H. Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 283(6): H2567-H2574, 2002.
- KANANI, P.M.; SINKEY, C.A.; BROWNING, R.L. et al. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation*, 100:1161-1168, 1999.
- KIM, H. P.; LEE, J. Y.; JEONG, J. K.; BAE, S. W.; LEE, H. K.; JO, I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263: 257–262, 1999.
- KUHL, H. Cardiovascular effects and estrogen / gestagen substitution therapy. *Ther – Umsch.* 51(11):748-754, 1994.
- KULLER, L.H. & EVANS, R.W. Homocysteine, Vitamins and Cardiovascular Disease. *Circulation*, 98:196-199, 1998.
- KUNTZ, A.N.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SAYED, A.A.; CALIFF, L.L.; DESSOLIN, J.; ARNER, E.S.; WILLIAMS, D.L. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS Medicine*, 4(6) e206:1071-1086, 2007.

- LALONDE, R.; JOYAL, C.C.; BOTEZ, M.I. Effects of folic acid and folinic acid on cognitive and motor behaviors in 20-month-old rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 44(3):703-707, 1993.
- LAWRENCE DE KONING, A.B.; WERSTUCK, G.H.; ZHOU, J.; AUSTIN, R.C. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clinical Biochemistry*, 36:431-441, 2003.
- LEONCINI, G.; PASCALE, R.; SIGNORELLO, M.G. Effects of homocysteine on L-arginine transport and nitric oxide formation in human platelets. *Eur J Clin Invest.*, 33(8):713-9, 2003.
- LI, T., DANELISEN, I., BELLÓ-KLEIN, A., SINGAL, P.K. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovascular Research*, 46: 523-530, 2000.
- LLESUY, S. F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of Lipid Peroxidation and Myocardial Damage Induced by Adriamycin and 4'-epiadrimicin in Mice. *Tumori*, 71: 241 – 249, 1985.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275, 1951.
- MALINOW, M.R.; BOSTON, A.G.; KRAUSS, R.M. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases. *Circulation*, 99:178-182, 1999.
- MANNERVIK, B.; GLUTHENBERG, C. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology*, 77:231-235, 1981.
- MARIOTTI, F.; HAMMICHE, A.; BLOUETM, C.; DARE, S.; TOME, D.; HUNEAU, J.F. Medium-term methionine supplementation increases plasma homocysteine but not ADMA and improves blood pressure control in rats fed a diet rich in protein and adequate in folate and choline. *Eur J Nutr*, 45(7):383-390, 2006.

- MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: Greenwald RA (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* CRC, Press Boca Raton, pp. 243-247, 1985.
- MASSAFRA, C.; DE FELICE, C.; GIOIA, D.; BUONOCORE, G. Variations in erythrocyte antioxidant glutathione peroxidase activity during the menstrual cycle. *Clinical Endocrinology.*, 49:63-67, 1998.
- MATTE, C.; MONTEIRO, S.C.; CALCAGNOTTO, T.; BAVARESCO, C.S.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T. In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na⁺, K⁺-ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. *International J of Developmental Neuroscience*, 22(4):185-190, 2004.
- MATTHIAS, D.; BECKER, C.H.; RIEZLER, R.; KINDLING, P.H. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis*, 122(2):201-216, 1996.
- Mc CULLY, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Pathol.*, 56:111-128, 1969.
- MOSCA, L.; EDELMAN, D.; MOCHARI, H.; CHRISTIAN, A.H.; PAULTRE, F.; POLLIN, I. Waist circumference predicts cardiometabolic and global Framingham risk among women screened during National Woman's Heart Day. *Journal of Women's Health*, 15(1):24-34, 2006.
- MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; SKOVBY, F. Disorders of transsulfurations. In SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLED, D. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* 8th ed., New York, McGraw-Hill, 1279-1327, 2001.
- MURPHY, C.; NEWSOLME, P. Macrophage mediated lysis of a beta-cell line, tumor necrosis factor-alpha release from bacillus Calmetti-Guerin (BCG) activated murine macrophages and interleukin-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. *Clin Sci.*, 96(1): 89-97, 1999.

- NOHL, H. Nitric Oxide and related radicals. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, G. Poli. E. Albano & M.U. Dianzani (eds), 1993.
- NORDBERG, J. & ARNER, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.*, 31(11):1287-312, 2001.
- OBERLEY, T.D.; SHULTZ, J.L.; OBERLEY, L.W. In vivo modulation of antioxidant enzyme levels in normal hamster kidney and estrogen-induced kidney tumor. *Free Radical Biology & Medicine*, 16:741-751, 1994.
- ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286: R233–249, 2004.
- PALACE, V.P.; HILL, M.F.; FARAHMAND, F.; SINGAL, P.K. Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function after myocardial infarction. *Circulation*, 99(1):121-126, 1999.
- PERNA, A.F., INGROSSO, D., DE SANTOS, N.G. Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids*, 25: 409-417, 2003.
- PERRY, D.J. Hyperhomocysteinaemia. *Baillière's Clinical Haematology*, 12(3):451-477, 1999.
- PFEILSCHIFTER, J.; KODITZ, R.; PFOHL, M.; SCHATZ, H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr. Rev.*, 23:90–119, 2002.
- PROKAI, L.; PROKAI-TATRAI, K.; PERJESI, P.; ZHARIKOVA, A.D.; PEREZ, E.J.; LIU, R.; SIMPKINS, J.W. Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(20):11741-11746, 2003.
- REZNICK, A. Z., PACKER, L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233: 357-363, 1994.
- ROBERT, K.; NEHME, J.; BOURDON, E.; PIVERT, G.; FRIGUET, B.; DELCAYRE, C.; DELABAR, J.M.; JANEL, N. Cystathionine beta synthase

deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology*, 128(5):1405-1415, 2005.

ROBIN, S.; COURDEROT-MASUYER, C.; NICOD, L.; JACQUESON, A.; RICHERT, L.; BERTHELOT, A. Opposite effect of methionine-supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15:80-89, 2004.

ROMERIO, S.C.; LINDER, L.; NYFELER, J.; WENK, M.; LITYNSKY, P.; ASMIS, R.; HAEFELI, W.E. Acute hyperhomocysteinemia decreases NO bioavailability in healthy adults. *Atherosclerosis*, 176: 337-344, 2004.

ROSSELI, M.; IMTHURN, B.; MACAS, E.; KELLER, P.J. & DUBEY, R.K. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1543-1552, 1994.

SCHERER, E.B.; STEFANELLO, F.M.; MATTOS, C.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T. Homocysteine reduces cholinesterase activity in rat and human serum. *International J of Developmental Neuroscience*, 25(4):201-205, 2007.

SIES, H. (ed.) *Antioxidants in Diseases: Mecanisms and Therapy*. (Advances in Pharmacology vol 38) Califórnia: Academic Press, 1997.

SIGNORELLO, M.G.; PASCALE, R.; LEONCINI, G. Effect of homocysteine on arachidonic acid released in human platelets. *European Journal of Clinical Investigation*, 32:279-284, 2002.

SINGAL, P.K.; KHAPER, N.; FARAHMAD, F.; BELLÓ-KLEIN, A. Oxidative stress in congestive Heart Failure. *Current Cardiology Reports*, 2:206-211, 2000.

SPENCER, T.A., CHAI, H., FU, W., RAMASWAMI, G., COX, M.W., CONKLIN, B.S., LIN, P.H., LUMSDEN, A.B., YAO, Q., CHEN, C. Estrogen blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine arteries. *Journal of Surgical Research*, 118: 83-90, 2004.

- STRECK, E.L.; BAVARESCO, C.S.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behavioural Brain Research*, 153(2):377-381, 2004.
- STRECK, E.L.; MATTE, C.; VIEIRA, P.S.; ROMBALDI, F.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. Reduction of Na(+),K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochemical Research*, 27(12):1593-1598, 2002.
- STRECK, E.L.; VIEIRA, P.S.; WANNMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metabolic Brain Disease*, 18(2):147-154, 2003.
- STREHLOW, K.; ROTTER, S.; WASSMANN, S.; ADAM, O.; GROHÉ, C.; LAUFS, K.; BÖHM M.; NICKENIG, G. Modulation of Antioxidant Enzyme Expression and Function by Estrogen. *Circulation Research*, 93:170-177, 2003.
- SUEMATSU, N., OJAIMI, C., KINUGAWA, S., WANG, Z., XU, X., KOLLER, A., RECCHIA, F.A., HINTZE, T.H. Hyperhomocysteinemia alters cardiac substrate metabolism by impairing nitric oxide bioavailability through oxidative stress. *Circulation*, 115: 255-262, 2007.
- SUNDSTRÖM, J., SULLIVAN, L., SELHUB, J., BENJAMIN, E.J., D'AGOSTINO, R.B., JACQUES, P.F., ROSENBERG, I.H., LEVY, D., WILSON, P.W., VASAN, R.S. Relations of plasma homocysteine to left ventricular structure and function: the Framingham Heart Study. *European Heart Journal*, 25(6): 523-530, 2004.
- SYDOW, K.; BOGER, R.H. Homocysteine, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: pathomechanisms and therapeutic options. *Zeitschrift fur Kardiologie*. 90(1):1-11, 2001
- TAVARES, J.R.; STEFANINI, E.; LIMA V.C.; CARVALHO, A.C. Homocisteína e Coronariopatia. *Revista Sociedade Cardiologia do Estado de São Paulo*, 10(6):712-722, 2000.

THAMBYRAJAH, J.; LANDRAY, M.J.; MCGLYNN, F.J.; JONES, H.J.; WHEELER, D.C.; TOWNEND, J.N. Does folic acid decrease plasma homocysteine and improve endothelial function in patients with predialysis renal failure? *Circulation*, 102(8):871-875, 2000.

