



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

**Ácido acetilsalicílico como estratégia
neuroprotetora em ratos submetidos à
hiperhomocisteinemia leve: Avaliações
neuroquímicas e morfológicas**

Daniella de Souza Moreira

Orientadora: Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre

2017

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

**Ácido acetilsalicílico como estratégia
neuroprotetora em ratos submetidos à
hiperhomocisteinemia leve: Avaliações
neuroquímicas e morfológicas**

Daniella de Souza Moreira

Orientadora: Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

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

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Moreira, Daniella de Souza
Ácido acetilsalicílico como estratégia
neuroprotetora em ratos submetidos à
hiperhomocisteinemia leve: Avaliações neuroquímicas e
morfológicas / Daniella de Souza Moreira. -- 2017.
61 f.
Orientadora: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. homocisteína. 2. hiperhomocisteinemia leve. 3.
ácido acetilsalicílico. 4. inflamação. 5. estresse
oxidativo/nitrativo. I. Wyse, Angela Terezinha de
Souza, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar presente em minha vida, me guiando e me dando forças para seguir em frente e para vencer quaisquer obstáculos.

À minha orientadora Profa Angela T. S. Wyse, pela confiança e receptibilidade em seu grupo de pesquisa, pela orientação e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Gilberto e Socorro, por estarem sempre ao meu lado, apoiando minhas decisões, me aconselhando e ajudando a trilhar meu caminho com muito amor, coragem e incentivo.

Às minhas irmãs, Karyne e Rafaella, por me considerarem um exemplo, pela admiração, amor e carinho que me proporcionam.

Ao meu namorado Bruno, por me ouvir durante toda essa jornada, sempre me motivando e apoiando com seus conselhos e amor.

Aos meus amigos, especialmente à Raíssa, que caminha junto comigo desde a graduação, obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos colegas e amigos do laboratório Paula, Fê, Cassi, Helena, Tiago, Eduardo, Felipe, Carol Prezzi, Carol Gessinger, Carol Gasparin, Mari, Josi e demais colegas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho e por terem me recebido bem em Porto Alegre, obrigada também pela amizade e convivência.

À Profa Vanusa Manfredini da Universidade Federal do Pampa, pela colaboração neste trabalho.

À Profa Maria Cristina Heuser e à Fran Rohden, pela colaboração neste trabalho.

À UFRGS e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica por essa oportunidade de ensino gratuito e de qualidade.

Aos professores e funcionários da UFRGS e do Departamento de Bioquímica.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

A todos vocês: muito obrigada!

Pressa do dia

Um dia, descobrirás
Que o que se vive
Não regressa
Que o sonho
Não tem pressa
Que o amor
Não engessa
Que a alma
Não é possessa
Que a liberdade
Anda de mãos
Dadas com a leveza
Que a idade
Pede calma
E faz bem pra alma
Que a vida
Mesmo sem pressa
Passa depressa
Que cada dia,
É, *per se*,
Uma vida
Faça dela
Da vida
Sua melhor
Amiga
Simples:
Viva a vida

Angela Wyse

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1 INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Homocisteína	5
1.2 Hiperhomocisteinemia	7
1.3 Hiperhomocisteinemia leve	9
1.4 Inflamação.....	11
1.5 Óxido nítrico	13
1.6 Estresse oxidativo/nitrativo.....	14
1.7 Terapia anti-inflamatória	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
PARTE II.....	18
CAPÍTULO I.....	18
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	19
3.1 Artigo científico	19
PARTE III	33
4 DISCUSSÃO.....	34
5 CONCLUSÕES	42
6 PERSPECTIVAS	44
7 REFERÊNCIAS.....	45
8 ANEXOS.....	55
8.1 Anexo I - Carta de aprovação do comitê de ética	55

PARTE I

RESUMO

A homocisteína é um aminoácido sulfurado derivado do metabolismo da metionina. Quando os níveis plasmáticos de homocisteína ultrapassam 10-15 μM , tem-se uma condição conhecida como hiperhomocisteinemia, a qual pode ser classificada em leve ($>10 \mu\text{M}$), moderada ($>30 \mu\text{M}$) ou severa ($>100 \mu\text{M}$). A hiperhomocisteinemia leve não tem origem genética, sendo considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e vasculares, incluindo isquemia cerebral e cardíaca. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo químico induzido de hiperhomocisteinemia leve crônica em ratos adultos jovens e, usando esse modelo foi mostrado que existe associação entre essa condição e alterações em parâmetros de inflamação e estresse oxidativo/nitrativo em tecido cerebral. O objetivo do presente estudo foi avaliar se o ácido acetilsalicílico tem papel neuroprotetor no efeito da homocisteína sobre os níveis de interleucinas IL-1 β e IL-6, atividade e imunocontéudo da acetilcolinesterase, biodisponibilidade de óxido nítrico, atividade e imunocontéudo das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, conteúdo de sulfidrilas e índice de dano ao DNA. Também realizamos análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão em córtex cerebral de ratos submetidos ao modelo. Ratos Wistar receberam homocisteína (0,03 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal) por injeções subcutâneas duas vezes ao dia e ácido acetilsalicílico (25 mg/Kg de peso corporal) por injeções intraperitoneais uma vez ao dia, do dia 30 ao 60º dia pós-parto. Ratos controles receberam o mesmo volume da solução veículo. Doze horas após a última injeção, alguns animais foram decapitados para posteriores análises bioquímicas, e outros animais foram perfundidos para posterior análise morfológica. Os resultados mostraram que os ratos submetidos à hiperhomocisteinemia leve apresentaram aumento significativo dos níveis de IL-1 β , IL-6 e da atividade da acetilcolinesterase, bem como níveis reduzidos de nitritos. A homocisteína também diminuiu as atividades da superóxido dismutase e catalase, bem como o imunocontéudo da catalase. Danos às proteínas e DNA, assim como alterações ultraestruturais também foram observadas no córtex cerebral dos animais hiperhomocisteinêmicos. O ácido acetilsalicílico preveniu totalmente o efeito da homocisteína sobre a atividade da acetilcolinesterase, atividade e imunocontéudo da catalase, e alterações ultraestruturais. As alterações nos níveis de IL-1 β , atividade de superóxido dismutase, conteúdo de sulfidrilas e dano ao DNA foram parcialmente prevenidas pelo ácido acetilsalicílico. Nossos achados mostraram que o modelo induzido quimicamente de hiperhomocisteinemia leve alterou alguns parâmetros inflamatórios, oxidativos/nitrativos e morfológicos. Nossos resultados também sugerem que o ácido acetilsalicílico desempenha um papel neuroprotetor nas condições apresentadas, pois preveniu a maior parte dessas alterações. Porém, a administração crônica do ácido acetilsalicílico também apresentou efeito *per se* significativo de dano ao DNA, o qual deve ser melhor elucidado em estudos posteriores.

Palavras-chave: homocisteína, hiperhomocisteinemia, ácido acetilsalicílico, inflamação, estresse oxidativo/nitrativo, alterações ultraestruturais.

ABSTRACT

Homocysteine is a sulfur amino acid derived from methionine metabolism. When plasma homocysteine levels exceed 10-15 μM , there is a condition known as hyperhomocysteinemia, which can be classified as mild ($>10 \mu\text{M}$), moderate ($>30 \mu\text{M}$), or severe ($>100 \mu\text{M}$). Mild hyperhomocysteinemia does not have genetic origin and it is considered a risk factor for the development of neurodegenerative and vascular diseases, including cerebral and cardiac ischemia. Our research group has developed an induced chemical model of chronic mild hyperhomocysteinemia in young adult rats and using this model, it has been shown an association between this condition and changes in parameters of inflammation and oxidative/nitrative stress in brain tissue. The objective of the present study was to evaluate if acetylsalicylic acid has a neuroprotective role in the effect of homocysteine on IL-1 β and IL-6 interleukin levels, acetylcholinesterase activity and immunocontent, nitric oxide bioavailability, activity and immunocontent of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase, sulfhydryl content and DNA damage index. We also performed morphological analysis by transmission electron microscopy in the cerebral cortex of rats submitted to the model. Wistar male rats received homocysteine (0.03 $\mu\text{mol/g}$ of body weight) by subcutaneous injections twice a day and acetylsalicylic acid (25 mg/Kg of body weight) by intraperitoneal injections once a day from the 30th to the 60th postpartum day. Control rats received the same volume of vehicle solution. Twelve hours after the last injection, some animals were decapitated for subsequent biochemical analyzes, and other animals were perfused for subsequent morphological analysis. The results showed that rats submitted to mild hyperhomocysteinemia significantly increased levels of IL-1 β , IL-6, acetylcholinesterase activity and reduced nitrite levels. Homocysteine also decreased the activities of superoxide dismutase and catalase, as well as catalase's immunocontent. Damage to proteins and DNA as well as ultrastructural changes were also observed in the cerebral cortex of hyperhomocysteinemic animals. Acetylsalicylic acid totally prevented the effect of homocysteine on acetylcholinesterase activity, catalase activity and immunocontent, and ultrastructural changes. Alterations in IL-1 β levels, superoxide dismutase activity, sulfhydryl content and DNA damage were partially prevented by acetylsalicylic acid. Our findings showed that the chemically induced model of mild hyperhomocysteinemia altered some inflammatory, oxidative/nitrative and morphological parameters. Our results also suggest that acetylsalicylic acid plays a neuroprotective role in the conditions presented, as it prevented most of these changes. However, chronic administration of acetylsalicylic acid also had a significant effect of DNA damage, which should be better elucidated in later studies.

Keywords: homocysteine, hyperhomocysteinemia, acetylsalicylic acid, inflammation, oxidative/nitrative stress, ultrastructural changes.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
AINEs	anti-inflamatórios não esteróides
ATP	adenosina trifosfato
ASA	ácido acetilsalicílico
CBS	cistationina β -sintase
CAT	catalase
COX	ciclooxigenase
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
IL	interleucina
Hcy	homocisteína
MAT	metionina-adenosiltransferase
Met	metionina
MS	metionina sintase
MTHFR	5,10-metilenotetrahidrofolato redutase
NOS	óxido nítrico sintase
SAH	S-adenosil homocisteína
SAM	S-adenosil metionina
SOD	superóxido dismutase
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa

1 INTRODUÇÃO

1.1 Homocisteína

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado não essencial e não proteico, a qual possui estrutura semelhante à cisteína, exceto por um átomo de carbono adicional, razão pela qual recebe esse nome (Figura 1). A Hcy foi descoberta no início do século XX por Du Vigneaud, após o aquecimento da metionina (Met) em ácido sulfúrico, sendo uma intermediária chave no metabolismo da Met, nas reações de transmetilação e na rota de transsulfuração (Butz e du Vigneaud, 1932; McCully, 2015).

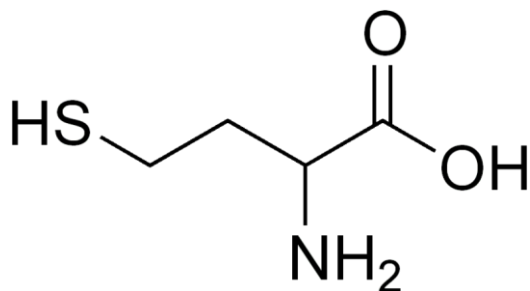


Figura 1. Molécula de homocisteína.

Como mostrado na figura 2, a Met proveniente da dieta ou da degradação de proteínas endógenas, recebe um grupo adenosil do ATP, e é convertida a S-adenosil metionina (SAM) pela ação da enzima metionina-adenosiltransferase (MAT). A SAM pode ser utilizada na síntese de poliaminas, porém, sua principal função envolve reações de transmetilação, como doadora do grupo metil para outras moléculas, como os ácidos nucleicos. Após doação de seu grupamento metil, a SAM passa a ser S-adenosil homocisteína (SAH), que posteriormente é hidrolisada a Hcy e adenosina. A Hcy pode seguir duas rotas a partir de então: a rota de transulfuração e a de remetilação. Na rota de transulfuração, em condições normais, aproximadamente 50% da Hcy disponível se condensa com a serina, reação irreversível catalizada pela enzima cistationina β -sintase (CBS) dependente do fosfato piridoxal (vitamina B6), dando origem a cistationina e

posteriormente, a cisteína. A Hcy remanescente é remetilada a metionina pela ação enzimática da metionina sintase (MS), que utiliza a vitamina B12 como co-fator. O grupamento metil necessário para a reação de remetilação, provém em grande parte do 5-metiltetrahidrofolato (forma circulante do folato) pela ação enzimática da 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), e em menores quantidades da betaína. A via de remetilação está presente em todos os tecidos, como uma forma de conservar a Met nos organismos vivos. Entretanto, a via de transulfuração tem distribuição limitada ao fígado, pâncreas, rins, intestino e cérebro (Aguilar et al., 2004; Bydlowski et al., 1998; Finkelstein, 2007).

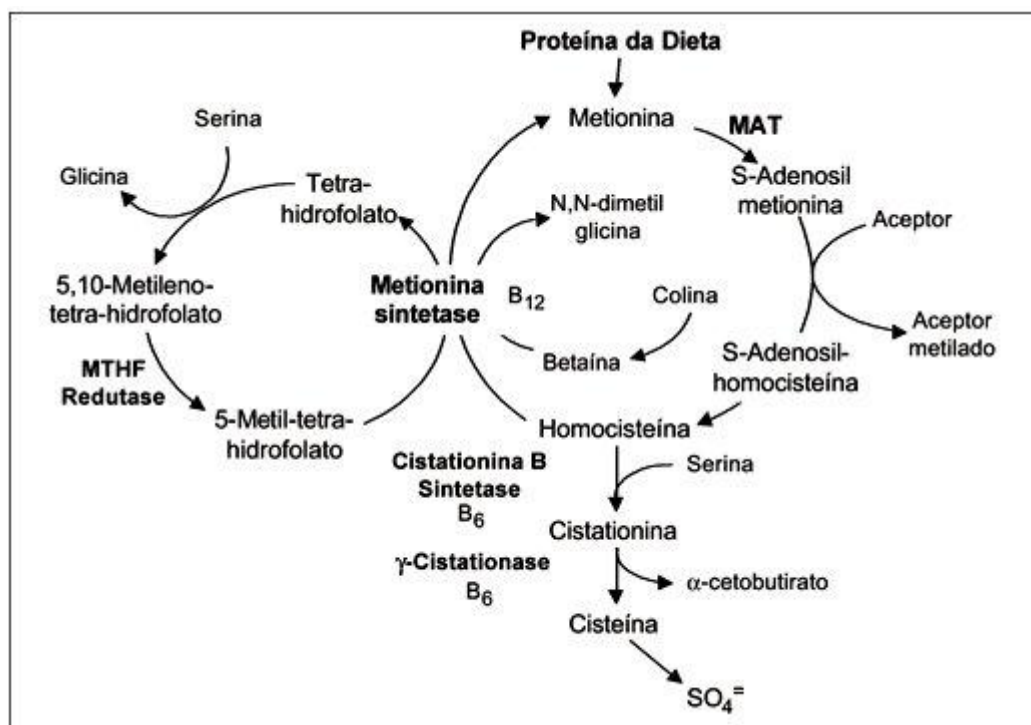


Figura 2. Metabolismo da homocisteína (Bydlowski et al., 1998).

Existem vias de regulação no metabolismo da Met responsáveis por manterem os níveis dos aminoácidos Met e Hcy dentro da normalidade. O destino da Hcy para a rota de transulfuração ou remetilação por exemplo, depende de uma dessas vias de regulação,

a qual é regulada pelos níveis de Met, e consequentes níveis de SAM. Quando os níveis de Met e SAM estão altos, SAM é capaz de ativar a CBS e, simultaneamente inibir a MTHR, favorecendo a via de transulfuração e suprimindo a via de remetilação, retornando ambos aminoácidos para seus níveis basais (Lai e Kan, 2015). Sendo que quando os níveis de Met e SAM estão altos, cerca de 70% da Hcy é catalizada pela via de transulfuração, e quando estão baixos, somente cerca de 10% da Hcy entra nessa via (Aguilar et al., 2004).

No sangue, devido às condições oxidativas e à alta reatividade de seu grupo tiol, somente 1-2% da Hcy está disponível na forma reduzida (grupo tiol livre) e o restante está na forma oxidada como dissulfetos, sendo que aproximadamente 75-90% estão ligados a proteínas (principalmente albumina). A Hcy total engloba o conjunto de todas suas frações, livres ou não. A Hcy plasmática é catabolizada principalmente pelo fígado e os rins, que possuem altas quantidades da enzima CBS e condições redutoras que facilitam sua metabolização e excreção pela urina, as quais são importantes para manter a Hcy em níveis normais (Castro et al., 2006; Škovierová et al., 2016).

1.2 Hiperhomocisteinemia

Em humanos, os níveis plasmáticos de Hcy variam entre 5 e 15 $\mu\text{mol/L}$ em condições normais (Ueland et al., 1993). Porém, estudos mais recentes consideram os valores para níveis plasmáticos de Hcy normais entre 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$ (Škovierová et al., 2016). Disfunções no metabolismo da Hcy resultam no acúmulo desse aminoácido nos tecidos, e consequentemente no sangue, gerando uma condição conhecida como hiperhomocisteinemia. A hiperhomocisteinemia pode ser classificada de acordo com os níveis plasmáticos de Hcy em severa ($>100 \mu\text{mol/L}$), moderada ($>30 \mu\text{mol/L}$) ou leve

(>10 $\mu\text{mol/L}$) (Banecka-Majkutewicz et al., 2012; Petras et al., 2014; Škovierová et al., 2016).

A hiperhomocisteinemia severa é conhecida por uma disfunção genética rara chamada de homocistinúria. A homocistinúria foi descrita pela primeira vez em 1964 como resultado da deficiência da enzima CBS (Mudd et al., 1964). As manifestações clínicas incluem deficiência mental, doença cardiovascular, tromboembolismo, osteoporose e subluxação das lentes oculares (Mudd et al., 2001).

As hiperhomocisteinemias moderada e leve são prevalentes na população em geral, sendo associadas à outras condições e/ou como fatores de risco independentes. Podem ser causadas pelo polimorfismo no gene da enzima MTHFR, deficiência de nutrientes importantes no metabolismo da Hcy (folato, vitamina B12 e B6), alta ingestão de proteína (aumento da Met), alguns hábitos diários (por exemplo fumar, consumo de café, falta de exercício físico e alcoolismo), idade, insuficiência renal crônica e/ou em decorrência do uso de certos medicamentos (Aguilar et al., 2004; Castro et al., 2006; Kulkarni e Richard, 2003; LENTZ, 2005; McCully, 2015).

Modelos experimentais de hiperhomocisteinemias têm sido descritos em animais nocaute para as enzimas CBS (Watanabe et al., 1995), MTHFR (Chen et al., 2001) e mediante administração de Met (Boyacioglu et al., 2014). Nosso grupo de pesquisa desenvolveu modelos animais quimicamente induzidos de hiperhomocisteinemia severa (Streck et al., 2002) e leve (Scherer et al., 2011) mediante administração de Hcy. Usando esses modelos, tem sido mostrado que a Hcy causa alterações bioquímicas e comportamentais em ratos.

1.3 Hiperhomocisteinemia leve

A hiperhomocisteinemia leve é prevalente na população em geral, principalmente em idosos, e suas causas estão associadas a fatores fisiológicos, patológicos, nutricionais, medicamentosos, hormonais e hábitos cotidianos. Os principais fatores fisiológicos são gênero e idade, sendo que os níveis de Hcy se encontram mais altos em homens e idosos. Algumas patologias como insuficiência renal crônica, diabetes, psoríase e doenças neurodegenerativas estão associadas com o aumento dos níveis de Hcy. A deficiência de vitaminas do complexo B e de ácido fólico representam os principais fatores nutricionais. Alguns medicamentos podem alterar a disponibilidade desses nutrientes no organismo, sabe-se, por exemplo, que o ácido fólico está diminuído durante a terapia com metotrexato e anticonvulsivantes (fenitoína e carbamazepina), enquanto que a vitamina B12 e B6 estão diminuídas com o uso de anestésico (óxido nitroso) e teofilina, respectivamente. Distúrbios hormonais como a queda de estrógenos durante a menopausa e de hormônios tireoidianos em hipotireóides culminam no aumento dos níveis de Hcy. Hábitos alimentares como a alta ingestão de proteína (aumento da Met), fumar, consumo de café, falta de exercício físico e alcoolismo também estão associados ao aumento dos níveis de Hcy (Aguilar et al., 2004; Castro et al., 2006; Kulkarni e Richard, 2003; Lentz, 2005; McCully, 2015; Neves et al., 2004).

Uma leve alteração nos níveis plasmáticos de Hcy é o suficiente para aumentar ou diminuir o risco de doenças vasculares. Uma meta-análise associou a redução em aproximadamente 3 $\mu\text{mol/L}$ dos níveis plasmáticos de Hcy com a redução aproximada de 11% para risco de infarto isquêmico do coração e 19% para risco de derrame em indivíduos sem histórico de doenças cardiovasculares (Homocysteine Studies Collaboration, 2002; Lentz, 2005). Outra meta-análise mostrou que um aumento de 5 $\mu\text{mol/L}$ nos níveis plasmáticos de Hcy estaria associado a um aumento do risco de

doenças vasculares em 60% para homens e 80% para mulheres (Boushey et al., 1997; Lai e Kan, 2015).

Ainda não se sabe se a Hcy é a causa ou um marcador para doenças vasculares e cardiovasculares. Porém, estudos em animais mostram que a Hcy desempenha um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose, e acredita-se que alguns fatores estejam envolvidos com a disfunção endotelial, como por exemplo, a redução da biodisponibilidade de NO, estresse oxidativo, entre outros (Aguilar et al., 2004; Lentz, 2005; Scherer et al., 2011). Além de ser considerada fator de risco para doenças vasculares e cardiovasculares, a hiperhomocisteinemia leve também é considerada fator de risco para doenças neurodegenerativas (Petras et al., 2014). Isobe et al (2005) sugeriu que o aumento nos níveis de Hcy em líquido cefalorraquidiano de pacientes com doenças de Alzheimer e Parkinson estaria relacionado com a patogênese dessas doenças. Seshadri et al (2002) indicou associação entre o aumento de níveis plasmáticos de Hcy e o risco de demência e doença de Alzheimer. Nosso grupo mostrou que animais induzidos quimicamente para hiperhomocisteinemia crônica leve apresentam alterações de estresse oxidativo, nitrativo e inflamação em estruturas cerebrais (Scherer et al., 2014, 2011).

Ainda não se sabe claramente como a Hcy exerce sua toxicidade. Várias hipóteses têm sido discutidas na literatura, entre elas: a homocisteinilação, a indução de estresse oxidativo e/ou a excitotoxicidade (Škovierová et al., 2016). A homocisteinilação pode ser entre o grupo tiol livre da Hcy e o grupo tiol livre de uma proteína (S-homocisteinilação) ou pela interação com a lisina de uma proteína (N-homocisteinilação). A homocisteinilação prejudica a estrutura e função da proteína modificada, além de causar ativação da resposta imune, toxicidade e morte celular (Petras et al., 2014). A Hcy pode induzir estresse oxidativo mediante sua autooxidação, inibição de enzimas antioxidantes, ativação de NADPH oxidases, entre outras formas (Lehotsky et al., 2015). A Hcy

também tem sido associada a morte neuronal via excitotoxicidade, atuando como agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópicos (Boldyrev et al., 2013).

1.4 Inflamação

A inflamação é uma resposta a infecção ou injúria tecidual. Ocorre na presença de leucócitos e mediadores pró-inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), cujo principal objetivo é restaurar a homeostase do tecido. O processo inflamatório engloba a vasodilatação, recrutamento de leucócitos, aumento da permeabilidade vascular, liberação de proteínas de fase aguda e de fatores de coagulação e é balanceado com a liberação de citocinas anti-inflamatórias (Pavlov e Tracey, 2012). Estudos *in vitro* mostraram que a Hcy é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão que medeiam a interação entre células endoteliais e leucócitos. O acúmulo de leucócitos na parede arterial faz parte do processo inflamatório e está associado a aterosclerose, sendo uma das explicações para que a Hcy seja considerada um fator de risco para doenças vasculares (Koga et al., 2002; Poddar et al., 2001).

Em uma resposta inflamatória aguda, a presença de neutrófilos é predominante e a resolução da inflamação ocorre mediante a regeneração do tecido. Quando a resposta inflamatória se torna crônica, a presença de macrófagos e linfócitos T é mais evidente, ocorrem a formação de tecido fibroso e possíveis danos ao tecido saudável (Kulkarni et al., 2016). A neuroinflamação também tem um papel protetor em restaurar as células gliais e neuronais danificadas, porém, de forma crônica, se torna nociva. A neuroinflamação crônica desempenha um papel importante nas doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Esclerose Múltipla (Baune, 2015; Hald

and Lotharius, 2005; Heneka et al., 2010; Hirsch et al., 2012). A neurodegeneração é mediada pelas interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-33, fator de necrose tumoral (TNF- α), quimiocina CCL2, CCL5, metaproteinases, substância P, espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), elevação de Ca⁺ intracelular, dentre outros fatores (Kempuraj et al., 2016).

Acreditava-se que o sistema nervoso central fosse uma área imuno-privilegiada, em razão de suas características fisiológicas e presença da barreira hemato-encefálica. Porém, estudos recentes vêm mostrando que o sistema nervoso central é na verdade, um local ativo de constante vigilância que se comunica bidirecionalmente com o sistema imunológico, a fim de se manter a homeostase. A inflamação é controlada mediante essa comunicação entre o cérebro e o sistema imunológico que ocorre por intermedio de fibras aferentes e eferentes do nervo vago e pelo reflexo inflamatório (Louveau et al., 2015; Shrestha et al., 2013).

Estudos sugerem que a acetilcolina (ACh) está envolvida no controle anti-inflamatório por intermedio do nervo vago, na chamada "via anti-inflamatória colinérgica". Quando estimulado, o nervo vago eferente estimula a produção de ACh, a qual é capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (Pavlov e Tracey, 2012; Tracey et al., 2000). A disponibilidade de ACh está reduzida em doenças neurodegenerativas, como a Alzheimer, e está relacionada com o declínio cognitivo (Schliebs e Arendt, 2006). Já foi mostrado, em ratos, que a Hcy promove neuroinflamação mediante o aumento de citocinas pró-inflamatórias e atividade da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da ACh, em modelos animais de hiperhomocisteinemia crônica leve e severa (Da Cunha et al., 2012; Scherer et al., 2014).

1.5 Óxido nítrico

O NO é uma molécula importante em processos fisiológicos e patológicos e está envolvida em diversas vias de sinalizações intra e intercelulares. O NO participa na dilatação de vasos sanguíneos, transmissão neuronal, contração cardíaca, além de ser um potente inibidor da agregação plaquetária, proliferação de células do músculo liso e ativação inflamatória. Além disso, NO pode modular a função proteica mediante S-nitrosilação de grupos tióis, produzindo compostos chamados de S-nitrosotióis que agem como reservatórios de NO (Johal et al., 2014; Lei et al., 2013).

O NO é um radical livre gasoso sintetizado a partir da L-arginina pela NO sintase (NOS) que está presente em mamíferos em 3 isoformas: NOS endotelial, NOS neuronal e NOS induzível (Lei et al., 2013). Essa molécula possui um tempo de meia vida de segundos e pode ser neutralizada pela hemoglobina, azul de metileno e ânion superóxido (O_2^-) (Rodeberg et al., 1995). Quando reage com o O_2^- , se forma um potente oxidante conhecido como peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual pode ser danoso às células, promovendo estresse oxidativo/nitrativo (Förstermann e Sessa, 2012). Sob condições de estresse oxidativo e inflamação, mais O_2^- é formado a partir da NOS endotelial desacoplada e da ativação de oxidases, o qual reage rapidamente com NO para formar $ONOO^-$, reduzindo a biodisponibilidade de NO (Lundberg et al., 2015).

A redução da biodisponibilidade e da sinalização de NO está associada a diversos fatores de risco, que são os mesmos para doenças cardiovasculares e vasculares também, como a dieta alimentar, sedentarismo, idade, fumo, diabetes, histórico familiar, entre outros (Lundberg et al., 2015; Price et al., 2000). Estudos mostram que a Hcy também é capaz de reduzir a biodisponibilidade de NO (Kolling et al., 2011; Scherer et al., 2011).

1.6 Estresse oxidativo/nitrativo

O estresse oxidativo se define por um desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes, podendo resultar em dano oxidativo em diversas moléculas biológicas, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios e proteínas, estando assim associado, a diversas patologias (Halliwell, 2007). O estresse nitrativo se enquadra na mesma definição, com a diferença de que se refere às ERN (Hausladen e Stamler, 1999; Klatt e Lamas, 2000).

As espécies reativas são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e são capazes de existir independentemente, sendo as mais conhecidas, as ERO e as ERN. ERO são geradas a partir do metabolismo energético e englobam os radicais de oxigênio e seus derivados não-radicaais, sendo os mais importantes, o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet), ânion hipoclorito (ClO^-) e o "oxigênio singlet" (1O_2). ERN são representadas principalmente pelo NO e o NOO^- (Halliwell, 2006). Em altas concentrações, as espécies reativas podem causar danos oxidativos em moléculas biológicas, porém, em concentrações moderadas desempenham um papel importante como mediadores nos processos de sinalização celular (Dröge, 2002; Li et al., 2013).

As defesas antioxidantes são quaisquer substâncias que atrase, previna ou elimine o dano oxidativo da molécula alvo, podendo ser divididas em enzimáticas e não enzimáticas (Halliwell, 2007). As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD, que dismuta o O_2^- a H_2O_2 e oxigênio), catalase (CAT, que cliva o H_2O_2 a água e oxigênio) e glutathione peroxidase que decompõe o H_2O_2 . Enquanto que as não enzimáticas englobam as vitaminas C e E, glutathione reduzida, carotenóides, flavonóides, dentre outros (Valko et al., 2007). A ausência ou o enfraquecimento do

sistema antioxidante, também favorece o aparecimento de estresse oxidativo/nitrativo (Li et al., 2013).

O sistema nervoso central é mais vulnerável ao estresse oxidativo devido, entre outros fatores, ao seu alto consumo de oxigênio. Sendo assim, vários estudos vêm mostrando que o estresse oxidativo/nitrativo está associado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Cobb e Cole, 2015; Danielson e Andersen, 2008; Gandhi e Abramov, 2012; Giasson et al., 2002; Halliwell, 2006; Singh et al., 2004). A hiperhomocisteinemia também está associada a indução do estresse oxidativo, tanto por aumentar a produção de ERO quanto por alterar a atividade e/ou expressão de enzimas antioxidantes (Faraci e Lentz, 2004; Kolling et al., 2011; Matté et al., 2009; Petras et al., 2014; Scherer et al., 2011).

1.7 Terapia anti-inflamatória

É bem estabelecido que os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) têm propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas mediante inibição das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), e consequente supressão da síntese de prostaglandinas e tromboxanos (Asanuma et al., 2001; Dinarello, 2010; Rubio-Perez e Morillas-Ruiz, 2012). Sendo que a COX-1 é a isoforma constitutiva associada a homeostase celular e a COX-2 é a isoforma induzida em condições inflamatórias (Vane e Botting, 2003).

Sabe-se que a inflamação é uma característica das doenças neurodegenerativas, e estudos vêm mostrando o efeito protetor dos AINEs sobre essas doenças (Klegeris e McGeer, 2005). Apesar das contradições, a maioria dos estudos mostram que o tratamento a longo prazo com anti-inflamatórios pode atrasar o aparecimento ou retardar a progressão da Alzheimer em pessoas idosas (Ferencik et al., 2001). O uso de AINEs foi

significativamente associado a redução de risco de Alzheimer em usuários a longo prazo (Etminan et al., 2003; in 't Veld et al., 2001; Wang et al., 2015) e pode atrasar ou prevenir o aparecimento da doença de Parkinson em animais e humanos (Chen et al., 2003; Teismann e Ferger, 2001).

O ácido acetilsalicílico (ASA), popularmente conhecido como aspirina, é um dos AINEs mais utilizados no mundo, visto que reduz o risco de muitas doenças vasculares (Vane e Botting, 2003). ASA age por meio da acetilação específica do grupo hidroxil de um resíduo de serina do sítio ativo das COX-1 e COX-2, as inibindo irreversivelmente. ASA inibe a formação de prostaglandinas e tromboxanos, em especial tromboxano A₂, um importante vasoconstritor e agregante de plaquetas, sendo utilizado na prevenção de doenças tromboembólicas (Dinarello, 2010; Hoak, 1983; Tendra e Wojakowski, 2003; Vane e Botting, 2003).

ASA pode ser utilizado como antiplaquetário na prevenção de eventos tromboembólicos, em doses orais variando entre 80 e 160 mg/dia (Chen et al., 2003; Rao e Fareed, 2012; Richman e Owens, 2017; Underwood e More, 1994). Estudos em animais mostram que o tratamento contínuo com ASA reduz lesões de aterosclerose, mediante redução de inflamação vascular, aumento de colágeno e de células do músculo liso (Cyrus et al., 2006, 2002; Paul et al., 2000; Santanam e Parthasarathy, 2007) e também exerce efeitos neuroprotetores a partir da indução de proliferação e diferenciação de oligodendrócitos (Chen et al., 2014; Cui et al., 2015; Huang et al., 2016). Doses baixas de ASA também são usadas para prevenir ataque cardíaco e acidente vascular cerebral (Catella-Lawson et al., 2001; Tendra e Wojakowski, 2003; van Gijn et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando que a hiperhomocisteinemia leve é fator de risco para doenças neurodegenerativas e vasculares e que o ASA possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, o **objetivo geral** deste trabalho foi investigar o efeito neuroprotetor do ASA sobre alterações em parâmetros inflamatórios, oxidativos/nitrativos e morfológicos em córtex cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia leve.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da hiperhomocisteinemia leve e/ou do ASA sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6;
2. Avaliar o efeito da hiperhomocisteinemia leve e/ou do ASA sobre a atividade e imunoconteúdo da AChE;
3. Investigar o efeito da hiperhomocisteinemia leve e/ou do ASA sobre os níveis de nitritos;
4. Avaliar o efeito da hiperhomocisteinemia leve e/ou do ASA sobre as atividades e imunoconteúdos das enzimas antioxidantes (SOD e CAT);
5. Analisar o efeito da hiperhomocisteinemia leve e/ou do ASA sobre a oxidação de proteínas e DNA;
6. Analisar a ultraestrutura em córtex cerebral de ratos submetidos à hiperhomocisteinemia leve e/ou ASA por microscopia eletrônica de transmissão.

PARTE II
CAPÍTULO I

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1 Artigo científico

Os materiais e métodos e os resultados serão apresentados na forma de artigo científico intitulado:

Chronic Mild Hyperhomocysteinemia Alters Inflammatory and Oxidative/Nitrative Status and Causes Protein/DNA Damage, as well as Ultrastructural Changes in Cerebral Cortex: Is Acetylsalicylic Acid Neuroprotective?

Daniella de S. Moreira, Paula W. Figueiró, Cassiana Siebert, Caroline A. Prezzi, Francieli Rohden, Fatima C.R. Guma, Vanusa Manfredini, Angela T.S. Wyse

Periódico: Neurotox Res (2017)

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9847-1>



Chronic Mild Hyperhomocysteinemia Alters Inflammatory and Oxidative/Nitrative Status and Causes Protein/DNA Damage, as well as Ultrastructural Changes in Cerebral Cortex: Is Acetylsalicylic Acid Neuroprotective?

Daniella de S. Moreira^{1,2} · Paula W. Figueiró^{1,2} · Cassiana Siebert^{1,2} · Caroline A. Prezzi² · Francieli Rohden¹ · Fatima C. R. Guma^{1,3} · Vanusa Manfredini⁴ · Angela T. S. Wyse^{1,2,3}

Received: 28 August 2017 / Revised: 27 November 2017 / Accepted: 29 November 2017
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

Abstract

Homocysteine is a sulfur-containing amino acid derived from methionine metabolism. When plasma homocysteine levels exceed 10–15 μM , there is a condition known as hyperhomocysteinemia, which occurs as a result of an inborn error of methionine metabolism or by non-genetic causes. Mild hyperhomocysteinemia is considered a risk factor for development of neurodegenerative diseases. The objective of the present study was to evaluate whether acetylsalicylic acid has a neuroprotective role on the effect of homocysteine on inflammatory, oxidative/nitrative stress, and morphological parameters in cerebral cortex of rats subjected to chronic mild hyperhomocysteinemia. Wistar male rats received homocysteine (0.03 $\mu\text{mol/g}$ of body weight) by subcutaneous injections twice a day and acetylsalicylic acid (25 mg/Kg of body weight) by intraperitoneal injections once a day from the 30th to the 60th postpartum day. Control rats received vehicle solution in the same volume. Results showed that rats subjected to chronic mild hyperhomocysteinemia significantly increased IL-1 β , IL-6, and acetylcholinesterase activity and reduced nitrite levels. Homocysteine decreased catalase activity and immunoccontent and superoxide dismutase activity, caused protein and DNA damage, and altered neurons ultrastructure. Acetylsalicylic acid totally prevented the effect of homocysteine on acetylcholinesterase activity and catalase activity and immunoccontent, as well as the ultrastructural changes, and partially prevented alterations on IL-1 β levels, superoxide dismutase activity, sulfhydryl content, and comet assay. Acetylsalicylic acid per se increased DNA damage index. In summary, our findings showed that chronic chemically induced model of mild hyperhomocysteinemia altered some parameters and acetylsalicylic acid administration seemed to be neuroprotective, at least in part, on neurotoxicity of homocysteine.

Keywords Homocysteine · Hyperhomocysteinemia · Acetylsalicylic acid · Inflammation · Oxidative/nitrative stress · Ultrastructural changes

✉ Angela T. S. Wyse
 wyse@ufrgs.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

² Laboratório de Neuroproteção e Doenças Neurometabólicas, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

⁴ Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 592, Caixa Postal 118, Uruguaiana, RS 97508-000, Brazil

Introduction

Homocysteine (Hcy) is a sulphur-containing amino acid, synthesized from methionine (Met), which was discovered by Du Vigneaud in the early twentieth century (Butz and du Vigneaud 1932; McCully 2015). Hcy can be metabolized to cysteine by trans-sulfuration pathway (which requires vitamin B6), or it might be re-methylated to Met by methionine synthase, which utilizes vitamin B12 and folic acid or betaine as cofactors (Murray and Pizzomo 2013). Due to the high reactivity of its thiol group, only about 1–2% of Hcy is available as reduced form (with a free thiol group) and about 98% in oxidized form as disulphides, which are bound (~75%) or non to

protein (mainly albumin). Total Hcy encompasses totality of Hcy after cleavage of all disulphide bonds (Castro et al. 2006).

Hcy plasma levels in healthy individuals reach from 5 to 15 $\mu\text{mol/L}$ (Ueland et al. 1993). However, dysfunction in Hcy metabolism leads to Hcy accumulation in body fluids characterized by a condition known as hyperhomocysteinemia, which can be classified according to Hcy plasma levels in severe ($> 100 \mu\text{mol/L}$), intermediate (31–100 $\mu\text{mol/L}$) or mild (16–30 $\mu\text{mol/L}$) (Kaul et al. 2006; Banecka-Majkutewicz et al. 2012). Mild and intermediate hyperhomocysteinemias are most frequent in general population in association with other conditions and/or as risk factors. Isobe et al. (2005) described an increase of Hcy concentration in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases, suggesting it could be related to the pathogenesis of both neurodegenerative diseases. Hcy is also described as an independent risk factor for atherosclerosis and, consequently cardiovascular disease (Graham and O'Callaghan 2002; Castro et al. 2006). Dietary intakes of Met, folate, vitamin B12, and B6 and their deficiency are the main contributors to plasma concentrations of Hcy, which also increase with age, smoking, coffee consumption, lack of exercise, and alcoholism (Kulkarni and Richard 2003; McCully 2015).

Experimental models for severe hyperhomocysteinemia have been described mainly in knockout animals for cystathionine- β -synthase (Watanabe et al. 1995) and methylene tetrahydrofolate reductase (Chen et al. 2001) as well as by met supplementation (Song and Rosenfeld 2004; Zhou et al. 2008). We have developed a chemically induced model of severe hyperhomocysteinemia in neonate rats, mimetizing classic homocystinuria (Streck et al. 2002). Using this model, we observed many biochemical and behavioral changes in brain and other tissues of animals, including inflammatory and oxidative status changes (Matté et al. 2009a, b, Da Cunha et al. 2011, 2012; Kolling et al. 2011). More recently, it was developed a chemically induced rat model for mild hyperhomocysteinemia that mimetizes risk factor to neurodegenerative disease and cardiac ischemia (Scherer et al. 2011). Using this model, Scherer and colleagues showed that Hcy promotes increase of pro-inflammatory cytokines and acetylcholinesterase (AChE) activity (Scherer et al. 2014) and induces oxidative stress and nitrate stress in brain (Scherer et al. 2011).

Neuroinflammation plays a significant role in numerous neurodegenerative conditions including multiple sclerosis, Alzheimer's, and Parkinson's diseases. Mediators of neuroinflammation such as cytokines, growth factors, and reactive oxygen species (ROS) are secreted to promote neuronal repair and maintenance, which in chronic status may be harmful to healthy tissue (Moore and O'Banion 2002; Hald and Lotharius 2005). Oxidative stress is presented in most of neurodegenerative diseases and it is characterized by a

disequilibrium between production of ROS and antioxidants defenses (Singh et al. 2004; Halliwell 2007). ACh availability is diminished in brain of Alzheimer disease, and this might collaborate to cognitive deterioration. It seems to be in part because of AChE up-regulated activity, which is an important enzyme in the cholinergic nervous system, responsible for hydrolysis of ACh (Moore and O'Banion 2002).

It is well established that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have anti-inflammatory, analgesic, and anti-pyretic properties mainly via inhibition of cyclooxygenase (COX) enzymes by suppression of prostaglandin synthesis (Asanuma et al. 2001; Rubio-Perez and Morillas-Ruiz 2012). Studies showed that the use of NSAIDs may delay or prevent the onset of Parkinson disease in animals and humans (Teismann and Ferger 2001; Chen et al. 2003) and was significantly associated with a reduced risk of Alzheimer disease in long-term users (Wang et al. 2015). Acetylsalicylic acid (ASA), popularly known as aspirin, is one of the most widely used NSAIDs medications since it also can reduce the risk of heart attack and stroke (Catella-Lawson et al. 2001). Low-doses of oral ASA, for example 20 mg/day, reduce platelet thromboxane formation in great proportions but higher doses are necessary to prevent thromboxane-dependent platelet activation. Hence, ASA by itself, at oral doses ranging from 80 to 160 mg/day may be used as anti-platelet aggregation for prevention of thromboembolic events (Underwood and More 1994; Chen et al. 2003; Rao and Fareed 2012; Richman and Owens 2017). Asanuma et al. (2001) showed that ASA may be neuroprotective since it also can directly scavenge nitric oxide radicals in neuronal cells, protecting them against apoptosis.

Since ASA has antioxidant, anti-inflammatory, and anticoagulant properties, and mild hyperhomocysteinemia has been shown to have oxidant, inflammatory and coagulant effects, in the present study, we evaluated if ASA could prevent the changes in inflammation, oxidative/nitrate stress status, and protein and DNA damage in cerebral cortex of rats caused by mild hyperhomocysteinemia. We also performed morphological analysis of brain tissue from rats subjected to mild hyperhomocysteinemia with or without ASA administration.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (30-day-old) were obtained from Central Animal House of Biochemistry Department, Institute of Basic Health Sciences at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, in Porto Alegre, Brazil. Animals were maintained under a controlled 12/12 h light/dark cycle and constant temperature ($22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) colony room, with free access to water and 20% (w/w) commercial protein chow. Animal care

followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85–23, revised 1996), and the experimental protocol was approved by the University’s Ethics Committee (CEUA) under the project #31436.

ASA and Hcy Chronic Administration

Experimental chronic mild hyperhomocysteinemia was chemically induced by daily subcutaneous (s.c.) administration of Hcy from the 30th to the 60th day of life as described by Scherer et al. (2011). DL-Hcy (Sigma-Aldrich) (0.03 $\mu\text{mol/g}$ of body weight) was dissolved in saline solution (0.9% w/v NaCl) and administered (0.5 mL/100 g of body weight) twice a day. Plasma Hcy concentration in rats subjected to this chronic administration achieved levels similar to those found in patients with mild hyperhomocysteinemia (30 μM) (Scherer et al. 2011). Besides Hcy administration, rats received a daily intraperitoneal (i.p.) injection (0.5 mL/100 g of body weight) of ASA (Sigma-Aldrich) (25 mg/kg of body weight) dissolved in 10% (v/v) ethanol/saline, pH adjusted for 7.0, according to protocols previously described (Chen et al. 2014). Control animals received saline s.c. and ethanol 10% (v/v) i.p. in the same volumes as those applied to Hcy- and ASA-treated rats. The rats were decapitated, without anesthesia, 12 h after the last injections. Brain was quickly removed and cerebral cortex was dissected for the biochemical analysis.

Cytokines (IL-1 β and IL-6) Assay

The cerebral cortex was homogenized in 1:5 (w/v) saline solution (0.9% NaCl). The homogenate was centrifuged at 800 \times g for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, and the supernatant was used in the assays. IL-1 β and IL-6 levels in the cerebral cortex were quantified by rat high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) with commercially available kits (Sigma-Aldrich).

AChE Activity Assay

The cerebral cortex was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 0.1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The supernatant was used for the enzymatic AChE analyses. AChE activity was determined according to the method of Ellman et al. (1961), with some modifications (Scherer et al. 2010). Hydrolysis rates were measured at acetylthiocholine concentration of 0.8 mM in 300 μL assay solution with 30 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 25 $^{\circ}\text{C}$. About 15 μL of cerebral cortex supernatant was added to the reaction mixture and pre-incubated for 3 min. The hydrolysis was monitored by formation of the thiolate di-anion of DTNB at 412 nm for 2–3 min (intervals of 30 s). All samples were run in triplicate.

Cerebral Cortex Preparation

The cerebral cortex was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 140 mM KCl and centrifuged at 800 g for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The supernatant was retained for biochemical assays.

Nitrite Levels

Nitrite levels were measured by Griess reaction, which 50 μL of cortex supernatant was mixed with 50 μL of Griess reagent (1:1 mix of 2% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in water) and incubated for 10 min at room temperature. Absorbance was measured in a spectrophotometer at 543 nm. Nitrite concentration was calculated using sodium nitrite standards (Green et al. 1982).

Superoxide Dismutase Assay (SOD)

The SOD activity assay is based on pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene) autoxidation, a process highly dependent on superoxide (substrate for SOD). The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly measured in a spectrophotometer at 420 nm (Marklund and Marklund 1974). A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. SOD activity was expressed as the amount of enzyme necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation. The results were reported as SOD units per milligram of protein.

Catalase Assay (CAT)

The method is based on the disappearance of H_2O_2 in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL, measured in a spectrophotometer at 240 nm (Aebi 1984). One CAT unit is defined as 1 mmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is represented as CAT units/mg protein.

Total Sulfhydryl Content

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery (2001), and it is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative (TNB). Briefly, 50 μL of homogenate were added to 980 μL of PBS buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA. The reaction was started by the addition of 30 μL of 10 mM DTNB and incubated for 30 min at room temperature in a dark room.

Absorbance was measured in a spectrophotometer at 412 nm. Results were reported as nmol TNB/mg protein. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage in proteins.

Western Blot Analysis of AChE, SOD, and CAT

Western blotting was performed as described by Biasibetti-Brendler et al. (2017). For electrophoresis analysis, cerebral cortex was homogenized in 200 μ L of a lysis solution (2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 4% sodium dodecyl sulphate (SDS)). Then, samples were dissolved 1:1 in Laemmli buffer two times containing 40% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 10% SDS and boiled for 5 min. Total protein homogenate were separated by 10% SDS-PAGE (30 μ g/lane of total protein) and transferred (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) to nitrocellulose membranes for 1 h at 15 V in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol, and 0.25% SDS). Blot was then incubated overnight at 4 °C in a blocking solution containing 5% bovine serum albumin (BSA) and the following diluted antibodies: anti-AChE (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-CAT(1:1000, Abcam), anti-SOD2 (1:2000, Abcam), and anti- β -actin (1:1000, Cell Signaling Technology). For AChE, the blot was then washed twice for 5 min with 0.05% Tween-20 Tris-buffered saline (T-TBS) and twice for 5 min with Tris-buffered saline (TBS) and then incubated for 2 h in antibody solution containing non-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1:1000. Later the blot was washed again the same way and then incubated for 1 h in a solution containing streptavidin-HRP (Cell Signaling Technology) diluted 1:3000. For the other antibodies, blot was washed twice for 5 min with T-TBS and twice for 5 min with TBS and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) diluted 1:2000. The blot was developed using a chemiluminescence kit (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) and detected by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay)

Alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. (1988) in accordance with general guidelines for use of the comet assay (Tice et al. 2000; Hartmann et al. 2003). Cerebral cortex was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 800 g for 10 min at 4 °C. Supernatants were suspended in agarose and spread into glass microscope slides pre-coated with agarose, settled at 4 °C for 5 min. In order to maintain DNA as “nucleoids,” slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.0, and 1% triton X-100 with 10% DMSO) to remove cell proteins. After

lysis process, slides were placed on a horizontal electrophoresis chamber, covered with a fresh solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 4 °C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25 V; 315 mA; 0.9 V/cm). Slides were then neutralized, washed in bi-distilled water, stained using a silver staining protocol (Maluf and Erdtmann 2000; Nadin et al. 2001) and left to dry at room temperature overnight. Last, 100 cells (50 cells from each of the two replicate slides) were arbitrarily chosen and analyzed using an optical microscope. Cells were visually scored from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) based on tail length and intensity (Tice et al. 2000). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

Transmission Electron Microscopy

Transmission Electron Microscopy was performed as described by Schweinberger et al. (2017). Cardiac perfusion was first performed with 0.9% saline solution and then with paraformaldehyde 4% plus glutaraldehyde 2.5% in phosphate buffer (PB) 0.1 M at room temperature. The brains were sectioned in vibratome, the coronal slices (1 mm) were immersed again in the same fixative solution. After, they were washed in PB and fixed in 1% osmium tetroxide, OsO₄ (Sigma-Aldrich) in PB, pH 7.4 for 1 h at room temperature. They were washed again with PB and then dehydrated gradually with acetone (MERCK) and soaked in epon resin. The polymerization was carried out for 48 h at 60 °C. Semi-thin sections were made in the thickness of 1 μ m using ultramicrotome and stained with 1% toluidine blue. Ultra-fine cuts were obtained in ultramicrotome for the assembly of copper grids (200 mesh). The samples of cerebral cortex were counterstained with 1% uranyl acetate (MERCK) and then with 1% lead citrate (MERCK) and examined in transmission electron microscopy (JEM 1200 EXII, Japan).

Protein Determination

Protein concentrations were measured by the method of Lowry et al. (1951) or Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Statistical Analysis

The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey's test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All analyses and plots were performed using GraphPad Prism 5.1 software program in a compatible computer.

Results

Chronic mild hyperhomocysteinemia significantly increased IL-1 β ($p < 0.05$) and IL-6 ($p < 0.05$) levels in cerebral cortex of rats. Post hoc showed that ASA per se did not alter these parameters but partially prevented the increase of IL-1 β (Fig. 1).

Figure 2a, b shows that chronic Hcy administration significantly increased the activity of AChE ($p < 0.01$), but did not alter its immunocent ($p > 0.05$), respectively. ASA did not alter the activity and immunocent of AChE, but prevented the increase of this enzyme activity.

We also tested the effect of ASA treatment on some oxidative/nitrative stress parameters that were shown to be induced by mild hyperhomocysteinemia in cerebral cortex of rats (Scherer et al. 2011). Hcy-treated rats presented a significant decrease in nitrite levels ($p < 0.01$) (Fig. 3) and antioxidant defenses SOD ($p < 0.05$) and CAT ($p < 0.05$) activities (Fig. 4a, b). Hcy significantly also decreased CAT immunocent ($p < 0.05$) (Fig. 4d). ASA did not show alterations per se on these parameters, but totally prevented the decrease in CAT activity and immunocent; ASA also prevented partially SOD activity. The decrease in nitrite levels was not altered by ASA.

Biomolecules damage was also evaluated by sulfhydryl content and comet assay. Results showed that mild hyperhomocysteinemia altered sulfhydryl content ($p < 0.05$). ASA per se did not alter sulfhydryl content, but partially prevented it (Fig. 5). Hcy significantly increased DNA damage index ($p < 0.001$). ASA per se also altered this parameter ($p < 0.001$), but when combined with Hcy partially prevented DNA damage index caused by Hcy (Fig. 6).

The body weight variation (final body weight – initial body weight) of rats (control 152 ± 16.3 ; ASA 150 ± 15.4 ; Hcy 158 ± 16.1 ; Hcy + ASA: 162 ± 15.6) and relative organs weight (absolute organ weight/final body weight $\times 100$) of lungs (control 0.62 ± 0.07 ; ASA 0.59 ± 0.09 ; Hcy 0.63 ± 0.10 ; Hcy + ASA: 0.60 ± 0.09), heart (control 0.38 ± 0.02 ; ASA 0.37 ± 0.03 ; Hcy 0.37 ± 0.04 ; Hcy + ASA 0.38 ± 0.02), liver (control 4.3 ± 0.09 ; ASA 4.4 ± 0.26 ; Hcy 4.2 ± 0.35 ; Hcy +

ASA 4.1 ± 0.27) and kidneys (control 0.84 ± 0.04 ; ASA 0.86 ± 0.05 ; Hcy 0.88 ± 0.12 ; Hcy + ASA 0.88 ± 0.02) of rats submitted to chronic Hcy administration and/or ASA treatment did not differ from those of control rats, suggesting that Hcy and ASA did not cause malnutrition and systemic toxicity in the animals.

Electron-microscopic observations of cerebral cortex allowed us to identify some morphological features. In the control group (Fig. 7), the pyramidal neurons had pale round or oval nucleus with a centralized nucleolus delimited by a well-defined karyotheca, surrounded by a limited cytoplasm with well-preserved mitochondria, lysosomes, rough endoplasmic reticulum, and golgi complex. Blood capillaries were surrounded by endothelial cells with extensive peripheral heterochromatin in nuclei. Neuropilo was well organized with some axons surrounded or non by well-designed myelin sheaths. Rats treated with ASA did not show any ultrastructural alteration, resembling control group (Fig. 8).

In comparison with control group, rats submitted to mild hyperhomocysteinemia showed some ultrastructural alterations (Figs. 9 and 10). Neurons exhibited a pale round or oval nucleus more electron-dense with extensive peripheral heterochromatin and a decentralized nucleolus, delimited by a karyotheca that was not well delineated. Neurons cytoplasm presented organelles not well identified, with scarce rough endoplasmic reticulum and lysosomes. Moreover, it was not possible to find mitochondria with certainty, only some structures shadows that reminded these organelles. Neuropilo was disorganized, vacuolated, and without myelin sheath (Fig. 9). Dark cells, resembling neurons, with condensation and collapse of normal structure, electron-dense and vacuolated cytoplasm associated with highly electron-dense nucleus and organelles were found in homocysteine group (Fig. 10). Animals submitted to mild hyperhomocysteinemia and treated with ASA at the same time, exhibited similar morphological characteristics to the control group (Fig. 11), suggesting ASA exerts neuroprotective effects capable of reversing the microscopical changes caused by Hcy.

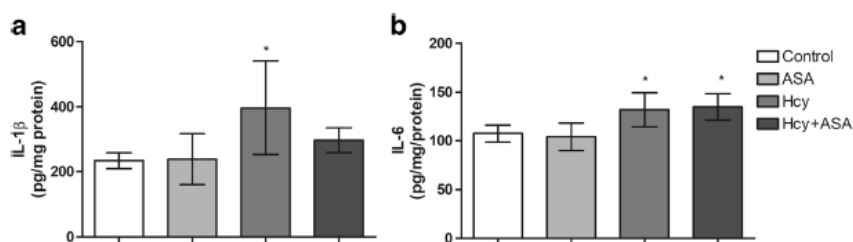


Fig. 1 Effect of chronic Hcy and ASA administration on cytokines (IL-1 β , and IL-6) levels in cerebral cortex of rats. IL-1 β (a) and IL-6 (b). Results are expressed as mean \pm S.D. for 5–7 animals per group.

* $p < 0.05$ compared to control group (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Hcy homocysteine, ASA acetylsalicylic acid, IL-1 β interleukin-1 β , IL-6 interleukin-6

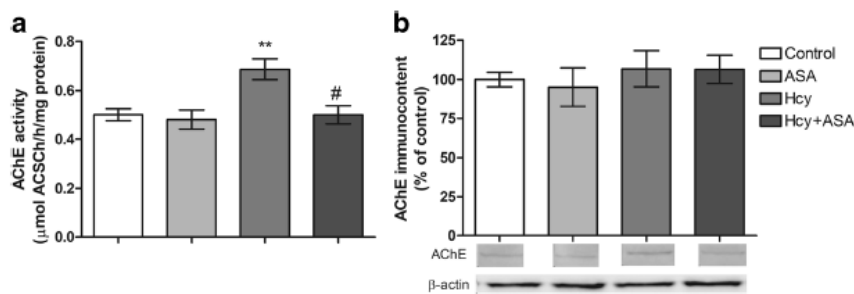


Fig. 2 Effect of chronic Hcy and ASA administration on AChE in cerebral cortex of rats. AChE activity (**a**) and AChE immunoccontent (**b**). Results are expressed as mean \pm S.D. for 7–8 animals per group performed in triplicate for activity, and 6 animals per group for AChE

immunocontent. ** $p < 0.01$ compared to control group; # $p < 0.01$ compared to Hcy group (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Hcy homocysteine, ASA acetylsalicylic acid, AChE acetylcholinesterase

Discussion

Mild hyperhomocysteinemia is prevalent in general population, especially in the elderly, and its causes are associated with physiological, pathological, nutritional, hormonal, medical factors, and daily habits (Kulkarni and Richard 2003; Neves et al. 2004; Castro et al. 2006; McCully 2015). Treatment and prevention are based on specific or general causes. ASA was the first drug tested as neuroprotector in this chronic mild hyperhomocysteinemia model in our lab. In the present study, we investigated the influence of concurrent administration of ASA on the effects of Hcy in rats subjected to a chronic mild hyperhomocysteinemia model on some changes in inflammation and oxidative/nitrative stress parameters already shown in cerebral cortex, as well as DNA damage analysis and ultrastructural features which were shown for the first time in this model. Our mild hyperhomocysteinemia model presents Hcy levels (approximately 30 μ M), which represents a risk factor for neurodegenerative and other diseases in general population (Scherer et al. 2011, 2014).

Results showed that rats subjected to Hcy administration increased interleukins IL-6 and IL-1 β levels in cerebral cortex. Other studies have associated an increase in IL-6 plasma

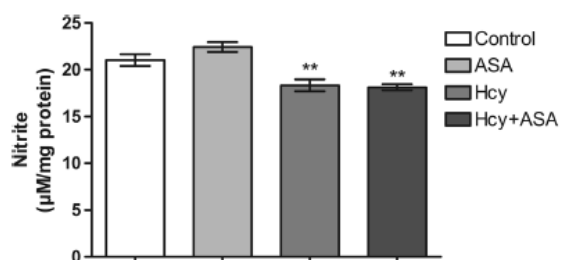


Fig. 3 Effect of chronic Hcy and ASA administration on nitrite levels in cerebral cortex of rats. Results are expressed as mean \pm S.D. for 7–8 animals per group performed in triplicate. ** $p < 0.01$ compared to control group (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Hcy homocysteine, ASA acetylsalicylic acid

levels with increased Hcy levels (Gori et al. 2005; Holven et al. 2006) and the pathogenesis of vascular diseases (Ridker et al. 2000; Lindmark et al. 2001; Wainstein et al. 2017). The increase in IL-6 levels appears to be one of the mechanisms by which Hcy exerts its endothelial damage. In our work, IL-6 levels were also enhanced in hyperhomocysteinemic rats, but ASA did not prevent it. In addition to IL-6, IL-1 β was also increased in hyperhomocysteinemic rats. This pro-inflammatory cytokine has been shown to be an important mediator in neurodegeneration, since it is induced in brain damage associated with ischemia, excitotoxicity, and trauma (Boutin et al. 2001; Touzani et al. 2002), besides it is found in high levels in diseases such as Alzheimer's (Li et al. 2000). Mechanisms involved in these alterations include the involvement of IL-1 β in the promotion of an inflammatory and oxidative state through the induction of IL-6 transcription (Cahill and Rogers 2008), increased neuronal AChE activity (Li et al. 2000) and increased superoxide (O_2^-) production (Jimenez-Altayo et al. 2005).

Our study is in agreement with these results since mild hyperhomocysteinemia also increased AChE activity; the increase in IL-1 β levels may be related to AChE up regulation. We also showed in our study that ASA partially prevented IL-1 β increase, and that might have collaborated, at least in part, to the return of AChE activity to its normal state. AChE up regulation is one of reasons for decrease in ACh availability in brain of neurodegenerative diseases, as Alzheimer disease, and this might collaborate to cognitive deterioration (Moore and O'Banion 2002) since ACh is an important neurotransmitter in memory and learning processes (Schliebs and Arendt 2006). ACh also has anti-inflammatory properties and its reduction contributes to a pro-inflammatory state. Studies have shown that ACh inhibits the release of the pro-inflammatory cytokines TNF, IL-1 β , and IL-6 (Tracey et al. 2000). ASA was able to prevent the increase of AChE activity, possibly contributing to normal release of ACh. Reducing neuroinflammation can alleviate symptoms and minimize neurodegeneration (Kempuraj et al. 2016). Studies have shown that prolonged

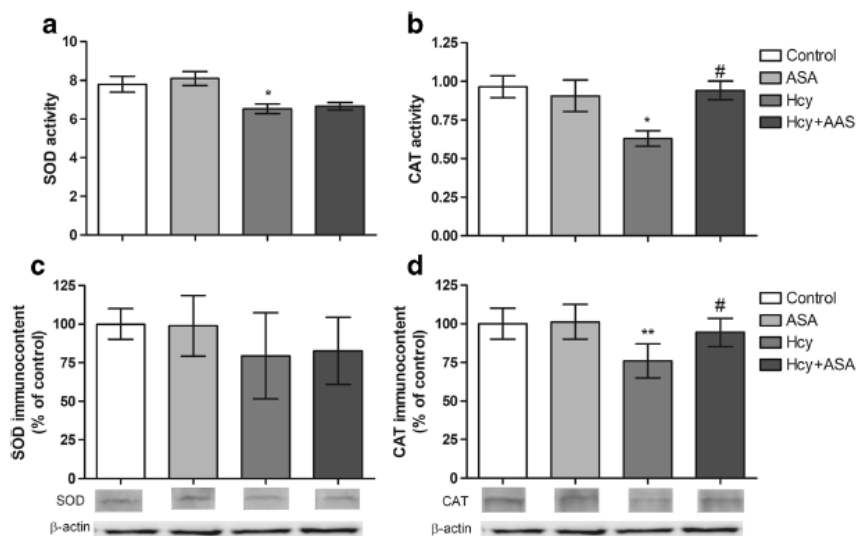


Fig. 4 Effect of chronic Hcy and ASA administration on antioxidant enzymes in cerebral cortex of rats. SOD activity (a), CAT activity (b), SOD immunointensity (c) and CAT immunointensity (d). Results are expressed as mean \pm S.D. for 7–8 animals per group performed in triplicate for activity and 6 animals per group for immunointensity of

antioxidant enzymes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control group; # $p < 0.05$ compared to Hcy group (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Hcy homocysteine, ASA acetylsalicylic acid, SOD superoxide dismutase, CAT catalase

use of ASA and other NSAIDs is associated with a reduction in Alzheimer's risk due to its neuroprotective effects (Klegeris and McGeer 2005; Wang et al. 2015).

It has been shown that Hcy decreases nitrite levels, which implies in reduction of nitric oxide (NO) bioavailability. Xu et al. (1996) suggested in their work that ACh causes concentration-dependent release of NO in rat spinal cord. Considering that in the present study, the Hcy increased AChE activity, probably decreasing ACh availability. This fact could explain NO decrease. It is known reduced NO attenuates angiogenesis and may have an impact on proper vascular function (Ignarro 2000). NO also causes relaxation of blood vessels and has anti-proliferative and anticoagulative properties important to prevent atherosclerosis (Ignarro

1989). Studies have shown that this is one of the mechanisms by which hyperhomocysteinemia exerts its endothelial damage, including with greater sensitivity in cerebral microvessels, and that the oxidative and/or nitrative stress caused by Hcy are responsible for this alteration (Faraci and Lentz 2004). We also observed that ASA did not prevent NO bioavailability decrease but due to its anticoagulant properties, it could help to prevent these vascular disorders.

Scherer et al. (2011), using the same model of chronic mild hyperhomocysteinemia, suggested in their work that reduced NO bioavailability in cerebral cortex should be due to NO spontaneous reaction with thiol groups of Hcy and/or O_2^- . NO is inactivated when reacts with O_2^- to produce a potent oxidant molecule known as peroxynitrite ($ONOO^-$). $ONOO^-$

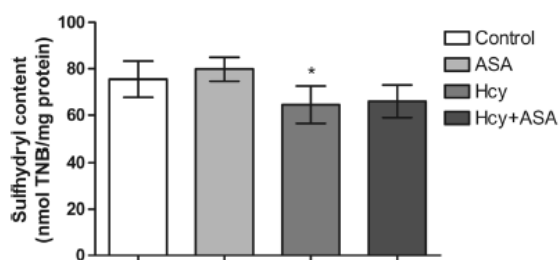


Fig. 5 Effect of chronic Hcy and ASA administration on sulfhydryl content in cerebral cortex of rats. Results are expressed as mean \pm S.D. for 7–8 animals per group performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared to control group (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Hcy homocysteine, ASA acetylsalicylic acid

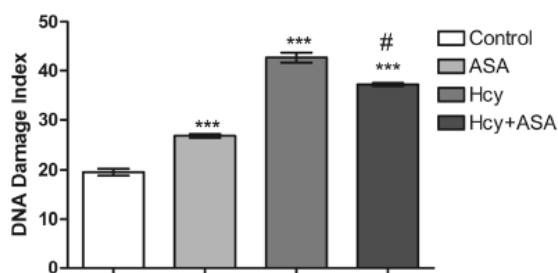


Fig. 6 Effect of chronic Hcy and ASA administration on DNA damage index (comet assay) in cerebral cortex of rats. Results are expressed as mean \pm S.D. for 6 animals per group. *** $p < 0.001$ compared to control group; # $p < 0.001$ compared to Hcy group (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Hcy homocysteine, ASA acetylsalicylic acid

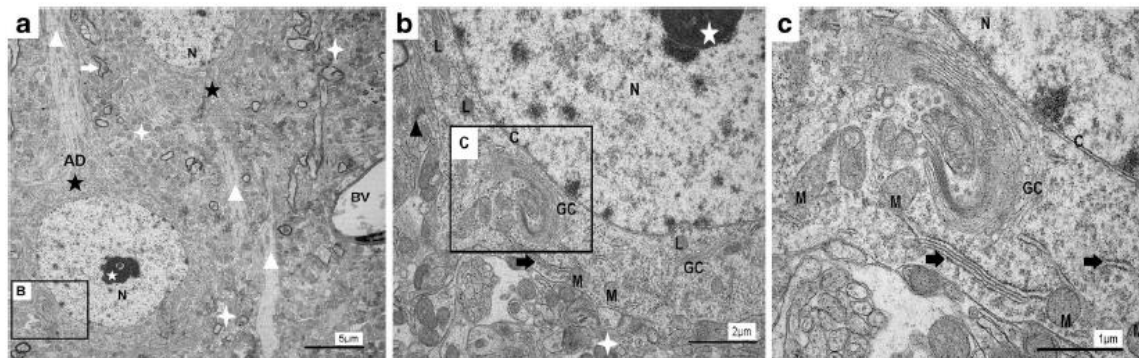


Fig. 7 Electron micrographs from cerebral cortex of control animals. **a** In this image, it is possible to observe two cells (black star); we will focus only on that in the left corner. A characteristic neuron with a well-defined nucleus (N) is visible, showing centralized nucleolus (white star) and evident apical dendrite (AD). Surrounded by fairly organized neuropile (white cross), with apparent cellular extensions (white arrowhead or triangle) and myelin (white arrow), in addition to a blood vessel (BV). **b, c** It is possible to see organelles integrity, mitochondria (M) with their

well-preserved cristae, as well as external and internal membrane. The rough endoplasmic reticulum (black arrow) shows cisterns in normal conformation with presence of ribosomes in its membranes. The golgi complex (GC) with defined cisternae and lysosomes (L) scattered in the cytoplasm. We can still observe the double membrane of the karyotheca (C) and the nucleus (N) with normal chromatin condensation (more electron-dense regions). Magnifications **a** $\times 4000$; **b** $\times 10,000$; and **c** $\times 30,000$

can be very harmful to cells since it can induce oxidative/nitrative stress, S-nitrosylation of proteins thiol groups to generate S-nitrosothiols, and DNA single-strand breakage (Förstermann and Sessa 2012). Studies have shown that ONOO⁻ is able to inhibit various enzymes by nitrating specific residues of tyrosine, and one of the target enzymes is mitochondrial SOD (MacMillan-Crow et al. 1996; Yamakura et al. 1998; Faraci 2003).

In our study, we showed a reduction of NO bioavailability and SOD activity. Keller et al. (1998) suggested in their studies that O₂⁻ accumulation and consequent ONOO⁻ production are involved with neuronal apoptosis after noticed that membrane lipid peroxidation, protein nitration, and neuronal death were reduced in transgenic mice overexpressing human MnSOD submitted to focal cerebral ischemia. SOD is a potent

scavenger of O₂⁻, and if its activity is reduced, we can imply that more O₂⁻ may be available to react with NO. Therefore, more ONOO⁻ might be formed and involved in S-nitrosylation of proteins thiol groups contributing for reduction of sulfhydryl groups, as seen in our results, and consequent protein damage. Another mechanism for the structural modification of proteins is N-homocysteinylation. N-homocysteinylation is a covalent modification of Hcy thiolactone (Hcy metabolite), which results in protein denaturation, enzymatic inactivation, and even amyloid formation, being associated with neurodegenerative diseases (Sharma et al. 2015). On the other hand, in association with ASA, there was a partial prevention of protein damage caused by Hcy. Moreover, ONOO⁻ formation also has been associated to DNA damage and may be partly responsible for increase of

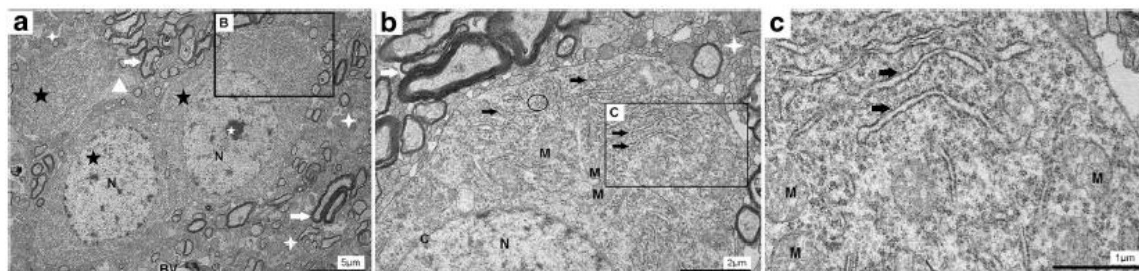


Fig. 8 Electron micrographs from cerebral cortex of ASA animals. **a** In this image, it is possible to observe three cells (black star), we will focus only on the one on the left side. A characteristic neuron with a well-defined nucleus (N) is visible, showing a centralized nucleolus (white star). Surrounded by very organized neuropile (white cross), with apparent another cell extension (white arrowhead or triangle) and myelin (white arrow), in addition to part of a blood vessel (BV). **b, c** It is possible to see organelles integrity, mitochondria (M) with their well-

preserved cristae, as well as external and internal membrane. The rough endoplasmic reticulum (black arrow) presents cisterns in normal conformation with presence of ribosomes in its membranes, besides polysomes (black circle) by the cytoplasm. We can still observe the double membrane of the karyotheca (C) and the nucleus (N) with normal chromatin condensation (more electron-dense regions). Magnifications **a** $\times 4000$; **b** $\times 10,000$; and **c** $\times 30,000$

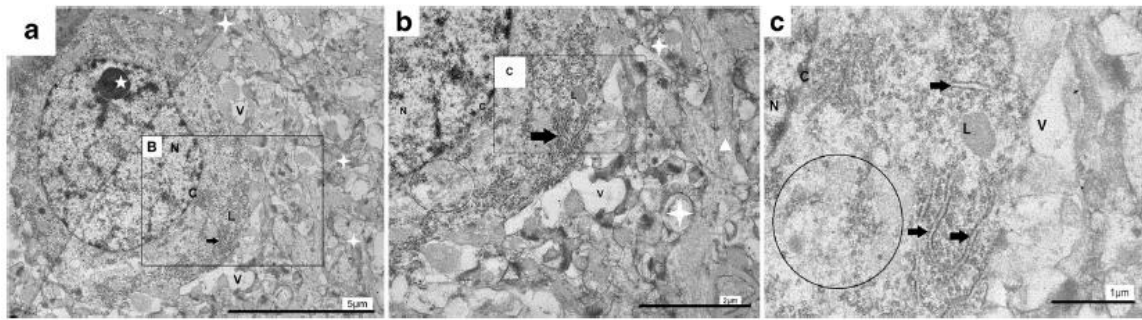


Fig. 9 Electron micrographs from cerebral cortex of Hcy animals. **a** In this image, it is possible to observe a neuron with an apparent nucleus (N) and nucleolus (white star) displaced towards the extremity, very close to the karyotheca (C). Surrounded by a disorganized neuropile (white cross) with presence of vacuoles (V). **b, c** It is possible to see, in more detail, that karyotheca (C) is not well defined because it is not possible to distinguish its double membrane. The vacuoles (V) in the neuropil (white cross)

become more evident, as well as the difficult identification of organelles in the neuron's cytoplasm (black circle), with structures similar to mitochondrias shadow. However, rough endoplasmic reticulum (black arrow) and lysosome (L) are observed in apparently normal conformation. In **b** it is possible to see the extension of another cell (white arrowhead or triangle) with apparent microtubules. Magnifications **a** $\times 4000$; **b** $\times 10,000$; and **c** $\times 30,000$

DNA damage index seen in our comet analysis. It has been shown ASA can direct scavenge NO radicals in neuronal cells (Asanuma et al. 2001), which could minimize NO radicals

effects, and consequently, attenuate protein and DNA damage as our results showed.

Besides reduction of SOD activity, we showed Hcy also reduced CAT activity in chronic mild hyperhomocysteinemic rats. Previous studies in our research group, using other models of hyperhomocysteinemia, have shown the potential of Hcy in reducing the activity of some antioxidant enzymes, including CAT, in brain structures (Wyse et al. 2002; Matté et al. 2009a). Milton (2008) relates the high levels of Hcy with the reduction of CAT activity, both characteristics found in diseases such as Alzheimer's, diabetes, and atherosclerosis. He suggests that Hcy, even at physiological concentrations, can act directly on CAT, converting it into its inactive form of compound II, inhibiting its function of H_2O_2 hydrolysis. Down-regulation of antioxidants enzymes is related to impairment of detoxification of ROS and, consequently, oxidative stress (Halliwell 2007). Therefore, it could conduce to biomolecules damage, such as protein and DNA, as shown by our sulfhydryl and comet analysis, respectively. To our knowledge, we showed for the first time that mild hyperhomocysteinemia causes genotoxicity by the comet test. Other preclinical and clinical studies corroborate with this finding, showing DNA damage caused by severe hyperhomocysteinemia (Picerno et al. 2007; Matté et al. 2009a; Liu et al. 2009; Vanzin et al. 2014).

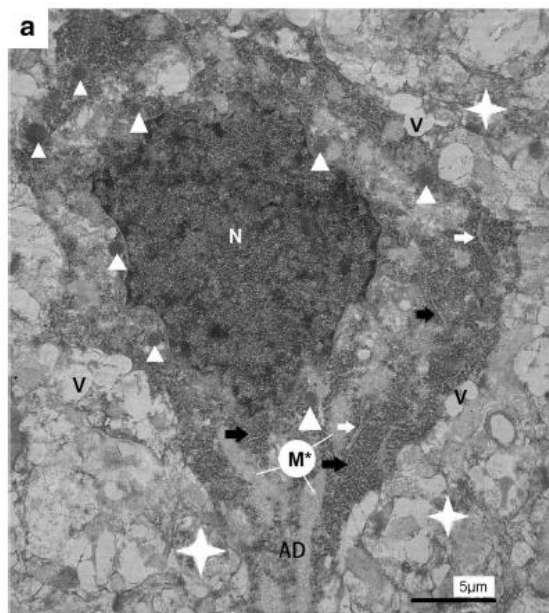


Fig. 10 Dark cells from cerebral cortex of Hcy animals. In this image, it is possible to observe a dark cell with an apparent fragmented nucleus (N) with a series of electron-dense inclusions. Surrounded by a vacuolated cytoplasm which contains an accumulation of unusual spherical structures, which may be due to swelling and rupture of endoplasmic reticulum cisternae and Golgi apparatus. It is possible to see reticulum with normal conformation (black arrow) and dilated (white arrow), a large number of lysosomes (white arrowhead or triangle) and some structures similar to mitochondrias shadows (M*). Neuropilo (white cross) is completely disorganized and vacuolated (V). From the morphology of the cells, it seems a neuron with an apparent apical dendrite (AD). Magnification $\times 4000$

In our work, ASA partially prevented SOD activity decrease, and CAT activity and immunocent returned to normality. Studies have shown that ASA has antioxidant activity, being able to protect the cells against oxidative/nitrative stress (Shi et al. 1999; Asanuma et al. 2001; Wu et al. 2002; Tauseef et al. 2007, 2008). This suggests ASA might reduce oxidative stress and, consequently, biomolecules damage. In this study, ASA per se did not alter sulfhydryl levels, but partially prevented such effect. Regarding DNA, ASA per se increased DNA index and when it was combined with Hcy the DNA

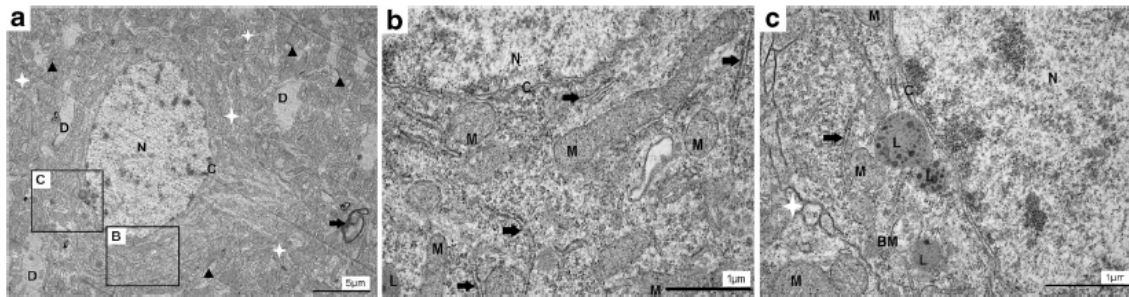


Fig. 11 Electron micrographs from cerebral cortex of Hcy+ASA animals. **a** At the center of this image, it is possible to see a characteristic neuron with nucleus (N) well defined by karyotheca (C). Surrounded by very organized neuropile (white cross), with apparent dendrites (D), dynamic densities (black arrow tip) and myelin (black arrow). **b, c** It is possible to see organelles integrity, mitochondria (M) with their well-preserved cristae, as well as external and internal membrane. The rough

endoplasmic reticulum (black arrow) shows cisterns in normal conformation with presence of ribosomes in its membranes. We can still see a double membrane of the karyotheca (C) and nucleus (N) with normal condensation of chromatin (more electron-dense regions). In **b** it is possible to observe a primary lysosome (L) and in **c** a tertiary lysosome (L), with electron-dense material inside, and a multivesicular body (BM). Magnifications **a** $\times 4000$, **b** and **c** $\times 30,000$

damage was partially prevented since the group Hcy-ASA was different from Hcy group. Hsu and Li (2002) suggests that in pharmacological concentrations, ASA inhibits oxidative DNA damage. More studies are necessary to elucidate the mechanisms of drugs interaction.

Our results showed Hcy caused biochemical alterations and consequently, biomolecules damage. In order to complete these results, we brought transmission electron microscopical analysis that showed these changes caused by Hcy leads, at least in part, to the morphological alterations seen in our results. Mild hyperhomocisteinemic rats exhibited altered neurons with nucleus more electro-dense, disformed karyotheca, cytoplasm poor in organelles, non-identified mitochondria, and disorganized neuropilo. As known, mitochondria are essential to eukaryotic cells, working as bioenergetic center. Therefore, any alteration in mitochondria can impair electron transfer and consequently, maintenance of mitochondrial membrane potential and ATP synthesis. Furthermore, mitochondrial proteins found in intermembrane space are able to activate apoptosis, suggesting mitochondrial impairment, as seen in our hyperhomocisteinemic rats, may be involved with cell death (Wang 2001). In addition, presence of dark cells with death characteristics were seen in cerebral cortex of these animals. It is known Hcy induces neurotoxicity which leads to neuronal cell death, and possibly to neurodegenerative diseases. However, the cellular mechanisms for this, is not fully clear (Poddar and Paul 2009; Škovierová et al. 2016). Hcy has been associated to neuronal cell death via excitotoxicity, playing as agonist of ionotropic and metabotropic glutamate receptors, indirectly increasing intracellular calcium levels and activating several kinases (Obeid and Herrmann 2006; Poddar and Paul 2009; Boldyrev et al. 2013). As shown in our and other

studies, Hcy can also induce oxidative stress through inhibition of antioxidant enzymes, autooxidation, and other mechanisms (Scherer et al. 2011; Lehotsky et al. 2015). Kruman et al. (2000) suggests that Hcy promotes apoptosis and increases neuronal sensitivity to oxidative stress and excitotoxicity in vitro and in vivo by inducing DNA damage associated with activation of polypropyl-ADP-ribose polymerase and depletion of nicotinamide adenine dinucleotide, which precedes mitochondrial dysfunction, oxidative stress and caspase activation. ASA was able to revert morphological alterations in cortical neurons induced by Hcy, possibly due to its medical and antioxidant properties already cited in this work.

In summary, we showed that concurrent ASA administration totally prevented some Hcy effects that, at least in part, may be due to its medical properties. We suggested that low-doses of ASA could be used as an adjuvant and/or preventive therapy in individuals with higher Hcy levels. In agreement with our study, Almeida et al. (2012) correlate the use of ASA with a reduced risk of depression in older men who present high blood Hcy levels, suggesting that ASA could be an effective therapy in these cases. However, more studies are necessary to better clarify ASA efficacy in higher levels of Hcy.

Funding Information This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), PRONEX(16/2551-0000465-0)/Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS-Brazil) and INCT (EN 465671/2014-4)/CNPq-Brazil.

Compliance with Ethical Standards All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed and experimental protocol was approved by the University's Ethics Committee (CEUA) under the project #31436.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302(2-3):141–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)
- Almeida OP, Flicker L, Yeap BB, Alfonso H, McCaul K, Hankey GJ (2012) Aspirin decreases the risk of depression in older men with high plasma homocysteine. *Transl Psychiatry* 2(8):e151. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.79>
- Asanuma M, Nishibayashi-Asanuma S, Miyazaki I, Kohno M, Ogawa N (2001) Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J Neurochem* 76(6):1895–1904. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2001.00205.X>
- Banecka-Majkutewicz Z, Sawuła W, Kadziński L, Węgrzyn A, Banecki B (2012) Homocysteine, heat shock proteins, genistein and vitamins in ischemic stroke—pathogenic and therapeutic implications
- Biasibetti-Brendler H, Schmitz F, Pierozan P, Zanotto BS, Prezzi CA, de Andrade RB, Wannmacher CMD, Wyse ATS (2017) Hypoxanthine induces neuroenergetic impairment and cell death in striatum of young adult Wistar rats. *Mol Neurobiol*:1–9. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0634-z>
- Boldyrev A, Bryushkova E, Mashkina A, Vladychenskaya E (2013) Why is homocysteine toxic for the nervous and immune systems? *Curr Aging Sci* 6(1):29–36. <https://doi.org/10.2174/18746098112059990007>
- Boutin H, LeFeuvre RA, Homai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ (2001) Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci* 21(15):5528–5534
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72(1-2):248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Butz LW, du Vigneaud V (1932) The formation of a homologue of cysteine by the decomposition of methionine with sulphuric acid. *J Biol Chem* 99:135–142
- Cahill CM, Rogers JT (2008) Interleukin (IL) 1 β induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/I κ B kinase α pathway targeting activator protein-1. *J Biol Chem* 283(38):25900–25912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707692200>
- Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I (2006) Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: an overview. *J Inher Metab Dis* 29(1):3–20. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0106-5>
- Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA (2001) Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 345(25):1809–1817. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa003199>
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R (2001) Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 10(5):433–443. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.5.433>
- Chen H, Zhang SM, Hernán MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A (2003) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 60(8):1059–1064. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.8.1059>
- Chen J, Zuo S, Wang J, Huang J, Zhang X, Liu Y, Zhang Y, Zhao J, Han J, Xiong L, Shi M, Liu Z (2014) Aspirin promotes oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation after white matter lesion. *Front Aging Neurosci* 6:1–10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00007>
- Da Cunha AA, Ferreira AGK, Da Cunha MJ, Pederzoli CD, Becker DL, Coelho JG, Dutra-Filho CS, Wyse ATS (2011) Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. *Mol Cell Biochem* 358(1-2):153–160. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0930-2>
- Da Cunha AA, Ferreira AGK, Loureiro SO, Da Cunha MJ, Schmitz F, Netto CA, Wyse ATS (2012) Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats. *Neurochem Res* 37(8):1660–1669. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0769-2>
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(2):88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Faraci FM (2003) Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(3):371–373. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000063607.56590.7F>
- Faraci FM, Lentz SR (2004) Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 35(2):345–347. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000115161.10646.67>
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33:829–837, 837a–837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs304>
- Gori AM, Corsi AM, Fedì S, Gazzini A, Sofi F, Bartali B, Bandinelli S, Gensini GF, Abbate R, Ferrucci L (2005) A proinflammatory state is associated with hyperhomocysteinemia in the elderly. *Am J Clin Nutr* 82(2):335–341
- Graham IM, O'Callaghan P (2002) Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. *Cardiovasc Drugs Ther* 16(5):383–389. <https://doi.org/10.1023/A:1022126100625>
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1):131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Hald A, Lotharius J (2005) Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol* 193(2):279–290. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.01.013>
- Halliwel B (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35(5):1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18(1):45–51. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.1.45>
- Holven KB, Aukrust P, Retterstol K, Hagve TA, Mørkrid L, Ose L, Nenseter MS (2006) Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 66(1):45–54. <https://doi.org/10.1080/00335510500429821>
- Hsu CS, Li Y (2002) Aspirin potently inhibits oxidative DNA strand breaks: implications for cancer chemoprevention. *Biochem Biophys Res Commun* 293(2):705–709. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00271-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00271-1)
- Ignarro LJ (1989) Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res*:65
- Ignarro LJ (2000) Nitric oxide: biology and pathobiology. Academic Press
- Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y (2005) Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci* 77(15):1836–1843. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.02.014>
- Jimenez-Altayo F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salasces M, Vila E (2005) Increased superoxide anion production by Interleukin-1 impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J*

- Pharmacol Exp Ther 316(1):42–52. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.088435>
- Kaul S, Zadeh AA, Shah PK (2006) Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease. Not Validated J Am Coll Cardiol 48(5):914–923. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.04.086>
- Keller JN, Kindy MS, Holtzberg FW, St. Clair DK, Yen H-C, Gemeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP (1998) Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. J Neurosci 18
- Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, Zaheer S, Iyer SS, Zaheer A (2016) Neuroinflammation induces neurodegeneration. J Neurol Neurosurg spine 1
- Klegeris A, McGeer PL (2005) Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other anti-inflammatory agents in the treatment of neurodegenerative disease. Curr Alzheimer Res 2(3):355–365. <https://doi.org/10.2174/1567205054367883>
- Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse ATS (2011) Homocysteine induces oxidative–nitritative stress in heart of rats: prevention by folic acid. Cardiovasc Toxicol 11(1):67–73. <https://doi.org/10.1007/s12012-010-9094-7>
- Kruman II, Culmse C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. J Neurosci 20(18):6920–6926
- Kulkarni K, Richard BC (2003) Lifestyle, homocysteine, and the metabolic syndrome. Metab Syndr Relat Disord 1(2):141–147. <https://doi.org/10.1089/15404190332294461>
- Lehotsky J, Petras M, Kovalska M, Tothova B, Drgova A, Kaplan P (2015) Mechanisms involved in the ischemic tolerance in brain: effect of the homocysteine. Cell Mol Neurobiol 35(1):7–15. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0112-3>
- Li Y, Liu L, Kang J, Sheng JG, Barger SW, Mrak RE, Griffin WST (2000) Neuronal–glial interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. J Neurosci 20:149–155
- Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A (2001) Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. JAMA 286(17):2107–2113. <https://doi.org/10.1001/jama.286.17.2107>
- Liu C-C, Ho W-Y, Leu K-L, Tsai H-M, Yang T-H (2009) Effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. J Biochem Mol Toxicol 23(5):349–356. <https://doi.org/10.1002/jbt.20298>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193(3):265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. Proc Natl Acad Sci U S A 93(21):11853–11858. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11853>
- Maluf SW, Erdtmann B (2000) Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. Mutat Res Toxicol Environ Mutagen 471(1–2):21–27. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00107-8)
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 47(3):469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EBS, Andreazza AC, Zanotto C, Moro AM, Garcia SC, Gonçalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Wyse ATS (2009a) Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. Neurochem Int 54(1):7–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.08.011>
- Matté C, Stefanello FM, Mackedanz V, Pederzoli CD, Lamers ML, Dutra-Filho CS, Dos Santos MF, Wyse ATS (2009b) Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. Int J Dev Neurosci 27(4):337–344. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.03.005>
- McCully KS (2015) Homocysteine metabolism, atherosclerosis, and diseases of aging. In: Comprehensive physiology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp 471–505. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150021>
- Milton NGN (2008) Homocysteine inhibits hydrogen peroxide breakdown by catalase. Open Enzym Inhib J 1(1):34–41. <https://doi.org/10.2174/1874940200801010034>
- Moore AH, O'Banion M (2002) Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. Adv Drug Deliv Rev 54(12):1627–1656. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00162-X)
- Murray MT, Pizzorno JE (2013) Textbook of natural medicine. In: Textbook of natural medicine
- Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. J Histochem Cytochem 49(9):1183–1186. <https://doi.org/10.1177/002215540104900912>
- Neves LB, Macedo DM, Lopes AC (2004) Homocysteine. J Bras Patol Med Lab 40(5):311–320. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442004000500006>
- Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. FEBS Lett 580(13):2994–3005. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.088>
- Picerno I, Chirico C, Condello S, Visalli G, Ferlazzo N, Gorgone G, Caccamo D, Lentile R (2007) Homocysteine induces DNA damage and alterations in proliferative capacity of T-lymphocytes: a model for immunosenescence? Biogerontology 8(2):111–119. <https://doi.org/10.1007/s10522-006-9040-z>
- Poddar R, Paul S (2009) Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death. J Neurochem 110(3):1095–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06207.x>
- Rao GHR, Fareed J (2012) Aspirin prophylaxis for the prevention of thrombosis: expectations and limitations. Thrombosis 2012: 104707–104709. <https://doi.org/10.1155/2012/104707>
- Richman IB, Owens DK (2017) Aspirin for primary prevention. Med Clin North Am 101(4):713–724. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.03.004>
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH (2000) Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. Circulation 101(15):1767–1772. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.15.1767>
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM (2012) A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. ScientificWorldJournal 2012:756357–756315. <https://doi.org/10.1100/2012/756357>
- Scherer EBS, da Cunha MJ, Matté C, Schmitz F, Netto CA, Wyse ATS (2010) Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and brain acetylcholinesterase activity in the rat. Neurobiol Learn Mem 94(2):247–253. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.06.002>
- Scherer EBS, da Cunha AA, Kolling J, da Cunha MJ, Schmitz F, Sitta A, Lima DD, Delwing D, Vargas CR, Wyse ATS (2011) Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. Int J Dev Neurosci 29(7):693–699. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.06.004>

- Scherer EBS, Loureiro SO, Vuaden FC, da Cunha AA, Schmitz F, Kolling J, Savio LEB, Bogo MR, Bonan CD, Netto CA, Wyse ATS (2014) Mild hyperhomocysteinemia increases brain acetylcholinesterase and proinflammatory cytokine levels in different tissues. *Mol Neurobiol* 50(2):589–596. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8660-6>
- Schliebs R, Arendt T (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113(11):1625–1644. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0579-2>
- Schweinberger BM, Rodrigues AF, dos Santos TM, Rohden F, Barbosa S, da Luz Soster PR, Partata WA, Faccioni-Heuser MC, Wyse ATS (2017) Methionine administration in pregnant rats causes memory deficit in the offspring and alters ultrastructure in brain tissue. *Neurotox Res*. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9830-x>
- Sharma GS, Kumar T, Dar TA, Singh LR (2015) Protein N-homocysteinylolation: from cellular toxicity to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1850(11):2239–2245. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.013>
- Shi X, Ding M, Dong Z, Chen F, Ye J, Wang S, Leonard SS, Castranova V, Vallyathan V (1999) Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol Cell Biochem* 199(1/2):93–102. <https://doi.org/10.1023/A:1006934612368>
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Singh RP, Sharad S, Kapur S (2004) Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *JACM* 5:218–25
- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J (2016) The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17101733>, 10
- Song Y-S, Rosenfeld ME (2004) Methionine-induced hyperhomocysteinemia promotes superoxide anion generation and NF- κ B activation in peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *J Med Food* 7(2):229–234. <https://doi.org/10.1089/1096620041224021>
- Streck EL, Matte C, Vieira PS, Rombaldi F, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse ATS (2002) Reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochem Res* 27(12):1593–1598. <https://doi.org/10.1023/A:1021670607647>
- Tauseef M, Sharma KK, Fahim M (2007) Aspirin restores normal baroreflex function in hypercholesterolemic rats by its antioxidative action. *Eur J Pharmacol* 556(1-3):136–143. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.029>
- Tauseef M, Shahid M, Sharma KK, Fahim M (2008) Antioxidative action of aspirin on endothelial function in hypercholesterolaemic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(4):314–321. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00277.x>
- Teismann P, Fergert B (2001) Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39(2):167–174. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(200102\)39:2<167::AID-SYN8>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1098-2396(200102)39:2<167::AID-SYN8>3.0.CO;2-U)
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35(3):206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Touzani O, Boutin H, LeFeuvre R, Parker L, Miller A, Luheshi G, Rothwell N (2002) Interleukin-1 influences ischemic brain damage in the mouse independently of the interleukin-1 type I receptor. *J Neurosci* 22(1):38–43
- Tracey KJ, Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405(6785):458–462. <https://doi.org/10.1038/35013070>
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH (1993) Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 39:1764–1779
- Underwood MJ, More RS (1994) The aspirin papers. *BMJ* 308(6921):71–72. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6921.71>
- Vanzin CS, Manfredini V, Marinho AE, Biancini GB, Ribas GS, Deon M, Wyse AT, Wajner M, Vargas CR (2014) Homocysteine contribution to DNA damage in cystathionine β -synthase-deficient patients. *Gene* 539(2):270–274. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.02.015>
- Wainstein MV, Mossmann M, Araujo GN, Gonçalves SC, Gravina GL, Sangalli M, Veadrigo F, Matte R, Reich R, Costa FG, Andrades M, da Silva AMV, Bertoluci MC (2017) Elevated serum interleukin-6 is predictive of coronary artery disease in intermediate risk overweight patients referred for coronary angiography. *Diabetol Metab Syndr* 9(1):67. <https://doi.org/10.1186/s13098-017-0266-5>
- Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15(22):2922–2933
- Wang J, Tan L, Wang H-F, Tan C-C, Meng X-F, Wang C, Tang S-W, Yu J-T (2015) Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* 44:385–396. <https://doi.org/10.3233/JAD-141506>
- Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N (1995) Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5):1585–1589. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1585>
- Wu R, Lamontagne D, de Champlain J (2002) Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 105(3):387–392. <https://doi.org/10.1161/hc0302.102609>
- Wyse ATS, Zugno AI, Streck EL, Matté C, Calcagnotto T, Wannmacher CMD, Wajner M (2002) Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 27:1685–1689. <https://doi.org/10.1023/A:1021647329937>
- Xu Z, Tong C, Eisenach JC (1996) Acetylcholine stimulates the release of nitric oxide from rat spinal cord. *Anesthesiology* 85(1):107–111. <https://doi.org/10.1097/0000542-199607000-00015>
- Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K (1998) Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273(23):14085–14089. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14085>
- Zhou J, Werstuck GH, Lhotak S, Shi YY, Tedesco V, Trigatti B, Dickhout J, Majors AK, DiBello PM, Jacobsen DW, Austin RC (2008) Hyperhomocysteinemia induced by methionine supplementation does not independently cause atherosclerosis in C57BL/6J mice. *FASEB J* 22(7):2569–2578. <https://doi.org/10.1096/fj.07-105353>

PARTE III

4 DISCUSSÃO

A hiperhomocisteinemia leve é uma condição considerada fator de risco para doenças neurodegenerativas e vasculares, incluindo isquemia cerebral e cardíaca (Aguilar et al., 2004; Castro et al., 2006; Troen et al., 2008). A hiperhomocisteinemia leve é prevalente na população em geral, principalmente em idosos, e suas causas estão associadas a fatores fisiológicos, patológicos, nutricionais, medicamentosos, hormonais e hábitos cotidianos (Aguilar et al., 2004; Castro et al., 2006; Kulkarni e Richard, 2003; Lentz, 2005; McCully, 2015; Neves et al., 2004).

O tratamento da hiperhomocisteinemia leve pode ser feito de acordo com sua causa, incluindo suplementação de vitaminas, tratamento de patologias vinculadas a condição, reposição hormonal, mudanças de hábitos diários, dentre outros. Além disso, estudos vêm mostrando alternativas de prevenção e proteção para as alterações causadas pela Hcy. Estudos com outros modelos de hiperhomocisteinemia mostraram o efeito protetor do sulfeto de hidrogênio em cérebro (Kamat et al., 2016), do ácido fólico em coração (Kolling et al., 2011), da creatina em músculo esquelético (Kolling et al., 2014) e do ácido quinurênico em células endoteliais (Wejksza et al., 2009).

Longoni et al., (2016) mostrou que a 1,25-dihidroxitamina D3 (calcitriol) apresenta efeitos neuroprotetores em fatias de córtex cerebral de ratos adultos em modelo *ex vivo* de hiperhomocisteinemia leve. Em um estudo clínico, Almeida e colaboradores (2012) correlacionaram o uso de ASA com a redução do risco de depressão em idosos que apresentavam hiperhomocisteinemia, sugerindo que ASA pode ser uma terapia eficaz nesses pacientes. No modelo animal de hiperhomocisteinemia crônica leve quimicamente induzida, ASA é o primeiro neuroprotetor testado, visto que esse modelo é mais recente em nosso grupo de pesquisa.

Sendo assim, o principal objetivo desse estudo foi avaliar se a administração intraperitoneal e crônica de uma baixa dose de ASA (25mg/Kg de peso corporal) em animais submetidos ao modelo químico de hiperhomocistemia leve, era capaz de prevenir os efeitos da Hcy sobre parâmetros de inflamação, estresse oxidativo/nitrativo e morfológicos em córtex cerebral. Sendo o modelo de hiperhomocistemia leve utilizado já padronizado em nosso grupo de pesquisa, no qual os ratos apresentam níveis plasmáticos de Hcy de aproximadamente 30 μ M (Scherer et al., 2014, 2011).

Nossos resultados mostraram que os ratos submetidos a administração de Hcy tiveram aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 β em córtex cerebral e corroboram com outros estudos que mostram que a administração de Hcy aumenta marcadores inflamatórios em cérebro (da Cunha et al., 2010; Da Cunha et al., 2012; Scherer et al., 2014). McCarty (2000) propôs que o aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 está associado à redução nos níveis de vitamina B6 ativa, e consequente redução da atividade enzimática da CBS, resultando em aumento nos níveis plasmáticos de Hcy. Outros estudos relacionam o aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 com o aumento nos níveis de Hcy (Gori et al., 2005; Holven et al., 2006) e com a patogênese de doenças vasculares (Lindmark et al., 2001; Ridker et al., 2000; Wainstein et al., 2017). O aumento nos níveis de IL-6 parece ser um dos mecanismos pelo qual a Hcy exerce seus danos endoteliais, e ao contrário do que esperávamos, ASA não preveniu essa alteração.

Além da IL-6, a IL-1 β também estava aumentada nos ratos hiperhomocistêmicos. Estudos sugerem que a Hcy aumenta a síntese de IL-1 β mediante aumento da expressão de P2X7 e da atividade de NF- κ B e ERK em macrófagos murinos (Zanin et al., 2015). Essa citocina também está envolvida na patogênese da aterosclerose (Kirii et al., 2003) e vem sendo mostrada como importante mediadora na neurodegeneração, visto que é induzida em danos cerebrais associados à isquemia,

excitotoxicidade e trauma (Boutin et al., 2001; Touzani et al., 2002), além de ser encontrada em níveis elevados na doença de Alzheimer (Li et al., 2000). Mecanismos para isso incluem o envolvimento da IL-1 β na promoção de um estado inflamatório e oxidativo mediante indução da transcrição de IL-6 (Cahill e Rogers, 2008), aumento da atividade da AChE neuronal (Li et al., 2000) e aumento da produção de O₂⁻ (Jimenez-Altayo et al., 2005). ASA preveniu parcialmente o aumento de IL-1 β .

Mostramos nesse trabalho que a Hcy também está envolvida com o aumento da atividade da AChE em córtex cerebral. O aumento da atividade da AChE pode contribuir para a redução da disponibilidade de ACh no cérebro (Moore e O'Banion, 2002). A ACh é um neurotransmissor importante nos processos de memória e aprendizado e sua redução está associada ao dano cognitivo (Schliebs e Arendt, 2006). A ACh também apresenta propriedades anti-inflamatórias e sua redução contribui para um estado pró-inflamatório. Estudos mostram que a ACh inibe a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e IL-6 (Tracey et al., 2000) e estimula a liberação de NO de maneira concentração-dependente (Xu et al., 1996). De uma maneira resumida, a redução da disponibilidade de ACh por causa do aumento da atividade da AChE visto em nossos ratos hiperhomocisteinêmicos, deve ter contribuído, pelo menos em parte, para o aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e para a redução da biodisponibilidade de NO também visto em nossos resultados. ASA foi capaz de prevenir o aumento da atividade de AChE e preveniu parcialmente o aumento de IL-1 β , ambos eventos parecem ter uma relação de causa e efeito, visto que IL-1 β aumenta a atividade de AChE que impede a inibição da liberação dessa citocina pela ACh. A redução da neuroinflamação pode aliviar os sintomas e minimizar a neurodegeneração (Kempuraj et al., 2016). Estudos mostram que o uso prolongado de ASA e outros NSAIDS estão associados à redução do risco de

Alzheimer, devido aos seus efeitos neuroprotetores (Klegeris e McGeer, 2005; Wang et al., 2015).

Assim como Scherer et al (2011), os resultados desse trabalho mostraram que ratos submetidos ao modelo químico de hiperhomocisteinemia leve apresentaram redução da biodisponibilidade de NO em córtex cerebral. Sabe-se que a redução de NO tem impacto na função vascular, visto que o NO é importante para promover o relaxamento de vasos sanguíneos além de ter propriedades anti-proliferativas e anti-coagulantes importantes para prevenir a aterosclerose (Ignarro, 2000, 1989). Estudos apontam que esse seria um dos mecanismos pelo qual a hiperhomocisteinemia exerce seus danos endoteliais, inclusive com maior sensibilidade em microvasos cerebrais, e que o estresse oxidativo e/ou nitrativo causado pela Hcy, seriam os maiores responsáveis por essa alteração (Faraci, 2003; Faraci e Lentz, 2004; Lentz, 2005). Apesar de ASA não ter prevenido a redução da biodisponibilidade de NO em ratos hiperhomocisteinêmicos, acreditamos que devido às suas propriedades anticoagulantes, ASA pode ajudar a prevenir os danos vasculares causados pela Hcy.

O presente trabalho também mostrou que a atividade da enzima antioxidante SOD foi reduzida em animais hiperhomocisteinêmicos. A redução na atividade de qualquer defesa antioxidante contribui para um desbalanço entre defesas antioxidantes e produção de espécies reativas, o qual é conhecido como estresse oxidativo (Halliwell, 2007). Além de proteger as células contra as reações danosas do O_2^- , a SOD também parece ser necessária para a liberação da forma ativa de NO. Por isso, danos na SOD parecem ter impacto na biodisponibilidade e bioatividade de NO (Mügge et al., 1991; Price et al., 2000). A redução da biodisponibilidade de NO está associada a inativação dessa molécula pelo ânion O_2^- para a formação do oxidante $ONOO^-$. Sabe-se que em condições de estresse oxidativo e inflamação, mais O_2^- é formado e conseqüentemente, mais $ONOO^-$

(Lundberg et al., 2015). Estudos têm demonstrado que o ONOO^- é capaz de inibir várias enzimas, mediante nitração de resíduos específicos de tirosina, e uma das enzimas alvo é a SOD mitocondrial. Conseqüentemente, esse mecanismo leva a redução da atividade da SOD, o que resulta em maior disponibilidade de O_2^- para reagir com NO e produzir mais ONOO^- , sendo que O_2^- e ONOO^- são responsáveis por provocar danos oxidativos/nitrativos mitocondriais irreversíveis (Faraci, 2003; MacMillan-Crow et al., 1996; Yamakura et al., 1998). Nossos resultados sugerem que a Hcy estabelece uma relação de causa e efeito entre a redução da biodisponibilidade de NO e atividade da SOD, e vice-versa. O ASA parece não ter ação pronunciada sobre essas alterações em questão, mas preveniu parcialmente a redução da atividade da SOD.

Além da redução da SOD, a hiperhomocisteinemia leve em ratos também causou a redução da atividade e imunoconteúdo da CAT. Junto com a SOD, a CAT é importante na detoxificação de ERO e na manutenção da homeostase celular. Estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa, utilizando outros modelos de hiperhomocisteinemia, mostraram o potencial da Hcy em reduzir a atividade de algumas enzimas antioxidantes, incluindo a CAT, em estruturas cerebrais (Longoni et al., 2016; Matté et al., 2009; Wyse et al., 2002). Milton (2008) relaciona os elevados níveis de Hcy com a redução da atividade da CAT, ambas características encontradas em doenças como Alzheimer, Diabetes e aterosclerose. Ele sugere que a Hcy, mesmo em concentrações fisiológicas, pode agir diretamente sobre a CAT, a convertendo em sua forma inativa de composto II, inibindo sua função de hidrólise do H_2O_2 . Em nosso estudo, os ratos induzidos ao modelo de hiperhomocisteinemia leve e tratados simultaneamente com ASA, tiveram o retorno da atividade e imunoconteúdo da CAT para a normalidade. Sugerimos que de alguma forma, ainda desconhecida, ASA foi capaz de prevenir a inativação da CAT. Estudos mostram que ASA possui atividade antioxidante, eliminando ERO e ERN, sendo capaz de proteger

as células contra estresse oxidativo/nitrativo (Asanuma et al., 2001; Shi et al., 1999; Tauseef et al., 2008, 2007; Wu et al., 2002). Também foi mostrado que em baixas doses, ASA protegeu melanócitos ao induzir a expressão da enzima antioxidante heme-oxigenase 1 (HO-1) mediante ativação da via Nrf2-ARE (Jian et al., 2016).

Mostramos algumas alterações nos parâmetros inflamatórios e oxidativos/nitrativos causadas pela Hcy. Como consequência, os animais submetidos à hiperhomocisteinemia leve apresentaram dano a proteínas. Uma das possíveis explicações poderia ser a S-nitrosilação de grupos tióis das proteínas pelo ONOO⁻ (Förstermann e Sessa, 2012). A S-nitrosilação altera a estrutura de proteínas e pode estar relacionado com a redução de grupos sulfidrilas com consequente dano proteico, como visto nesse trabalho. Outro mecanismo para a modificação estrutural de proteínas é a N-homocisteinilação. A N-homocisteinilação é uma modificação covalente pela Hcy tiolactona (metabólito da Hcy) que resulta na desnaturação de proteínas, inativação enzimática e até formação de amilóide, estando associada a doenças neurodegenerativas (Sharma et al., 2015). Por outro lado, em associação com ASA, houve uma prevenção parcial do dano a proteínas causado pela Hcy.

Mostramos indicação de genotoxicidade pelo teste cometa pela primeira vez nesse modelo de hiperhomocisteinemia leve. O teste cometa avalia o dano ao DNA cromossômico em relação a sua migração, que se assemelha a forma de um cometa e é causada por rupturas na molécula (Speit e Hartmann, 2005). Outros estudos, tanto pré-clínicos quanto clínicos corroboram com esse resultado, mostrando a genotoxicidade causada pela Hcy (Ho et al., 2002; Kruman et al., 2000; Liu et al., 2009; Matté et al., 2009; Picerno et al., 2007; Vanzin et al., 2014). Blount et al. (1997) associa o dano ao DNA causado pela Hcy com alterações no ciclo de metilação do DNA. Possivelmente parte desse dano deve-se ao estresse oxidativo/nitrativo induzido pela Hcy e possível

aumento na produção de ONOO^- , o qual é responsável por causar quebras na molécula de DNA (Förstermann e Sessa, 2012). Susan Hsu et al (2002) sugere que em concentrações farmacológicas, o ASA inibe o dano oxidativo do DNA. Em nosso estudo, os animais tratados concomitantemente com ASA e Hcy tiveram o índice de dano ao DNA parcialmente reduzido quando comparado aos animais hiperhomocisteinêmicos sem tratamento com ASA, porém ASA teve efeito *per se* no aumento do índice de dano ao DNA, o qual precisa ser melhor elucidado em estudos posteriores.

Nossos resultados mostraram que os ratos submetidos à hiperhomocisteinemia leve apresentaram alterações bioquímicas e, conseqüentemente, danos às proteínas e DNA em córtex cerebral. Para completar esses resultados, realizamos análise morfológica do córtex cerebral dos ratos por microscopia eletrônica de transmissão. Os ratos hiperhomocisteinêmicos exibiram neurônios alterados com núcleo mais eletrodense, carioteca disforme, citoplasma pobre em organelas, sendo que as mitocôndrias não foram claramente identificadas, e o neuropilo estava desorganizado e vacuolizado. Como se sabe, as mitocôndrias são essenciais para as células eucarióticas, atuando como centros bioenergéticos. Portanto, alterações nas mitocôndrias podem comprometer a função de transferência de elétrons e conseqüentemente, a manutenção do potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP. Além disso, no espaço intermembranar, são encontradas proteínas mitocondriais capazes de ativar a apoptose, sugerindo que o dano mitocondrial, como observado em nossos ratos hiperhomocisteinêmicos, pode estar envolvido com a morte celular (Wang, 2001).

Além disso, a presença de células escuras com características de morte celular foi observada no córtex cerebral desses animais. Sabe-se que a Hcy induz neurotoxicidade que leva à morte celular neuronal, e possivelmente a doenças neurodegenerativas. No entanto, os mecanismos celulares ainda não estão totalmente elucidados (Poddar e Paul,

2009; Škovierová et al., 2016). Hcy foi associado à morte de células neuronais por excitotoxicidade, agindo como agonista de receptores glutamatérgicos ionotróficos e metabotróficos, aumentando indiretamente os níveis de cálcio intracelular e ativando várias cinases (Boldyrev et al., 2013; Obeid e Herrmann, 2006; Poddar e Paul, 2009). Como mostrado no presente e em outros estudos, a Hcy também pode induzir o estresse oxidativo mediante a inibição de enzimas antioxidantes, autooxidação e outros mecanismos (Lehotsky et al., 2015; Scherer et al., 2011). Kruman et al., (2000) sugerem que a Hcy promove apoptose e aumenta a sensibilidade dos neurônios ao estresse oxidativo e à excitotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, mediante indução de dano ao DNA associado à ativação da polimerase de polipropil-ADP-ribose e à depleção de dinucleótido de nicotinamida, eventos os quais precedem a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e a ativação das caspases. ASA foi capaz de reverter as alterações morfológicas nos neurônios corticais induzidos por Hcy, possivelmente devido às suas propriedades medicinais e antioxidantes, e por mecanismos ainda não elucidados.

5 CONCLUSÕES

- O modelo crônico de hiperhomocisteinemia leve causou as seguintes alterações em córtex cerebral de ratos Wistar adultos:
 - ✓ Aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6;
 - ✓ Aumentou a atividade da AChE e não alterou imunoconteúdo;
 - ✓ Diminuiu os níveis de nitritos;
 - ✓ Diminuiu a atividade da SOD e não alterou imunoconteúdo;
 - ✓ Diminuiu a atividade e imunoconteúdo da CAT;
 - ✓ Reduziu o conteúdo total de sulfidrilas;
 - ✓ Aumentou o índice de dano ao DNA;
 - ✓ Mudanças ultraestruturais cerebrais.
- O tratamento com ASA concomitante com a administração de Hcy em córtex cerebral de ratos Wistar adultos preveniu os seguintes parâmetros parcialmente (P) ou totalmente (T):
 - ✓ O aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 β (P);
 - ✓ O aumento da atividade de AChE (T);
 - ✓ A redução da atividade da SOD (P);
 - ✓ A redução da atividade e imunoconteúdo da CAT (T);
 - ✓ A redução do conteúdo total de sulfidrilas (P);
 - ✓ O aumento do índice de dano ao DNA (P);
 - ✓ As alterações ultraestruturais cerebrais (T).

- O tratamento com ASA *per se* em córtex cerebral de ratos Wistar adultos:
 - ✓ Aumentou o índice de dano ao DNA.

Os resultados do presente estudo sugerem que a hiperhomocisteinemia leve causa alterações em alguns parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo/nitrativo, as quais parecem contribuir para os danos às proteínas e DNA observados em córtex cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo. Essas alterações e/ou danos podem induzir mudanças ultraestruturais, as quais foram observadas nos resultados de microscopia eletrônica de transmissão. A administração crônica e intraperitoneal de uma dose baixa de ASA (25 mg/Kg) preveniu alguns desses efeitos causados pela hiperhomocisteinemia leve em ratos. Essa dose deve ser ajustada para humanos visto que cerca de 100% de ASA alcança a circulação sistêmica mediante administração intraperitoneal enquanto que essa biodisponibilidade de ASA pela administração oral (mais utilizada em humanos) é aproximadamente de 50 a 75% (Lance et al., 2009). Sabendo que a hiperhomocisteinemia leve é fator de risco para diversas patologias, esses resultados sugerem que baixas doses de ASA podem ser testadas como opções de terapia preventiva e coadjuvante em indivíduos com hiperhomocisteinemia. Contudo, mais estudos em outras estruturas cerebrais e outros testes bioquímicos são necessários para validar e melhor esclarecer a eficácia e mecanismos pelos quais o ASA exerce seus efeitos neuroprotetores.

6 PERSPECTIVAS

- ✓ Estudar outros parâmetros bioquímicos, tais como metabolismo energético e função mitocondrial;
- ✓ Avaliar parâmetros comportamentais;
- ✓ Testar efeito neuroprotetor de ASA e outros anti-inflamatórios e/ou antioxidantes.

7 REFERÊNCIAS

- Aguilar, B., Rojas, J.C., Collados, M.T., 2004. Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease. *J. Thromb. Thrombolysis* 18, 75–87. doi:10.1007/s11239-004-0204-x
- Almeida, O.P., Flicker, L., Yeap, B.B., Alfonso, H., McCaul, K., Hankey, G.J., 2012. Aspirin decreases the risk of depression in older men with high plasma homocysteine. *Transl. Psychiatry* 2, e151. doi:10.1038/tp.2012.79
- Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Miyazaki, I., Kohno, M., Ogawa, N., 2001. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J. Neurochem.* 76, 1895–1904. doi:10.1046/J.1471-4159.2001.00205.X
- Banecka-Majkutewicz, Z., Sawuła, W., Kadziński, L., Węgrzyn, A., Banecki, B., 2012. Homocysteine, heat shock proteins, genistein and vitamins in ischemic stroke — pathogenic and therapeutic implications.
- Baune, B.T., 2015. Inflammation and neurodegenerative disorders: is there still hope for therapeutic intervention? *Curr. Opin. Psychiatry*. doi:10.1097/YCO.0000000000000140
- Blount, B.C., Mack, M.M., Wehr, C.M., MacGregor, J.T., Hiatt, R.A., Wang, G., Wickramasinghe, S.N., Everson, R.B., Ames, B.N., 1997. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3290–5.
- Boldyrev, A., Bryushkova, E., Mashkina, A., Vladychenskaya, E., 2013. Why is homocysteine toxic for the nervous and immune systems? *Curr. Aging Sci.* doi:10.2174/18746098112059990007
- Boushey, C.J., Beresford, S.A.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G., 1997. A Meta-Analysis of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Arteriosclerotic Vascular Disease and the Potential Preventive Role of Folic Acid. Springer, Boston, MA, pp. 245–249. doi:10.1007/978-1-4615-5771-5_33
- Boutin, H., LeFeuvre, R.A., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Rothwell, N.J., 2001. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J. Neurosci.* 21, 5528–34.
- Boyacioglu, M., Sekkin, S., Kum, C., Korkmaz, D., Kiral, F., Yalinkilinc, H.S., Ak, M.O., Akar, F., 2014. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 66, 407–413. doi:10.1016/j.etp.2014.06.004
- Butz, L.W., du Vigneaud, V., 1932. The formation of a homologue of cysteine by the decomposition of methionine with sulphuric acid. *J. Biol. Chem.* 99 135–142.
- Bydlowski, S.P., Magnanelli, A.C., Chamone, D. de A.F., 1998. Hiper-homocisteinemia e doenças vaso-oclusivas. *Arq. Bras. Cardiol.* 71, 69–76. doi:10.1590/S0066-782X1998000700013
- Cahill, C.M., Rogers, J.T., 2008. Interleukin (IL) 1 β Induction of IL-6 Is Mediated by a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent AKT/I κ B Kinase α Pathway Targeting Activator Protein-1. *J. Biol. Chem.* 283, 25900–25912. doi:10.1074/jbc.M707692200

- Castro, R., Rivera, I., Blom, H.J., Jakobs, C., Tavares de Almeida, I., 2006. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: An overview. *J. Inher. Metab. Dis.* 29, 3–20. doi:10.1007/s10545-006-0106-5
- Catella-Lawson, F., Reilly, M.P., Kapoor, S.C., Cucchiara, A.J., DeMarco, S., Tournier, B., Vyas, S.N., FitzGerald, G.A., 2001. Cyclooxygenase Inhibitors and the Antiplatelet Effects of Aspirin. *N. Engl. J. Med.* 345, 1809–1817. doi:10.1056/NEJMoa003199
- Chen, H., Zhang, S.M., Hernán, M.A., Schwarzschild, M.A., Willett, W.C., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Ascherio, A., 2003. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and the Risk of Parkinson Disease. *Arch. Neurol.* 60, 1059. doi:10.1001/archneur.60.8.1059
- Chen, J., Zuo, S., Wang, J., Huang, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, J., Han, J., Xiong, L., Shi, M., Liu, Z., 2014. Aspirin promotes oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation after white matter lesion. *Front. Aging Neurosci.* 6, 1–10. doi:10.3389/fnagi.2014.00007
- Chen, Z., Karaplis, A.C., Ackerman, S.L., Pogribny, I.P., Melnyk, S., Lussier-Cacan, S., Chen, M.F., Pai, A., John, S.W., Smith, R.S., Bottiglieri, T., Bagley, P., Selhub, J., Rudnicki, M.A., James, S.J., Rozen, R., 2001. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.* 10, 433–43.
- Cobb, C.A., Cole, M.P., 2015. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 84, 4–21. doi:10.1016/j.nbd.2015.04.020
- Cui, Y., Li, J., Zhu, Y., Tang, H., He, X., Xu, Y., 2015. The neuroprotective effects of aspirin following crush injury to rat sciatic nerve. *Int J Clin Exp Med* 8, 18185–18190.
- Cyrus, T., Sung, S., Zhao, L., Funk, C.D., Tang, S., Praticò, D., 2002. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 106, 1282–7.
- Cyrus, T., Yao, Y., Tung, L.X., Praticò, D., 2006. Stabilization of advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by aspirin. *Atherosclerosis* 184, 8–14. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.047
- Da Cunha, A.A., Ferreira, A.G.K., Loureiro, S.O., Da Cunha, M.J., Schmitz, F., Netto, C.A., Wyse, A.T.S., 2012. Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats. *Neurochem. Res.* 37, 1660–1669. doi:10.1007/s11064-012-0769-2
- da Cunha, A.A., Ferreira, A.G.K., Wyse, A.T.S., 2010. Increased inflammatory markers in brain and blood of rats subjected to acute homocysteine administration. *Metab. Brain Dis.* 25, 199–206. doi:10.1007/s11011-010-9188-8
- Danielson, S.R., Andersen, J.K., 2008. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1787–94. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.005
- Dinarello, C.A., 2010. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell* 140, 935–50. doi:10.1016/j.cell.2010.02.043

- Dröge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82.
- Etminan, M., Gill, S., Samii, A., 2003. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 327, 128–0. doi:10.1136/bmj.327.7407.128
- Faraci, F.M., 2003. Hyperhomocysteinemia: A Million Ways to Lose Control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 371–373. doi:10.1161/01.ATV.0000063607.56590.7F
- Faraci, F.M., Lentz, S.R., 2004. Hyperhomocysteinemia, Oxidative Stress, and Cerebral Vascular Dysfunction. *Stroke* 35.
- Ferencik, M., Novak, M., Rovensky, J., Rybar, I., 2001. Alzheimer's disease, inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Bratisl. Lek. Listy* 102, 123–32.
- Finkelstein, J.D., 2007. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 1694–9. doi:10.1515/CCLM.2007.341
- Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–37, 837a–837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
- Gandhi, S., Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 428010. doi:10.1155/2012/428010
- Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., 2002. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1264–75.
- Gori, A.M., Corsi, A.M., Fedi, S., Gazzini, A., Sofi, F., Bartali, B., Bandinelli, S., Gensini, G.F., Abbate, R., Ferrucci, L., 2005. A proinflammatory state is associated with hyperhomocysteinemia in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 335–41.
- Hald, A., Lotharius, J., 2005. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp. Neurol.* 193, 279–290. doi:10.1016/j.expneurol.2005.01.013
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35.
- Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
- Hausladen, A., Stamler, J.S., 1999. Nitrosative stress. *Methods Enzymol.* 300, 389–95.
- Heneka, M.T., O'Banion, M.K., Terwel, D., Kummer, M.P., 2010. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 117, 919–947. doi:10.1007/s00702-010-0438-z
- Hirsch, E.C., Vyas, S., Hunot, S., 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, S210–S212. doi:10.1016/S1353-8020(11)70065-7
- Ho, P.I., Ortiz, D., Rogers, E., Shea, T.B., 2002. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: Glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J. Neurosci. Res.* 70, 694–702. doi:10.1002/jnr.10416
- Hoak, J.C., 1983. Mechanisms of action: aspirin. *Thromb. Res. Suppl.* 4, 47–51.

- Holven, K.B., Aukrust, P., Retterstol, K., Hagve, T.A., Mørkrid, L., Ose, L., Nenseter, M.S., 2006. Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 66, 45–54. doi:10.1080/00335510500429821
- Homocysteine Studies Collaboration, C., 2002. Homocysteine and Risk of Ischemic Heart Disease and Stroke. *JAMA* 288, 2015. doi:10.1001/jama.288.16.2015
- Huang, N., Chen, D., Wu, X., Chen, X., Zhang, X., Niu, J., Shen, H.-Y., Xiao, L., 2016. Aspirin Promotes Oligodendroglial Differentiation Through Inhibition of Wnt Signaling Pathway. *Mol. Neurobiol.* 53, 3258–3266. doi:10.1007/s12035-015-9241-z
- Ignarro, L.J., 2000. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. Academic Press.
- Ignarro, L.J., 1989. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.* 65.
- in 't Veld, B.A., Ruitenber, A., Hofman, A., Launer, L.J., van Duijn, C.M., Stijnen, T., Breteler, M.M.B., Stricker, B.H.C., 2001. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and the Risk of Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 345, 1515–1521. doi:10.1056/NEJMoa010178
- Isobe, C., Murata, T., Sato, C., Terayama, Y., 2005. Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci.* 77, 1836–1843. doi:10.1016/j.lfs.2005.02.014
- Jian, Z., Tang, L., Yi, X., Liu, B., Zhang, Q., Zhu, G., Wang, G., Gao, T., Li, C., 2016. Aspirin induces Nrf2-mediated transcriptional activation of haem oxygenase-1 in protection of human melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 1307–18. doi:10.1111/jcmm.12812
- Jimenez-Altayo, F., Briones, A.M., Giraldo, J., Planas, A.M., Salaices, M., Vila, E., 2005. Increased Superoxide Anion Production by Interleukin-1 Impairs Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Resistance Arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 42–52. doi:10.1124/jpet.105.088435
- Johal, T., Lees, C.C., Everett, T.R., Wilkinson, I.B., 2014. The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78, 244–57. doi:10.1111/bcp.12301
- Kamat, P.K., Kyles, P., Kalani, A., Tyagi, N., 2016. Hydrogen Sulfide Ameliorates Homocysteine-Induced Alzheimer's Disease-Like Pathology, Blood–Brain Barrier Disruption, and Synaptic Disorder. *Mol. Neurobiol.* 53, 2451–2467. doi:10.1007/s12035-015-9212-4
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P.A., Selvakumar, G.P., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S.S., Zaheer, A., 2016. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J. Neurol. Neurosurg. spine* 1.
- Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., Seishima, M., 2003. Lack of Interleukin-1beta Decreases the Severity of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 656–660. doi:10.1161/01.ATV.0000064374.15232.C3
- Klatt, P., Lamas, S., 2000. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response

- to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267, 4928–4944.
doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01601.x
- Klegeris, A., McGeer, P.L., 2005. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other anti-inflammatory agents in the treatment of neurodegenerative disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2, 355–65.
- Koga, T., Claycombe, K., Meydani, M., 2002. Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 161, 365–74.
- Kolling, J., Scherer, E.B., da Cunha, A.A., da Cunha, M.J., Wyse, A.T.S., 2011. Homocysteine Induces Oxidative–Nitritative Stress in Heart of Rats: Prevention by Folic Acid. *Cardiovasc. Toxicol.* 11, 67–73. doi:10.1007/s12012-010-9094-7
- Kolling, J., Scherer, E.B.S., Siebert, C., Marques, E.P., dos Santos, T.M., Wyse, A.T.S., 2014. Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats. *Gene*. doi:10.1016/j.gene.2014.05.005
- Kruman, I.I., Culmsee, C., Chan, S.L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L., Mattson, M.P., 2000. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 20, 6920–6.
- Kulkarni, K., Richard, B.C., 2003. Lifestyle, Homocysteine, and the Metabolic Syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 1, 141–147.
doi:10.1089/154041903322294461
- Kulkarni, O.P., Lichtnekert, J., Anders, H.-J., Mulay, S.R., 2016. The Immune System in Tissue Environments Regaining Homeostasis after Injury: Is “Inflammation” Always Inflammation? *Mediators Inflamm.* 2016, 2856213. doi:10.1155/2016/2856213
- Lai, W.K.C., Kan, M.Y., 2015. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann. Nutr. Metab.* 67, 1–12. doi:10.1159/000437098
- Lance, L.L., Goldman, M.P., Lacy, C.F., Armstrong, L.L., 2009. *Medicamentos Lexi-comp Manole*. Editora Manole Ltda.
- Lehotsky, J., Petras, M., Kovalska, M., Tothova, B., Drgova, A., Kaplan, P., 2015. Mechanisms Involved in the Ischemic Tolerance in Brain: Effect of the Homocysteine. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 7–15. doi:10.1007/s10571-014-0112-3
- Lei, J., Vodovotz, Y., Tzeng, E., Billiar, T.R., 2013. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide* 35, 175–185.
doi:10.1016/j.niox.2013.09.004
- Lentz, S.R., 2005. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1646–1654. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01364.x
- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z.-G., Ghanbari, H., 2013. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 24438–24475.
doi:10.3390/ijms141224438
- Li, Y., Liu, L., Kang, J., Sheng, J.G., Barger, S.W., Mrak, R.E., Griffin, W.S.T., 2000. Neuronal–Glial Interactions Mediated by Interleukin-1 Enhance Neuronal Acetylcholinesterase Activity and mRNA Expression. *J. Neurosci.* 20.
- Lindmark, E., Diderholm, E., Wallentin, L., Siegbahn, A., 2001. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects

- of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA* 286, 2107–13.
- Liu, C.-C., Ho, W.-Y., Leu, K.-L., Tsai, H.-M., Yang, T.-H., 2009. Effects of S -adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 23, 349–356. doi:10.1002/jbt.20298
- Longoni, A., Kolling, J., dos Santos, T.M., dos Santos, J.P., da Silva, J.S., Pettenuzzo, L., Gonçalves, C.-A., de Assis, A.M., Quincozes-Santos, A., Wyse, A.T.S., 2016. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts neuroprotective effects in an ex vivo model of mild hyperhomocysteinemia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 48, 71–79. doi:10.1016/j.ijdevneu.2015.11.005
- Louveau, A., Harris, T.H., Kipnis, J., 2015. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol.* 36, 569–77. doi:10.1016/j.it.2015.08.006
- Lundberg, J.O., Gladwin, M.T., Weitzberg, E., 2015. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 623–641. doi:10.1038/nrd4623
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J.S., Thompson, J.A., 1996. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11853–8.
- Matté, C., Mackedanz, V., Stefanello, F.M., Scherer, E.B.S., Andreazza, A.C., Zanotto, C., Moro, A.M., Garcia, S.C., Gonçalves, C.A., Erdtmann, B., Salvador, M., Wyse, A.T.S., 2009. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: Protective effect of folic acid. *Neurochem. Int.* 54, 7–13. doi:10.1016/j.neuint.2008.08.011
- McCarty, M.F., 2000. Increased homocyst(e)ine associated with smoking, chronic inflammation, and aging may reflect acute-phase induction of pyridoxal phosphatase activity. *Med. Hypotheses* 55, 289–293. doi:10.1054/mehy.1999.1032
- McCully, K.S., 2015. Homocysteine Metabolism, Atherosclerosis, and Diseases of Aging, in: *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 471–505. doi:10.1002/cphy.c150021
- Milton, N.G.N., 2008. Homocysteine Inhibits Hydrogen Peroxide Breakdown by Catalase. *Open Enzym. Inhib. J.* 1, 34–41. doi:10.2174/1874940200801010034
- Moore, A.H., O'Banion, M., 2002. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1627–1656. doi:10.1016/S0169-409X(02)00162-X
- Mudd, S., Levy, H., Kraus, J., 2001. Disorders of transsulfuration., in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*.
- Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Irreverre, F., Laster, L., 1964. Homocystinuria: An Enzymatic Defect. *Science* (80-.). doi:10.1126/science.143.3613.1443
- Mügge, A., Elwell, J.H., Peterson, T.E., Harrison, D.G., 1991. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am. J. Physiol.* 260, C219-25.
- Neves, L.B., Macedo, D.M., Lopes, A.C., 2004. Homocysteine. *J Bras Patol Med Lab* 40, 311–320. doi:10.1590/S1676-24442004000500006

- Obeid, R., Herrmann, W., 2006. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett.* 580, 2994–3005. doi:10.1016/J.FEBSLET.2006.04.088
- Paul, A., Calleja, L., Camps, J., Osada, J., Vilella, E., Ferré, N., Mayayo, E., Joven, J., 2000. The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci.* 68, 457–65.
- Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2012. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 743–54. doi:10.1038/nrendo.2012.189
- Petras, M., Tatarkova, Z., Kovalska, M., Mokra, D., Dobrota, D., Lehotsky, J., Drgova, A., 2014. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J. Physiol. Pharmacol.* 65, 15–23.
- Picerno, I., Chirico, C., Condello, S., Visalli, G., Ferlazzo, N., Gorgone, G., Caccamo, D., Ientile, R., 2007. Homocysteine induces DNA damage and alterations in proliferative capacity of T-lymphocytes: a model for immunosenescence? *Biogerontology* 8, 111–119. doi:10.1007/s10522-006-9040-z
- Poddar, R., Paul, S., 2009. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death. *J. Neurochem.* 110, 1095–106. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06207.x
- Poddar, R., Sivasubramanian, N., DiBello, P.M., Robinson, K., Jacobsen, D.W., 2001. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 103, 2717–23.
- Price, D.T., Vita, J.A., Keaney, J.F., 2000. Redox Control of Vascular Nitric Oxide Bioavailability. *Antioxid. Redox Signal.* 2, 919–935. doi:10.1089/ars.2000.2.4-919
- Rao, G.H.R., Fareed, J., 2012. Aspirin prophylaxis for the prevention of thrombosis: expectations and limitations. *Thrombosis* 2012, 104707. doi:10.1155/2012/104707
- Richman, I.B., Owens, D.K., 2017. Aspirin for Primary Prevention. *Med. Clin. North Am.* 101, 713–724. doi:10.1016/j.mcna.2017.03.004
- Ridker, P.M., Rifai, N., Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., 2000. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101, 1767–72.
- Rodeberg, D.A., Chaet, M.S., Bass, R.C., Arkovitz, M.S., Garcia, V.F., 1995. Nitric oxide: An overview. *Am. J. Surg.* doi:10.1016/S0002-9610(05)80017-0
- Rubio-Perez, J.M., Morillas-Ruiz, J.M., 2012. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal.* 2012, 756357. doi:10.1100/2012/756357
- Santanam, N., Parthasarathy, S., 2007. Aspirin is a substrate for paraoxonase-like activity: Implications in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 191, 272–275. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.027
- Scherer, E.B.S., da Cunha, A.A., Kolling, J., da Cunha, M.J., Schmitz, F., Sitta, A., Lima, D.D., Delwing, D., Vargas, C.R., Wyse, A.T.S., 2011. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative

- damage. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 693–699. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.06.004
- Scherer, E.B.S., Loureiro, S.O., Vuaden, F.C., da Cunha, A.A., Schmitz, F., Kolling, J., Savio, L.E.B., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Netto, C.A., Wyse, A.T.S., 2014. Mild Hyperhomocysteinemia Increases Brain Acetylcholinesterase and Proinflammatory Cytokine Levels in Different Tissues. *Mol. Neurobiol.* 50, 589–596. doi:10.1007/s12035-014-8660-6
- Schliebs, R., Arendt, T., 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 113, 1625–1644. doi:10.1007/s00702-006-0579-2
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W.F., Wolf, P.A., 2002. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 346, 476–483. doi:10.1056/NEJMoa011613
- Sharma, G.S., Kumar, T., Dar, T.A., Singh, L.R., 2015. Protein N-homocysteinylolation: From cellular toxicity to neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850, 2239–2245. doi:10.1016/j.bbagen.2015.08.013
- Shi, X., Ding, M., Dong, Z., Chen, F., Ye, J., Wang, S., Leonard, S.S., Castranova, V., Vallyathan, V., 1999. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol. Cell. Biochem.* 199, 93–102.
- Shrestha, R., Millington, O., Brewer, J., Bushell, T., 2013. Is central nervous system an immune-privileged site? *Kathmandu Univ. Med. J.*
- Singh, R.P., Sharad, S., Kapur, S., 2004. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants 5, 218–25.
- Škovierová, H., Vidomanová, E., Mahmood, S., Sopková, J., Drgová, A., Červeňová, T., Halašová, E., Lehotský, J., 2016. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi:10.3390/ijms17101733
- Speit, G., Hartmann, A., 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol. Biol.* 291, 85–95.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P.S., Rombaldi, F., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2002. Reduction of Na(+),K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochem. Res.* 27, 1593–8.
- Susan Hsu, C., Li, Y., 2002. Aspirin potently inhibits oxidative DNA strand breaks: implications for cancer chemoprevention. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 705–709. doi:10.1016/S0006-291X(02)00271-1
- Tauseef, M., Shahid, M., Sharma, K.K., Fahim, M., 2008. Antioxidative Action of Aspirin on Endothelial Function in Hypercholesterolaemic Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 314–321. doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00277.x
- Tauseef, M., Sharma, K.K., Fahim, M., 2007. Aspirin restores normal baroreflex function in hypercholesterolemic rats by its antioxidative action. *Eur. J. Pharmacol.* 556, 136–143. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.029

- Teismann, P., Ferger, B., 2001. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39, 167–174. doi:10.1002/1098-2396(200102)39:2<167::AID-SYN8>3.0.CO;2-U
- Tendera, M., Wojakowski, W., 2003. Role of antiplatelet drugs in the prevention of cardiovascular events. *Thromb. Res.* 110, 355–9.
- Touzani, O., Boutin, H., LeFeuvre, R., Parker, L., Miller, A., Luheshi, G., Rothwell, N., 2002. Interleukin-1 influences ischemic brain damage in the mouse independently of the interleukin-1 type I receptor. *J. Neurosci.* 22, 38–43.
- Tracey, K.J., Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462. doi:10.1038/35013070
- Troen, A.M., Shea-Budgell, M., Shukitt-Hale, B., Smith, D.E., Selhub, J., Rosenberg, I.H., 2008. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 12474–9. doi:10.1073/pnas.0805350105
- Ueland, P.M., Refsum, H., Stabler, S.P., Malinow, M.R., Andersson, A., Allen, R.H., 1993. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin. Chem.* 39.
- Underwood, M.J., More, R.S., 1994. The aspirin papers. *BMJ* 308, 71–2.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- van Gijn, J., Algra, A., Koudstaal, P., Johnston, M., Yi, Q., Yusuf, S., et al., 2003. Aspirin and stroke prevention. *Thromb. Res.* 110, 349–53. doi:10.1016/S0049-3848(03)00414-6
- Vane, J.R., Botting, R.M., 2003. The mechanism of action of aspirin. *Thromb. Res.* 110, 255–8.
- Vanzin, C.S., Manfredini, V., Marinho, A.E., Biancini, G.B., Ribas, G.S., Deon, M., Wyse, A.T. de S., Wajner, M., Vargas, C.R., 2014. Homocysteine contribution to DNA damage in cystathionine β -synthase-deficient patients. *Gene* 539, 270–274. doi:10.1016/j.gene.2014.02.015
- Wainstein, M. V., Mossmann, M., Araujo, G.N., Gonçalves, S.C., Gravina, G.L., Sangalli, M., Veadrigo, F., Matte, R., Reich, R., Costa, F.G., Andrades, M., da Silva, A.M. V., Bertoluci, M.C., 2017. Elevated serum interleukin-6 is predictive of coronary artery disease in intermediate risk overweight patients referred for coronary angiography. *Diabetol. Metab. Syndr.* 9, 67. doi:10.1186/s13098-017-0266-5
- Wang, J., Tan, L., Wang, H.-F., Tan, C.-C., Meng, X.-F., Wang, C., Tang, S.-W., Yu, J.-T., 2015. Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *J. Alzheimers. Dis.* 44, 385–96. doi:10.3233/JAD-141506

- Wang, X., 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922–33.
- Watanabe, M., Osada, J., Aratani, Y., Kluckman, K., Reddick, R., Malinow, M.R., Maeda, N., 1995. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1585–9.
- Wejksza, K., Rzeski, W., Turski, W.A., 2009. Kynurenic acid protects against the homocysteine-induced impairment of endothelial cells. *Pharmacol. Rep.*
- Wu, R., Lamontagne, D., de Champlain, J., 2002. Antioxidative Properties of Acetylsalicylic Acid on Vascular Tissues From Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation* 105.
- Wyse, A.T.S., Zugno, A.I., Streck, E.L., Matté, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2002. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase Activity in Hippocampus of Rats Subjected to Acute Administration of Homocysteine Is Prevented by Vitamins E and C Treatment. *Neurochem. Res.* 27, 1685–1689. doi:10.1023/A:1021647329937
- Xu, Z., Tong, C., Eisenach, J.C., 1996. Acetylcholine stimulates the release of nitric oxide from rat spinal cord. *Anesthesiology* 85, 107–11.
- Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., Murayama, K., 1998. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J. Biol. Chem.* 273, 14085–9.
- Zanin, R.F., Bergamin, L.S., Morrone, F.B., Coutinho-Silva, R., de Souza Wyse, A.T., Battastini, A.M.O., 2015. Pathological concentrations of homocysteine increases IL-1 β production in macrophages in a P2X7, NF- κ B, and erk-dependent manner. *Purinergic Signal.* 11, 463–470. doi:10.1007/s11302-015-9464-5

8 ANEXOS

8.1 Anexo I - Carta de aprovação do comitê de ética



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 31436

Título: Efeito neuroprotetor do ácido acetilsalicílico em ratos adultos submetidos ao modelo crônico de hiperhomocisteinemia leve

Vigência: 30/06/2016 à 30/06/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANGELA TEREZINHA DE SOUZA WYSE - coordenador desde 30/06/2016
Daniella de Souza Moreira - Aluno de Mestrado desde 30/06/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 11/07/2016 - SALA 323 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 242 ratos Wistar, machos, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Depto de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 29 de Julho de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI

Coordenador da comissão de ética