TITLE, L.; CUMMNINGS, P.; GIDDENS, K.; GENEST, J.; NASSAR, B. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Journal American College Cardiology*, 36:758–765, 2000.

TOSTES, R. C.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36:1143–1158, 2003.

TSAI, J.C.; WANG, H.; PERRELLA, M.A.; YOSHIZUMI, M.; SIBINGA, N.E.; TAN, L.C.; HABER, E.; CHANG, T.H.; SCHLEGEL, R.; LEE, M.E. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 97:146-153, 1996.

TSIKAS, D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res.*, 39(8):797-815, 2005.

TURGEON, J.L. Complex Actions of Sex Steroids in Adipose Tissue, the Cardiovascular System, and Brain: Insights from Basic Science and Clinical Studies. *Endocrine Reviews*, 27 (6): 575-605, 2006.

UNGVARI, Z., CSISZAR, A., BAGI, Z., KOLLER, A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced coronary dilation in hyperhomocysteinemia: morphological and functional evidence for increased peroxynitrite formation. *The American Journal of Pathology*, 161(1): 145-153, 2002.

UNGVARI, Z., PACHER, P., RISCHÁK, K., SZOLLÁR, L., KOLLER, A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19: 1899-1904, 1999.

- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1): 44-84, 2007.
- VAN-BUREN, G.A.; YANG, D.S.; CLARK, K.E. Estrogen-induced uterine vasodilation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167: 828-833, 1992.
- VASAN, R.S., BEISER, A., D'AGOSTINO, R.B., LEVY, D., SELHUB, J., JACQUES, P.F., ROSENBERG, I.H., WILSON, P.W. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 289(10): 1251-1257, 2003.
- VERHOEF, P., MELEADY, R., DALY, L.E., GRAHAM, I.M., ROBINSON, K., BOERS, G.H. Homocysteine, vitamin status and risk of vascular disease; effects of gender and menopausal status. *European Heart Journal*, 20(17): 1234-1244, 1999.
- VILASECA-BUSCA, M.A.; ARTUCH-IRIBERRI, R.; COLOME-MALLOLAS, C.; BRANDI-TARRAU, N.; CAMPISTOL, J.; PINEDA-MARFA, M.; SIERRA-MARCH, C. Alteraciones del sistema antioxidante en errores congénitos del metabolismo intermediario. *Revista de Neurología*, 34(11):1021-1024, 2002.
- VIRDIS, A., GHIADONI, L., PINTO, S., LOMBARDO, M., PETRAGLIA, F., GENNAZZANI, A., BURALLI, S., TADDEI, S., SALVETTI, A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation*, 101(19): 2258-63, 2000.
- VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; CARDINAL, H. et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocystinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(4):1106-1115, 2001.
- WASSMANN, S.; BÄUMER, A.T.; STREHLOW, K.; VAN EICKELS, M.; GROHÉ, C.; AHLBORY, K.; RÖSEN, R.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. Endothelial

dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 103:435-441, 2001.

WAYNFORTH, H.B. & FLECKNELL, P.A. Experimental and Surgical Technique in the Rat. *Academic Press Limited*, London, 2^a ed., 276-278, 1992.

WEISS, N.; KELLER, C.; HOFFMANN, U.; LOSCALZO, J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vascular Medicine*, 7(3):227-39, 2000.

WELCH, G.N.; LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. *The New England Journal of Medicine*, 338(15): 1042-50, 1998.

WELCH, G.N.; UPCHURCH, J.R.; LOSCALZO, J. Hyperhomocyst(e)inemia and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci.*, 811:48-58, 1997.

WIERNAN, M.E. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Advances in Physiology Education*, 31:26-33, 2007.

WILCKEN, D.E.L. & WILCKEN, B. The pathogenesis of coronary artery disease: a possible role of methionine metabolism. *J. Clin. Invest.*, 57:1979-1982, 1976.

WILLIAMS, C.L.; STANCEL, G.M. Estrogênios e Progestogênios. In: GOODMAN E GILMAN (ed). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9^oed., 1996.

XU, Y., ARMSTRONG, S.J., ARENAS, I.A., PEHOWICH, D.J., DAVIDGE, S.T. Cardioprotection by chronic estrogen or superoxide dismutase mimetic treatment in the aged female rat. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(1): H165-H171, 2004.

YU, B.P. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews*. 74(1):139-162, 1994.

ZHANG, X., LI, H., EBIN, Z., BRODSKY, S., GOLIGORSKY, M.S. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 279: F671-F678, 2000.

ANEXO 1

Artigo submetido à Life Science.

Ventricular dysfunction induced by methionine is related to myocardial oxidative stress in female ovariectomized rats.

Barp, J.¹; Schenkel, P.¹; Llesuy, S.²; Wyse, A.T.S.³, Belló-Klein, A¹

Comprovante de submissão:

Dear Dr. Belló-Klein, Your submission entitled "Ventricular dysfunction induced by methionine is related to myocardial oxidative stress in female ovariectomized rats" has been received by Life Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences