

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

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

Cristiane Matté

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

Porto Alegre, 2006

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

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

Cristiane Matté

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

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

Porto Alegre, 2006

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

Agradecimentos

A Deus, pela proteção espiritual.

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

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

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

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

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

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

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

Jens Christian Skou

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

RESUMO

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

ABSTRACT

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

LISTA DE FIGURAS

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

SUMÁRIO

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

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

I. INTRODUÇÃO

1. Erros Inatos do Metabolismo

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

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

2. Homocistinúria

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

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

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

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

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

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

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

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

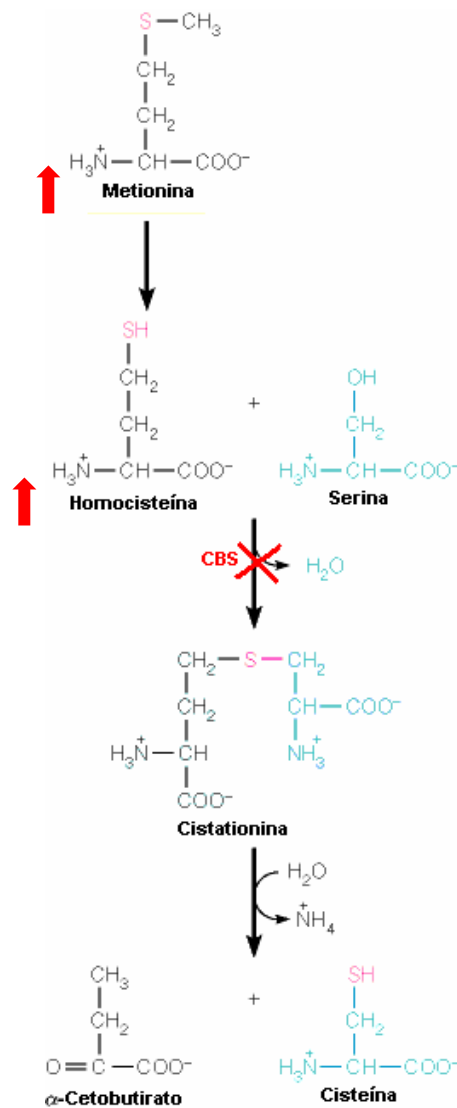


Figura 1. Via metabólica da homocisteína e bloqueio metabólico da enzima cistionina β-sintase característico da homocistinúria.

3. Homocisteína

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

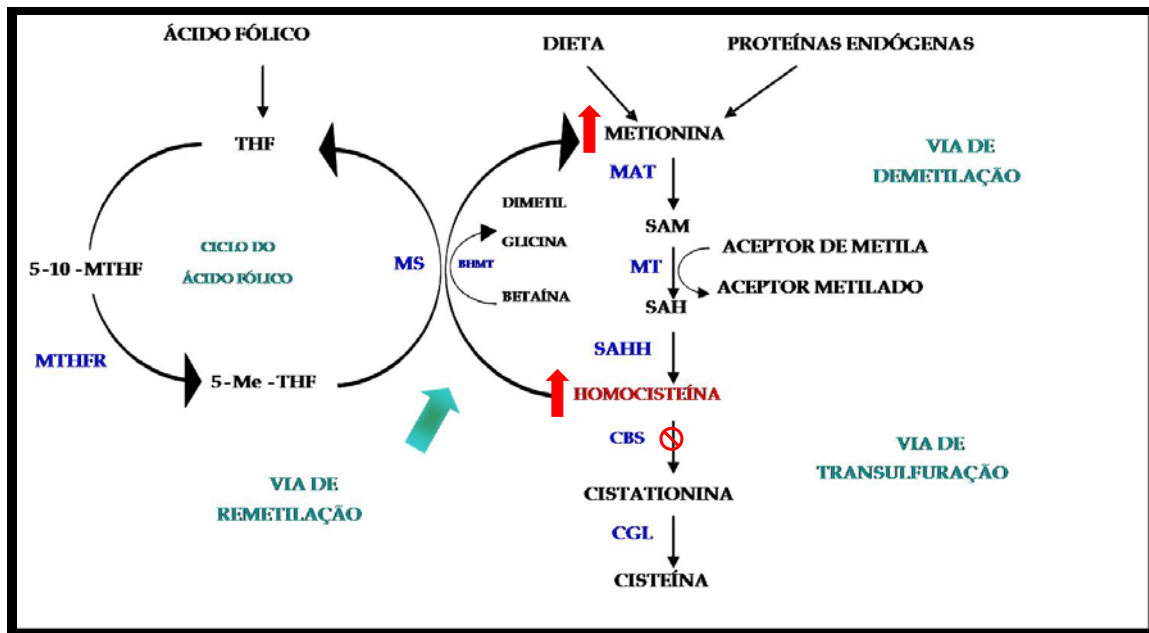


Figura 2. Metabolismo da homocisteína e bloqueio metabólico da enzima cistationina β-sintase característico da homocistinúria (Adaptado de Mudd et al., 2001).

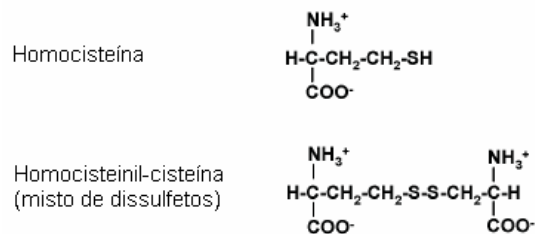
MAT – metionina adenosil transferase; MT – metiltransferase; SAHH – S-adenosilhomocisteína hidrolase; CBS – cistationina β-sintase; CGL – cistationina γ-liase; MS – metionina sintase; BHMT – betaína homocisteína metiltransferase; MTHFR – metileno tetrahydrofolato redutase; SAM – S-adenosil metionina;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

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

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

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

Homocisteína não ligada a proteínas



Homocisteína ligada a proteínas

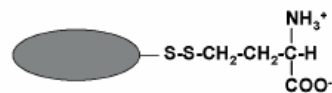


Figura 3. Formas redox da homocisteína.

3.1. Homocisteína e Neurotoxicidade

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

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

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

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

4. Ácido Fólico

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

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

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

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

5. Na⁺,K⁺-ATPase

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

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

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

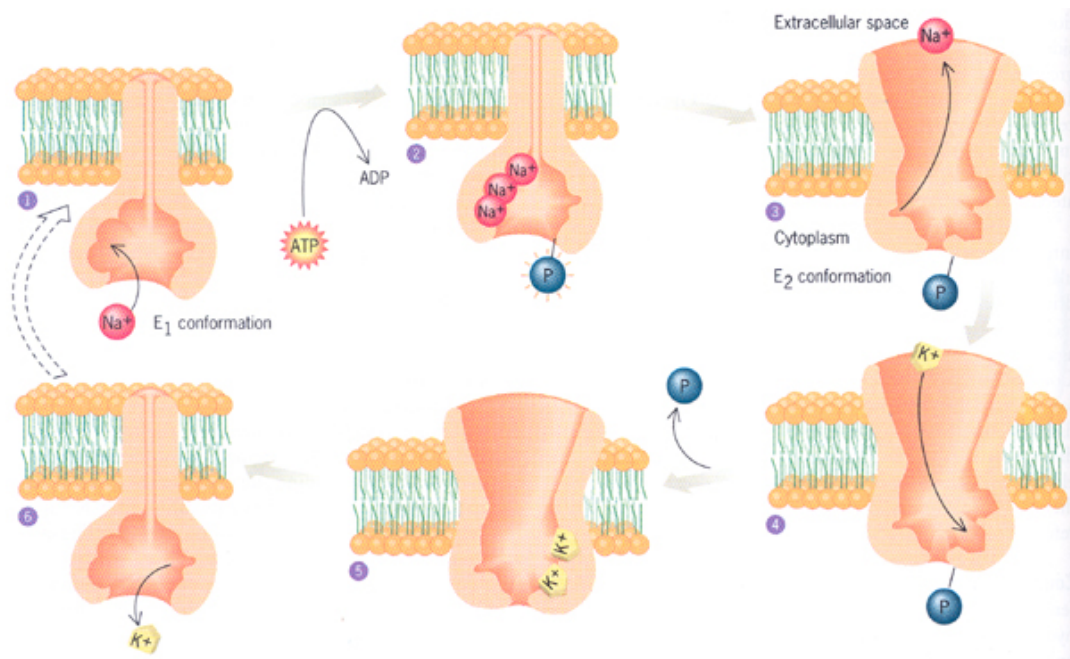


Figura 4. Ciclo catalítico da Na^+, K^+ -ATPase.

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

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

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

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

6. Butirilcolinesterase

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

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

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

7. Estresse Oxidativo

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

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

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

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

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

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

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

Esse trabalho será dividido em três capítulos como segue:

Capítulo I

Objetivos específicos

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

Capítulo II

Objetivos específicos

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

Capítulo III

Objetivos específicos

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

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

III. RESULTADOS

CAPÍTULO I – ARTIGO 01

Na⁺,K⁺-ATPase INHIBITION BY HOMOCYSTEINE IS PREVENTED BY FOLATE AND L-NAME IN PARIETAL CORTEX OF RATS

Cristiane Matté, Eduardo Durigon, Carlos Alexandre Netto and Angela T.S. Wyse.

Periódico: Metabolic Brain Disease

Status: Submetido (o guia para autores do periódico Metabolic Brain Disease encontra-se no anexo 01)

**Na⁺,K⁺-ATPase INHIBITION BY HOMOCYSTEINE IS PREVENTED BY FOLATE AND
L-NAME IN PARIETAL CORTEX OF RATS**

Cristiane Matté, Eduardo Durigon, Carlos Alexandre Netto and Angela T.S. Wyse

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address reprint request to: Dr^a. Angela T.S. Wyse, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003 Porto Alegre RS Brazil, Phone: 55 51 3316 5573, Fax: 55 51 3316 5535, E-mail: wyse@ufrgs.br

Abstract

Homocystinuria is characterized by cystathionine- β -synthase deficiency, resulting in tissue accumulation of homocysteine. Patients present mental retardation, psychiatric disorders, seizures and vascular disturbs. We have recently shown that homocysteine added to the enzymatic assay, at an equivalent concentration found in homocystinuric patients, reduces Na^+,K^+ -ATPase activity in synaptic plasma membranes from parietal cortex. In the present study we evaluated the effect of exposing parietal cortex homogenates to homocysteine on Na^+,K^+ -ATPase activity from synaptic plasma membranes of rats, as well whether folate, a methyl donor to homocysteine remethylation, and N^ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor, would affect enzyme inhibition caused by homocysteine. Results showed that homocysteine reduces Na^+,K^+ -ATPase activity in synaptic plasma membranes from parietal cortex homogenates of rats and that both folate and L-NAME prevent homocysteine effect on Na^+,K^+ -ATPase activity. *In vitro* kinetic studies revealed that the apparent K_m and V_{max} of Na^+,K^+ -ATPase for ATP as substrate were 1.42 mM and 3.12 $\mu\text{mol Pi}$ released per min per mg of protein, respectively. The K_i value was 0.074 μM , and the inhibition was non-competitive type. Our findings contribute to the understanding of homocysteine action on brain tissue and suggest: a) nitric oxide might play an important role on homocysteine effect; b) folic acid supplementation might be useful to treat neurological symptoms of hyperhomocysteinemic patients.

Key words: Homocystinuria, Homocysteine, Folate, L-NAME, Na^+,K^+ -ATPase, Parietal Cortex.

1. Introduction

Cystathionine- β -synthase (CBS) deficiency is the most frequently cause of homocystinuria (HCU), an inborn error of metabolism characterized biochemically by tissue accumulation of homocysteine (Hcy) and clinically by mental retardation, psychiatric disorders, seizures and vascular disturbs (Mudd et al., 2001). Studies have associated high Hcy and low folate levels with neurodegenerative disorders (Mattson et al., 2002; Duan et al., 2002; Bottiglieri, 2005), cerebrovascular endothelial dysfunction (Lee et al., 2004) and cardiovascular diseases (Moat et al., 2004). The inverse correlation between Hcy and folate levels, and the use of folate as an adjuvant therapy in some homocystinuric patients can be explained, at least in part, by Hcy metabolism, as long as folate is converted to 5-methyltetrahydrofolate, the bioactive form of folate and the main methyl donor to Hcy remethylation to methionine (Met) (Finkelstein, 1998; Mudd et al., 2001; Brosnan et al., 2004).

Na^+, K^+ -ATPase is a transmembrane enzyme discovered in 1957 by Skou. This enzyme has a key role in the maintenance of cell homeostasis by regulation of membrane potential cation transport across the cellular membrane and electrochemical gradient for neuronal excitability (Skou, 1998; Mobasheri et al., 2000; Kaplan, 2002). It is present at high concentration in brain membranes, consuming about 40-50% of the ATP generated in this tissue (Erecinka and Silver, 1994). It has been shown that Na^+, K^+ -ATPase activity is inhibited by oxidative stress (Kurella et al., 1999; Dobrota et al., 1999; Wang et al., 2003; Chakraborty et al., 2003), nitric oxide (NO) and NO-derived products such as peroxynitrite (Sato et al., 1997). In this context, we have shown that N^{O} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor (NOS) prevents the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity caused by arginine in rat brain,

suggesting that the inhibition of this enzyme activity was probably caused by NO/peroxynitrite and/or free radical formation (Wyse et al., 2001). On the other hand, antioxidants such as glutathione, cysteine, dithiothreitol (Streck et al., 2001) and vitamins E and C prevent brain Na⁺,K⁺-ATPase inhibition caused Hcy (Wyse et al., 2002).

Literature evidence suggest that Hcy effect may occur as a result of oxidative stress, generating superoxide and other free radicals from Hcy autoxidation (Loscalzo, 1996; Faraci and Lentz, 2004; Dayal et al., 2004), NO formation since Hcy activates both NMDA receptors (Lipton et al., 1997) and NOS (Gbadegesin et al., 1999). In agreement with these findings, Jara-Prado and colleagues (2003) showed that Hcy induces lipid peroxidation in brain synaptosomes and we have shown that Hcy *in vitro* induces oxidative stress on parietal cortex, by increasing lipid peroxidation and reduces antioxidant defenses in parietal cortex (Matté et al., 2004). It has also been demonstrated that Hcy increases lipid peroxidation in rat brain synaptosomes and that NOS inhibitors, such as L-NAME, effectively decrease this Hcy-induced effect (Jara-Prado et al., 2003). On the other hand, studies also show that folate acts as a scavenger of superoxide radicals (Doshi et al., 2001; Moat et al., 2004) and prevent the “uncoupling” of NOS and superoxide generation, what could prevent the peroxynitrite formation, a neurotoxic agent derivative of NO (Das, 2003).

It was recently demonstrated that Hcy added to the enzymatic assay, at concentrations usually found in severe HCU, inhibits Na⁺,K⁺-ATPase in purified synaptic plasma membrane preparations from parietal cortex of rats, suggesting a direct effect this amino acid on enzyme activity (Matté et al., 2004). Furthermore, folate pretreatment prevents Na⁺,K⁺-ATPase inhibition caused by acute Hcy administration (Matté et al., *in press*).

In the present study we investigated whether the exposure of parietal cortex homogenates to Hcy would inhibit Na⁺,K⁺-ATPase activity from synaptic plasma membranes of rats and the possibility of folate and L-NAME would prevent such effect. Finally, we performed kinetics studies of the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase caused by Hcy when added in enzymatic assay. Parietal cortex was used because this cerebral structure is known to be involved in memory/learning and homocystinuric patients, as well as a rat model of hyperhomocysteinemia, present cognitive deficits (Mudd et al., 2001; Reis et al., 2002; Streck et al., 2004).

2. Experimental procedure

2.1. Animals and reagents

Twenty-nine-day-old Wistar rats (number of rats = 107) were obtained from the Central Animal House of the Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12/12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room. Rats had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federação das Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental and was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

All chemicals were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

2.2. Tissue and homogenate preparation

Rats were sacrificed without anesthesia, the brain was quickly removed and parietal cortex dissected out. As for preparation of synaptic plasma membranes and determination of Na⁺,K⁺-ATPase activity, the parietal cortex was homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA, pH 7.4. In some experiments, homogenates were preincubated at 37°C for 1 h with 500 μM Hcy, 0.25 μM folate, 1.0 μM folate, 1.0 mM L-NAME, or with 500 μM Hcy combined with 0.25 μM folate, 1.0 μM folate, or 1.0 mM L-NAME. All substances were dissolved in 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA, pH 7.4. We used 500 μM Hcy because it is equivalent concentrations to those found in patients blood with severe HCU (Mudd et al., 2001). Doses of folate and L-NAME were chosen according to Fenech (2001) and Avrova and colleagues (1999). After preincubation, synaptic plasma membranes were prepared and the activity of Na⁺,K⁺-ATPase was determined.

2.3. Preparation of synaptic plasma membranes from parietal cortex

Synaptic plasma membranes from parietal cortex were prepared according to the method of Jones and Matus (1974) with some modifications (Wyse et al., 1998). The homogenate was centrifuged at 1,000 x *g* for 10 min and the supernatant removed and centrifugated at 12,000 x *g* for 20 min. The pellet was then resuspended in hypotonic buffer (5.0 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1) at 0°C for 30 min, and applied on a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 mM. After centrifugation at 69,000 x *g* for 120 min, the fraction between 0.8 and 1.0 mM sucrose

interface was taken as the membrane enzyme preparation. The membranes were washed in 5.0 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1.

2.4. Na⁺,K⁺-ATPase activity assay

The reaction mixture for Na⁺,K⁺-ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl₂, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in final volume of 200 μL. The reaction was initiated by ATP (0.3 mM) addition. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as described by Wyse and colleagues (1998). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan and colleagues (1986). All samples were run in duplicate.

For kinetic studies, 100 - 500 μM Hcy was added in Na⁺,K⁺-ATPase assay. We also verified the ideal time for incubation and protein concentration on Na⁺,K⁺-ATPase activity measure (data not shown). We used 5 minutes of incubation, at 37°C, protein concentration between 0.15 - 0.30 mg/mL and ATP concentration between 0.2 - 0.6 mM.

2.5. Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by the Duncan's multiple range test, when F value was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. Significance was achieved when $p < 0.05$.

3. Results

We first investigated the effect of preincubating parietal cortex homogenates in the absence, or presence, of Hcy on Na^+, K^+ -ATPase activity from synaptic plasma membranes of rats. In this study, homogenates from parietal cortex were exposed to 500 μM Hcy in presence or absence of folate (0.25 and 1.0 μM), subsequently synaptic plasma membranes were prepared and enzyme activity was assessed. Figure 1 shows that Hcy significantly reduces (40%) Na^+, K^+ -ATPase activity. Folate *per se* does not alter enzyme activity, but it was effective in preventing the inhibitory effect of Hcy on Na^+, K^+ -ATPase activity [$F(5, 26) = 6.94$; $p < 0.001$].

Considering that L-NAME prevents lipid peroxidation in rat synaptosomes, we also investigated the effect of preincubating parietal cortex homogenates with 500 μM Hcy in the absence or presence of 1.0 mM L-NAME, with synaptic plasma membranes being prepared afterwards. As can be observed in Figure 2, Hcy significantly inhibits Na^+, K^+ -ATPase activity [$F(3, 18) = 6.37$; $p < 0.01$]; *post hoc* analysis shows that L-NAME *per se* did not alter enzyme activity, but prevents the inhibitory effect of Hcy on Na^+, K^+ -ATPase activity.

Finally, we studied the kinetics of inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity caused by *in vitro* Hcy. The Lineweaver–Burk double-reciprocal plot was analyzed over the range of 0.2 - 0.6 mM of ATP concentrations as substrate in the absence and presence of 0.1

and 0.5 mM Hcy. Results showed that the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity caused by Hcy was non-competitive (Figure 3), as far as maximal Na⁺,K⁺-ATPase velocity decreased with increasing Hcy concentrations, while *K_m* values did not change significantly. Apparent *K_m* and *V_{max}* of Na⁺,K⁺-ATPase for ATP as substrate were 1.42 mM and 3.12 μmol Pi released per min per mg of protein, respectively. The *K_i* value (inhibition constant), as determined from Dixon plots (plots not shown), obtained was 0.074 μM.

4. Discussion

In the present study we investigated the effect of exposing parietal cortex homogenates to Hcy on Na⁺,K⁺-ATPase activity from synaptic plasma membranes of rats. Results show that Hcy, at equivalent concentrations to those found in patients blood with severe HCU (around 500 μM Hcy), provokes a significant inhibition (40%) on Na⁺,K⁺-ATPase activity. These results corroborate previous studies from our laboratory showing that Hcy, when added to enzymatic assay (*in vitro* studies) or administered to rats (*in vivo* studies), reduces brain Na⁺,K⁺-ATPase activity (Streck et al., 2002, Matté et al., 2004).

Considering that Hcy is converted to Met by remethylation, in which the main methyl donor is 5-methyltetrahydrofolate, a biactive form of folate (Mudd et al., 2001; Brosnan et al., 2004) and that folate prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity caused by hyperhomocysteinemia in rats (Matté et al., *in press*), we also evaluated the effect of this vitamin on the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase provoked by Hcy. In addition, we tested whether Hcy could inhibit Na⁺,K⁺-ATPase activity via free radical and/or NO formation by preincubating cerebral cortex homogenates with 500 μM Hcy in the

absence or presence of L-NAME. Our results showed that both folate and L-NAME prevented the reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity caused by Hcy (Figures 1 and 2).

There are a few possibilities to explain folate effect. As it is converted to 5-methyltetrahydrofolate, a methyl donor in Hcy remethylation to Met, it can be suggested that this pathway converts the excess of Hcy to Met. However, Met does not achieve sufficient levels to reduce Na⁺,K⁺-ATPase activity (Stefanello et al., 2005). From another point of view, Hcy effect on Na⁺,K⁺-ATPase may occur as a result of oxidative damage, as far as reactive oxygen species, as superoxide, are produced by Hcy autoxidation (Loscalzo, 1996; Faraci and Lentz, 2004; Dayal et al., 2004, Matté et al., 2004), or by NMDA receptors overstimulation (Lipton et al., 1997; Das, 2003), that provokes Ca²⁺ influx, which increases NOS activity in neurons (Culcasi et al., 1994; Gbadegesin et al., 1999; Nelson et al., 2003). In agreement with these findings, Zhang and colleagues (1998) showed that Hcy exerts cerebrovascular effects mediated by superoxide production in parietal cortex, as long as pretreatment with superoxide dismutase prevented Hcy effect. On the other hand, superoxide can react with NO and give rise to peroxynitrite (Nelson et al., 2003; Dudzinski et al., *in press*), which can inhibit Na⁺,K⁺-ATPase activity by reducing sulfhydryl groups at the active site of enzyme (Sato et al., 1997; Kurella et al., 1999; Wang et al., 2003). Na⁺,K⁺-ATPase is inhibited by free radical formation and oxidative stress (Kurella et al., 1999; Dobrota et al., 1999; Wang et al., 2003; Chakraborty et al., 2003). Reports from literature show that folate can directly scavenge superoxide radicals (Doshi et al., 2001; Moat et al., 2004), or act enhancing the availability of tetrahydrobiopterin, preventing “uncoupling” NOS and superoxide generation (Das, 2003). Considering data above discussed, folate could act by two ways: (1) decreasing Hcy concentration by inducing its remethylation, or (2) scavenging superoxide radicals or reducing its generation, thereby preventing indirect effect of Hcy

on Na⁺,K⁺-ATPase activity. However, the precise mechanism underlying folate action remains to be elucidated.

Literature supports our results that L-NAME prevents the inhibitory effect of Hcy on Na⁺,K⁺-ATPase activity, since it has been shown that it prevents the inhibition of brain Na⁺,K⁺-ATPase caused by some amino acids such as arginine and glutamate (Avrova et al., 1999; Wyse et al., 2002) and the increase of lipid peroxidation induced by Hcy in rat brain synaptosomes (Jara-Prado et al., 2003). In addition, studies demonstrate that high Hcy levels have been related to the increase of lipid peroxidation and NO formation in patients with stroke (Kossi and Zakhary, 2000). Taking together, these results point to an important role of NO and/or peroxynitrite and/or free radical formation on inhibitory effect of Hcy on Na⁺,K⁺-ATPase activity.

In vitro assays of folate and L-NAME on Na⁺,K⁺-ATPase activity (i.e. added directly to the enzyme assay) showed no preventive effect on they inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity. We believe that folate and L-NAME had no direct effect on enzyme activity, due to limited time of contact with enzyme on incubation medium (data not shown).

Data from kinetic studies showed that Hcy inhibited enzyme activity by a non-competitive manner, as far as maximal Na⁺,K⁺-ATPase velocity decreased with increased Hcy concentrations, while *K_m* values did not change significantly (Figure 3). These findings support that Hcy reduces Na⁺,K⁺-ATPase activity, but not act at in the active site, where ATP is the ligand, and are in agreement with previous results showing that Hcy reduced Na⁺,K⁺-ATPase activity on hippocampus of rats by a non-competitive manner (Streck et al., 2002).

In conclusion, considering that Hcy inhibits Na⁺,K⁺-ATPase activity and that folate and L-NAME prevented such effect, in accordance with our previous results

demonstrating that antioxidants also prevent the Hcy inhibition of this enzyme (Streck et al., 2001), it is feasible to propose that one of the mechanisms by which this amino acid is neurotoxic through of inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity due to NO and/or peroxynitrite and/or by free radical formation and/or by remethylation of Hcy. Although the mechanism involved is far understood, these results, could support the use of folate to homocystinuric patients or to individuals with hyperhomocysteinemia.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from CAPES, CNPq - Brazil and Programa de Núcleos de Excelência-Financiadora de Estudos e Projetos (PRONEX).

REFERENCES

- Avrova, N.F., Shestak, K.I., Zakharova, I.O., Sokolova, T.V., and Leontev, V.G. (1999). The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. *Neurochem. Res.* 24:1101-1106.
- Bottiglieri, T. (2005). Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 29:1103-1112.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brosnan, J.T., Jacobs, R.L., Stead, L.M., and Brosnan, M.E. (2004). Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim. Pol.* 51:405-413.
- Chakraborty, H., Sen, P., Sur, A., Chatterjee, U., and Chakrabarti, S. (2003). Age-related oxidative inactivation of Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 38:705-710.
- Chan, K.M., Delfer, D., and Junger, K.D. (1986). A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157:375-380.
- Culcasi, M., Lafon-Cazal, M., Pietri, S., and Bockaert, J. (1994). Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J. Biol. Chem.* 269:12589-12593.
- Das, U.N. (2003). Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition.* 19:686-692.

- Dayal, S., Arning, E., Bottiglieri, T., Boger, R.H., Sigmund, C.D. Faraci, F.M., and Lentz, S.R. (2004). Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke*. 35:1957-1962.
- Dobrota, D., Matejovicova, M., Kurrela, E.G., and Boldyrev, A.A. (1999). Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19:141-149.
- Doshi, S.N., McDowell, I.F.W., Moat, S.J., Lang, D., Newcombe, R.G., Kredan, M.B., Lewis, M.J., and Goodfellow, J. (2001). Folate improves endothelial function in coronary artery disease. An effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1196-1202.
- Duan, W., Ladenheim, B., Cutler, R.G., Kruman, I.I., Cadet, J.L., and Mattson, M.P. (2002). Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 80:101-110.
- Dudzinski, D.M., Igarashi, J., Greif, D., and Michel, T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:235-276. *in press.*
- Erecinska, M., and Silver, I.A. (1994). Silver, ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 16:37-71.
- Faraci, F.M., and Lentz, S.R. (2004). Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke*. 35:345-347.
- Fenech, M. (2001). The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Res.* 475:57-67.
- Finkelstein, J.D. (1998). The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr.* 157:40-44.

- Gbadegesin, M., Vicini, S., Hewett, S.J., Wink, D.A., Espey, M., Pluta, R.M., and Colton, C.A. (1999). Hypoxia modulates nitric oxide-induced regulation of NMDA receptor currents and neuronal cell death. *Am. J. Physiol.* 277:673-683.
- Jara-Prado, A., Ortega-Vazquez, A., Martinez-Ruano, L., Rios, C., and Santamaría, A. (2003). Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotox. Res.* 5:237-243.
- Jones, D.H., and Matus, A.I. (1974). Isolation of plasma synaptic membrane from brain by combination flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta.* 356:276-287.
- Kaplan, J.H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71:511-535.
- Kossi, M.M.H.E., and Zakhary, M.M. (2000). Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke.* 31:1889-1892.
- Kurella, E.G., Tyulina, O.V., and Boldyrev, A.A. (1999). Oxidative resistance of Na/K-ATPase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19:133-140.
- Lee, H., Kim, H.J., Kim, J.M., and Chang, N. (2004). Effects of dietary folic acid supplementation on cerebrovascular endothelial dysfunction in rats with induced hyperhomocysteinemia. *Brain Res.* 996:139-147.
- Lipton, S.A., Kim, W.K., Choi, Y.B., Kumar, S., D'Emilia, D.M., Rayudu, P.V., Arnelle, D.R., and Stamler, J.S. (1997). Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:5923-5928.
- Loscalzo, J. (1996). The oxidative stress of hyperhomocysteinemia. *J. Clin. Invest.* 98:5-7.

- Matté, C., Monteiro, S.C., Calcagnotto, T., Bavaresco, C.S., Netto, C.A., and Wyse, A.T.S. (2004). In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na⁺, K⁺-ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22:185-190.
- Matté, C., Durigon, E., Stefanello, F.M., Cipriani, F., Wajner, M., and Wyse, A.T.S. Folic acid pretreatment prevents the reduction of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. *Int. J. Dev. Neurosci.* *in press*.
- Mattson, M.P., Kruman, I.I., and Duan, W. (2002). Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res. Rev.* 1:95-111.
- McCully, K.S. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 56:111-128.
- Moat, S.J., Lang, D., McDowell, I.F.W., Clarke, Z.L., Madhavan, A.K., Lewis, M.J., and Goodfellow, J. (2004). Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 15:64-79.
- Mobasher, A., Avila, J., Cozar-Castellano, I., Brownleader, M.D., Trevan, M., Francis, M.J.O., Lamb, J.F., and Martin-Vasallo, P. (2000). Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.* 20:51-91.
- Mudd, S.H., Levy, H.L., and Skovby, F. (2001). Disorders of Transsulfuration. In (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, pp. 1279-1327.
- Nelson, E.J., Connolly, J., and McArthur, P. (2003). Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol. Cell.* 95:3-8.

- Reis, E.A., Zugno, A.I., Franzon, R., Tagliari, B., Matté, C., Lamers, M.L., Netto, C.A., and Wyse, A.T.S. (2002). Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. *Metab. Brain Dis.* 17:211-217.
- Sato, T., Kamata, Y., Irifune, M., and Nishikawa, T. (1997). Inhibitory Effect of Several Nitric Oxide-Generating Compounds on Purified Na⁺,K⁺-ATPase Activity from Porcine Cerebral Cortex. *J. Neurochem.* 68:1312-1318.
- Skou, J.C. (1998). The Identification of the Sodium Pump. *Biosci. Rep.* 18:155-169.
- Stefanello, F.M., Chiarani, F., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., and Wyse, A.T.S. (2005). Methionine alters Na(+),K(+)-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23:651-656.
- Streck, E.L., Zugno, A.I., Tagliari, B., Franzon, R., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., and Wyse, A.T.S. (2001). Inhibition of rat brain Na⁺,K⁺-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem. Res.* 26:1195-1200.
- Streck, E.L., Zugno, A.I., Tagliari, B., Sarkis, J.J.F., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., and Wyse, A.T.S. (2002). On the mechanism of the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity caused by homocysteine. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 20:77-81.
- Streck, E.L., Bavaresco, C.S., Netto, C.A., and Wyse, A.T.S. (2004). Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav. Brain Res.* 153:377-381.
- Wang, X.Q., Xiao, A.Y., Sheline, C., Hyrc, K., Yang, A., Goldberg, M.P., Choi, D.W., and Yu, S.P. (2003). Apoptotic insults impair Na⁺,K⁺-ATPase activity as a

- mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J. Cell Sci.* 116:2099-2110.
- Wyse, A.T.S., Brusque, A.M., Silva, C.G., Streck, E.L., Wajner, M., and Wannmacher, C.M.D. (1998). Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport.* 9:1719-1721.
- Wyse, A.T.S., Bavaresco, C.S., Bandinelli, C., Streck, E.L., Franzon, R., Dutra-Filho, C.S., and Wajner, M. (2001). Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. *Neurochem. Res.* 26:515-520.
- Wyse, A.T.S., Zugno, A.I., Streck, E.L., Matté, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M.D., and Wajner, M. (2002). Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem. Res.* 27:1685-1689.
- Zhang, F., Slungaard, A., Vercellotti, G.M., and Iadecola, C. (1998). Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine. *Am. J. Physiol.* 274:1704-1711.

Figure 1. Effect of homocysteine, folate, and homocysteine plus folate in parietal cortex homogenates on Na^+, K^+ -ATPase activity in synaptic plasma membranes. Parietal cortex homogenates were incubated at 37°C for 1 h with $500 \mu\text{M}$ homocysteine, 0.25 and $1.0 \mu\text{M}$ folate, or with $500 \mu\text{M}$ homocysteine plus 0.25 or $1.0 \mu\text{M}$ folate and plasma membrane were prepared afterwards. Results are expressed as mean \pm S.D. for 5-6 independent experiments performed in duplicate. ***Different from control, $p < 0.001$ (Duncan's multiple range test). C - control, F1 - $0.25 \mu\text{M}$ folate, F2 - $1.0 \mu\text{M}$ folate, Hcy - homocysteine.

Figure 2. Effect of homocysteine, L-NAME, and homocysteine plus L-NAME in parietal cortex homogenates on Na^+, K^+ -ATPase activity in synaptic plasma membranes. Parietal cortex homogenates were incubated at 37°C for 1 h with $500 \mu\text{M}$ homocysteine, 1.0 mM L-NAME, or with $500 \mu\text{M}$ homocysteine plus 1.0 mM L-NAME and synaptic plasma membranes were prepared afterwards. Results are expressed as mean \pm S.D. for 5-6 independent experiments performed in duplicate. ***Different from control, $p < 0.001$ (Duncan's multiple range test). Hcy - homocysteine.

Figure 3. Kinetic analysis of the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity caused by homocysteine in synaptic plasma membranes from parietal cortex of rats. The graph shows double-reciprocal plot of Na^+, K^+ -ATPase activity for ATP concentrations ($0.2 - 0.6 \text{ mM}$): (\blacklozenge) in the absence and in the presence of (\blacksquare) $100 \mu\text{M}$ and (\blacktriangle) $500 \mu\text{M}$ homocysteine. All experiments were conducted at least four times and similar results were obtained; data presented were from individual experiment.

Figure 1

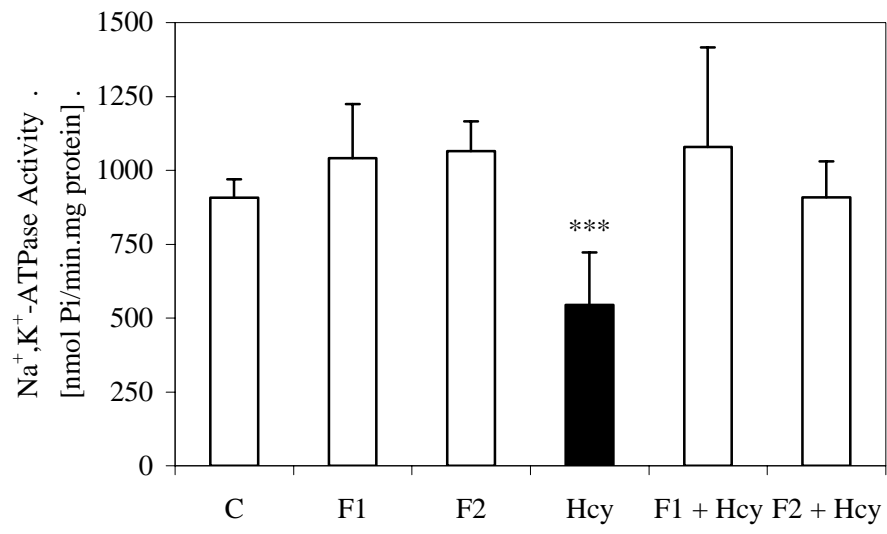


Figure 2

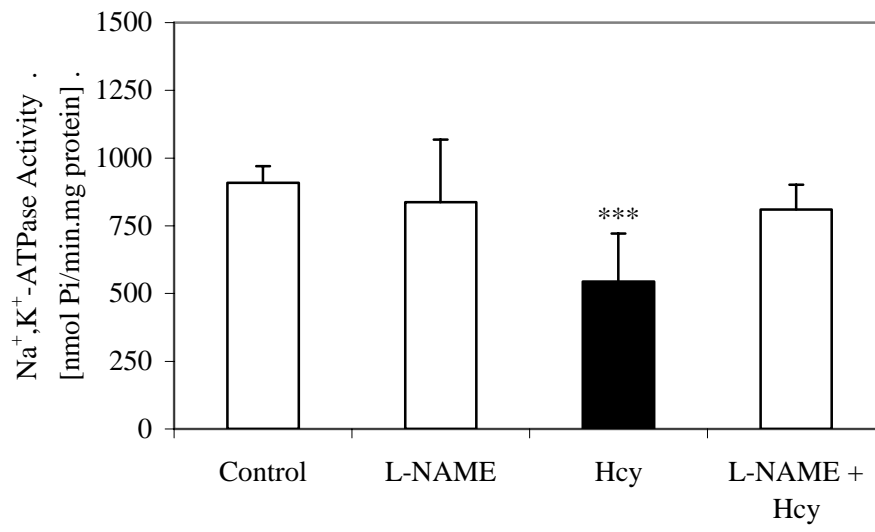
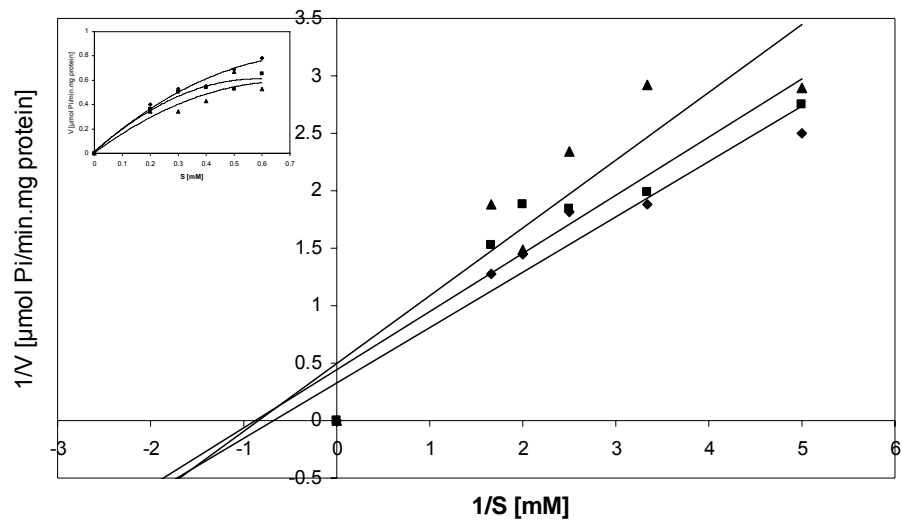


Figure 3



CAPÍTULO II – ARTIGO 02**FOLIC ACID PRETREATMENT PREVENTS THE REDUCTION OF Na⁺,K⁺-ATPase
AND BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITIES IN RATS SUBJECTED TO ACUTE
HYPERHOMOCYSTEINEMIA**

Cristiane Matté, Eduardo Durigon, Francieli M. Stefanello, Franciele Cipriani, Moacir
Wajner and Angela T.S. Wyse.

Periódico: International Journal of Developmental Neuroscience

Status: *in press*



ELSEVIER

Int. J. Devl Neuroscience xxx (2006) xxx–xxx

 INTERNATIONAL JOURNAL
 of
 DEVELOPMENTAL
 NEUROSCIENCE

www.elsevier.com/locate/ijdevneu

Folic acid pretreatment prevents the reduction of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia

Cristiane Matté, Eduardo Durigon, Francieli M. Stefanello, Franciele Cipriani, Moacir Wajner, Angela T.S. Wyse*

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 11 November 2005; received in revised form 9 December 2005; accepted 12 December 2005

Abstract

The main objective of the present study was to evaluate the effect of folic acid pretreatment on parietal cortex Na⁺,K⁺-ATPase and serum butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. Animals were pretreated daily with an intraperitoneal injection of folic acid (5 mg/kg) or saline from the 22th to the 28th day of age. Twelve hours after the last injection of folic acid or saline, the rats received a single subcutaneous injection of homocysteine (0.6 μmol/g of weight body) or saline and were killed 1 h later. Serum was collected and the brain was quickly removed and parietal cortex dissected. Results showed that acute homocysteine administration significantly decreased the activities of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase on parietal cortex and serum, respectively. Furthermore, folic acid pretreatment totally prevented these inhibitory effects. We also evaluated the effect of acute homocysteine administration on some parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid-reactive substances and total thiol content in parietal cortex of rats. No alteration of these parameters were observed in parietal cortex of homocysteinemic animals, indicating that these oxidative stress parameters were probably not responsible for the reduction of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase activities. The presented results confirm previous findings that acute hyperhomocysteinemia produces an inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase activities and that pretreatment with folic acid prevents such effects. Assuming that homocysteine might also reduce the activities of these enzymes in human beings, our results support a new potential therapeutic strategy based on folic acid supplementation to prevent the neurological damage found in hyperhomocysteinemia.

© 2005 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Homocystinuria; Metabolic disease; Homocysteine; Folic acid; Na⁺,K⁺-ATPase; Butyrylcholinesterase

1. Introduction

Folic acid is a cofactor of the enzymatic reaction that promotes the remethylation of homocysteine (Hcy), a toxic sulfur-containing amino acid that can induce neuronal dysfunction and cell death (Mattson and Shea, 2003). This vitamin is also essential to DNA synthesis and repair, as well as to amino acid synthesis (Mattson and Haberman, 2003). Folic acid deficiency results in DNA strand breaks (Pogribny et al., 1995), DNA hypomethylation (Pogribny et al., 1997) and abnormal gene expression (Wainfan and Poirier, 1992).

Furthermore, emerging evidence links elevated levels of Hcy and/or low serum folic acid levels with higher rates of vascular, neurodegenerative and neuropsychiatric diseases, as well as with neural tube defects, Down syndrome, cancer and homocystinuria (Brattstrom et al., 1988; Daly et al., 1995; Boushey et al., 1995; Rydlewicz et al., 2002; Mattson et al., 2002; Mattson, 2003; Fillon-Emery et al., 2004; Lamers et al., 2004; Verhoef and de Groot, 2005; Bottiglieri, 2005). On the other hand, it has been shown that folic acid supplementation can significantly reduce the risk of these disorders (Botez et al., 1982; Daly et al., 1995; Kim, 1999; Mattson et al., 2002; Verhaar et al., 2002; Smith and Bodamer, 2002; Mattson and Shea, 2003; Bottiglieri, 2005; Moore, 2005; Eskes, in press).

Homocystinuria is an inborn error of metabolism caused by cystathionine-β-synthase severe deficiency, leading to Hcy

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316 5573; fax: +55 51 3316 5535.

E-mail address: wyse@ufrgs.br (Angela T.S. Wyse).

accumulation in tissues. Affected patients present mental retardation, seizures and are more susceptible to heart disease and stroke (Mudd et al., 2001). Although neurological and vascular dysfunction is commonly found in homocystinuric patients, the exact mechanisms involved remain poorly understood. We have recently developed a chemically experimental model of hyperhomocysteinemia and found that rats subjected to this model present a reduction of brain Na^+, K^+ -ATPase, serum butyrylcholinesterase (BuChE) and an impairment of memory (Wyse et al., 2002; Reis et al., 2002; Streck et al., 2004; Matté et al., 2004; Stefanello et al., 2005). Furthermore, it was shown that acute hyperhomocysteinemia cause a decrease of Na^+, K^+ -ATPase activity and of the antioxidant defenses in rat hippocampus, which were prevented by Vitamins E and C pretreatment (Wyse et al., 2002). We have also shown that Hcy induces oxidative stress *in vitro* in parietal cortex, by increasing lipid peroxidation and reducing the total antioxidant defenses (Matté et al., 2004).

The present work extended previous studies from our laboratory and investigated whether folic acid pretreatment could affect the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase and BuChE activities in parietal cortex of young rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. We also evaluated here the effect of acute hyperhomocysteinemia on some parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and total thiol content in this cerebral structure in order to test whether oxidative stress could be elicited *in vivo* by acute hyperhomocysteinemia.

2. Experimental procedure

2.1. Animals and reagents

Twenty-two-day-old Wistar rats (total number of rats = 57) were obtained from the Central Animal House of the Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room. Rats had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federação das Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental and was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

All chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Drug administration procedure

Folic acid and D,L-Hcy were dissolved in 0.85% NaCl solution and buffered to pH 7.4. Animals were pretreated daily with an intraperitoneal injection of folic acid (5 mg/kg) (Lalonde et al., 1993) or saline (0.85% NaCl) from the 22th to the 28th day of age. Twelve hours after the last injection (folic acid or saline), the rats received a single subcutaneous injection of Hcy (0.6 $\mu\text{mol/g}$ of weight body) or saline and were killed by decapitation without anesthesia 1 h later (Streck et al., 2002). Serum was collected and the brain was quickly removed and parietal cortex dissected.

2.3. Tissue and homogenate preparation

For preparation of synaptic plasma membrane and determination of Na^+, K^+ -ATPase activity, the parietal cortex was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA,

pH 7.4. After homogenization, synaptic plasma membranes were prepared and the activity of Na^+, K^+ -ATPase was determined.

For BuChE activity determination, the serum was diluted in 10 volumes (1:10, v/v) of 500 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5.

For TBARS and total thiol content assays, parietal cortex was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 1.15% KCl or in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.5, containing 1 mM EDTA, respectively.

2.4. Preparation of synaptic plasma membrane from parietal cortex

Synaptic plasma membrane from parietal cortex was prepared according to the method of Jones and Matus (1974) with some modifications (Wyse et al., 1998). The homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min and the supernatant removed and centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min. The pellet was then resuspended in hypotonic buffer (5.0 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1) at 0°C for 30 min, and applied on a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 M. After centrifugation at $69,000 \times g$ for 120 min, the fraction between 0.8 and 1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

2.5. Na^+, K^+ -ATPase activity assay

The reaction mixture for Na^+, K^+ -ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl_2 , 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in a final volume of 200 μL . The reaction was initiated by ATP addition. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na^+, K^+ -ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as described by Wyse et al. (1998). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Specific enzyme activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. All samples were run in duplicate.

2.6. BuChE activity assay

BuChE activity was determined by the method of Ellman et al. (1961) with some modifications. Hydrolysis rate was measured at acetylthiocholine concentration of 0.8 mM in 1 mL assay solutions with 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 and 1.0 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Fifty microliters of rat diluted serum was added to the reaction mixture and preincubated for 3 min. The hydrolysis was monitored by formation of the thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2 min (intervals of 30 s) at 25°C . All samples were run in duplicate. Specific enzyme activity was expressed as μmol acetylthiocholine per hour per milligrams of protein.

2.7. TBARS assay

TBARS, an index of lipid peroxidation, was determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979). Briefly, 50 μL of 8.1% sodium dodecyl sulfate, 1.5 mL of 20% acetic acid solution adjusted to pH 3.5 and 1.5 mL of 0.8% aqueous solution of thiobarbituric acid were added to 500 μL of tissue homogenate in a Pyrex tube, and then heated in a boiling water bath for 60 min. After cooling with tap water, the mixture was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The organic layer was taken and the resulting pink color was determined in a spectrophotometer at 535 nm. The acid did not produce color when tested without the addition of the homogenate, demonstrating the absence of a direct reaction with thiobarbituric acid. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and each curve point was subjected to the same treatment as that of the homogenate. The results were reported as nmol of malondialdehyde per mg protein. All samples were run in triplicate.

2.8. Total thiol content assay

Total thiol content was determined using the DTNB method, as described by Aksenov and Markesbery (2001) with some modifications. Briefly, 50 μL of the sample was mixed with 980 μL of PBS, pH 7.5, containing 1 mM EDTA. The reaction was started by the addition of 30 μL of 10 mM DTNB stock solution in PBS. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance at 412 nm

was measured and the amount of TNB formed was calculated. Data were adjusted by protein content. The results were reported as nmol of TNB per mg protein. All samples were run in triplicate.

2.9. Protein determination

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

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed by Student's *t*-test or by one-way analysis of variance followed by the Duncan's multiple range test when *F*-value was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of folic acid pretreatment on Na^+, K^+ -ATPase activity in parietal cortex of hyperhomocysteinemic rats

Fig. 1 shows that acute hyperhomocysteinemia significantly reduced Na^+, K^+ -ATPase activity by approximately 40% [$F(3,15) = 11.71$; $p < 0.001$] in synaptic plasma membrane from parietal cortex of rats. However, when the rats were pretreated with folic acid during a week and 12 h later received one injection of Hcy, the activity of this enzyme was not altered as compared to the control group (saline), indicating that folic acid prevented the inhibitory effect of hyperhomocysteinemia towards Na^+, K^+ -ATPase activity. We also observed that folic acid per se did not alter Na^+, K^+ -ATPase activity.

3.2. Effect of folic acid pretreatment on BuChE activity in serum of hyperhomocysteinemic rats

Fig. 2 shows that acute hyperhomocysteinemia significantly reduced BuChE activity by approximately 21% [$F(3,14) = 9.43$; $p < 0.01$] in serum of rats. We also observed that folic acid per se did not alter BuChE activity, but prevented the inhibition of BuChE caused by hyperhomocysteinemia.

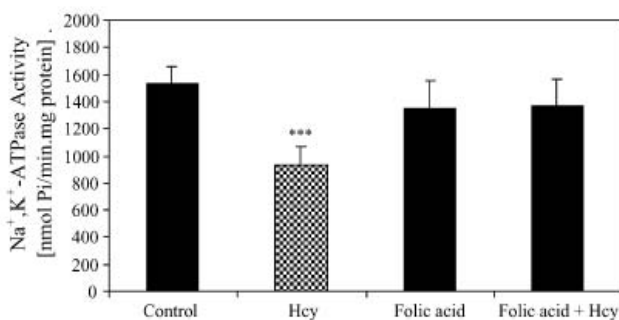


Fig. 1. Effect of folic acid pretreatment on Na^+, K^+ -ATPase activity in synaptic plasma membrane from parietal cortex of rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. Results are mean \pm S.D. for four to five independent experiments (animals) performed in triplicate. Different from control, *** $p < 0.001$ (Duncan's multiple range test). Hcy, homocysteine.

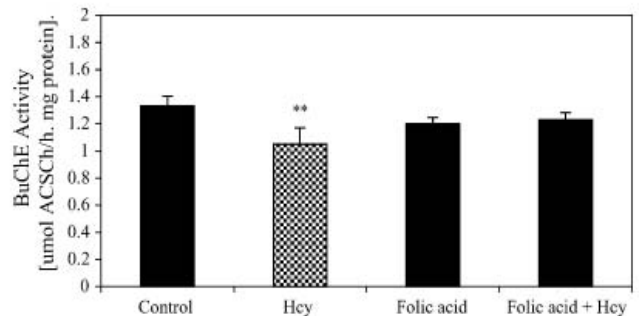


Fig. 2. Effect of folic acid pretreatment on butyrylcholinesterase (BuChE) activity in serum of rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. Results are mean \pm S.D. for four to five independent experiments (animals) performed in duplicate. Different from control, ** $p < 0.01$ (Duncan's multiple range test). Hcy, homocysteine.

3.3. Effect of hyperhomocysteinemia on TBARS and total thiol content in parietal cortex of rats

Fig. 3 shows that acute administration of Hcy did not alter TBARS values (A) [$t(8) = 0.50$; $p > 0.05$] and total thiol content (B) [$t(8) = 1.23$; $p > 0.05$] in parietal cortex of rats.

4. Discussion

Hyperhomocysteinemia is found in homocystinuria (Mudd et al., 2001) and in many pathologies involving the central nervous system, such as stroke, dementia, Parkinson's and Alzheimer's diseases (Yoo et al., 1998; Clarke et al., 1998; Kuhn et al., 1998; Eikelboom et al., 2000; Loscalzo, 2002; Mattson et al., 2002; Seshadri et al., 2002; Morris, 2003; Dwyer

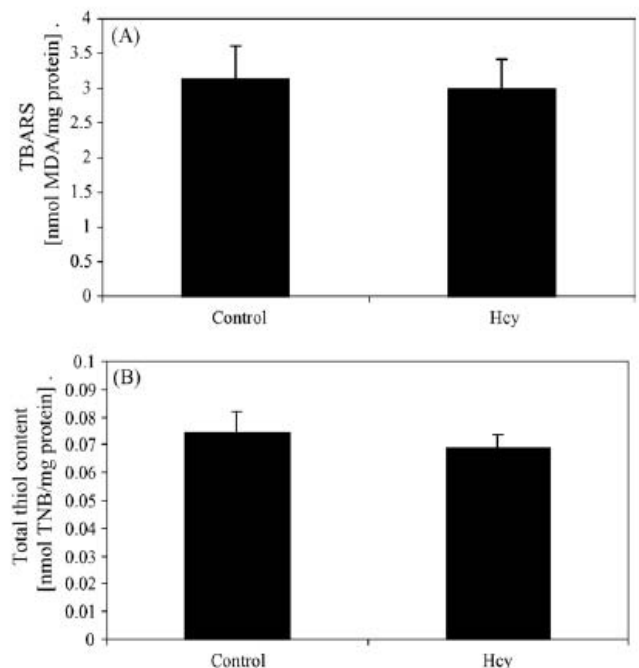


Fig. 3. Effect of acute hyperhomocysteinemia on TBARS (A) and total thiol content (B) in parietal cortex of rats. Data are mean \pm S.D. for four to five independent experiments (animals) performed in triplicate. $p > 0.05$ (Student's *t*-test). Hcy, homocysteine.

et al., 2004). On the other hand, oxidative stress is an important event that has been related to the pathogenesis of these diseases (Halliwell and Gutteridge, 1999; Halliwell, 2001; Mudd et al., 2001). In this context, we have shown that the presence of Hcy in the incubation medium induces oxidative stress (increased TBARS and decreased total antioxidant capacity) in parietal cortex and hippocampus of rats (Streck et al., 2003; Matté et al., 2004).

Recent evidence has been shown that folic acid deficiency increases the risk of stroke, as well as of Parkinson's and Alzheimer's diseases (Mattson et al., 2002) and that supplementation of this vitamin can significantly attenuate the clinical features of homocystinuria and of various neurodegenerative disorders (Kim, 1999; Mattson et al., 2002; Verhaar et al., 2002; Mattson and Shea, 2003; Bottiglieri, 2005; Moore, 2005). In this regard, some reports have shown that folic acid administration can reduce blood Hcy concentrations in humans and rats (Homocysteine Lowering Trialists Collaboration, 1998; Ryledewicz et al., 2002; Lamers et al., 2004). In addition, there is also strong evidence indicating an potent antioxidant effect of this vitamin, which is independent of its effect on Hcy metabolism (Nakano et al., 2001; Doshi et al., 2001).

In the present study, we initially evaluated the influence of folic acid pretreatment on the reduction of the activities of Na^+, K^+ -ATPase in parietal cortex and BuChE in serum of rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. We confirmed previous data showing that a single acute injection of Hcy inhibits the activities of Na^+, K^+ -ATPase (40%) and BuChE (21%) in brain and serum, respectively. We also observed that folic acid per se was ineffective to alter these enzyme activities, but it was able to prevent the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase and BuChE activities caused by Hcy administration.

We also investigated the *in vivo* effect of hyperhomocysteinemia on some parameters of oxidative stress, namely TBARS and total thiol content in rat parietal cortex since previous studies have demonstrated that Hcy added to the incubation medium (*in vitro* studies) induces oxidative stress in hippocampus and parietal cortex of rats (Streck et al., 2003; Matté et al., 2004) and that Na^+, K^+ -ATPase and cholinesterases are susceptible to free radical attack (Rauchová et al., 1999; Zhou et al., 2004). We observed that acute Hcy administration (*in vivo* studies) did not alter these parameters of oxidative stress, indicating that the reduction of Na^+, K^+ -ATPase and BuChE activities caused by acute hyperhomocysteinemia is probably not secondary to lipid peroxidation or changes in total thiol content. However, we did not measure other important parameters of oxidative stress, such as the antioxidant defenses, as well as markers of protein (carbonyl groups) and DNA (α -methylguanosine and comet assay) oxidative damage. Therefore, we cannot completely rule out that Hcy-elicited free radical attack may have exerted a role inhibiting these enzyme activities. In this regard, it has been previously shown that folic acid is capable to reduce intracellular superoxide levels independently of the reduction of Hcy levels (Shea and Rogers, 2002).

As regards to the mechanisms through which folic acid prevented the inhibitory effect of Hcy on the activities of Na^+, K^+ -ATPase and BuChE, although we did not measure brain and blood Hcy levels after folic acid administration, it is possible that pretreatment with this vitamin may have reduced Hcy levels and therefore its inhibitory effects on these enzymes activities as previously demonstrated (Achón et al., 2000; Kim et al., 2002; Mattson et al., 2002; Ho et al., 2003). Therefore, we cannot discard the possibility that folic acid pretreatment provided the cells with sufficient pool of methyl-tetrahydrofolate, a coenzyme critical in conversion of Hcy to methionine. On the other hand, folic acid may have acted through still unknown mechanisms like it does in other forms of neurodegeneration (Mattson et al., 2002; Mattson and Shea, 2003; Bottiglieri, 2005) and by inhibiting the decrease of cognition in aging (Kado et al., 2005). Further studies are therefore necessary to elucidate this matter.

On the other hand, previous results have demonstrated that various antioxidants, including melatonin, Vitamins E and C and L-NAME, are able to prevent the inhibitory effect of homocysteinemia on Na^+, K^+ -ATPase and BuChE activities, suggesting the participation of oxidative stress in such effects (Wyse et al., 2002; Stefanello et al., 2005; Delwing et al., 2005). In addition, it was found that a soy-based diet can decrease Hcy levels due to its folic acid content (Le Leu et al., 1998) and reduce blood pressure (Jenhins et al., 2002; Nagata et al., 2003). In this context, it has been demonstrated that chronic exposure to Hcy induces endothelial and vascular dysfunction, increasing the vasculature resistance and therefore causing systemic hypertension (Tyagi et al., 2005; Rodrigo et al., 2003). On the other hand, folic acid treatment has been shown to decrease Hcy levels and lower the resistance vessel reactivity (Stanger et al., 2002).

In conclusion, we found in the present study that folic acid prevents the inhibitory effect of homocysteinemia on cortical Na^+, K^+ -ATPase activity and serum BuChE activity. Considering that the activity of Na^+, K^+ -ATPase is critical for brain function since the loss of cellular K^+ may lead to neuronal damage (Schmidt-Kastner and Freund, 1991; Yu, 2003; Zou et al., 2005; Leis et al., 2005), preservation of ionic homeostasis due to an improved function of Na^+, K^+ -ATPase could contribute to the maintenance of electrical stability of the cell membrane and the consequent cell survival. Furthermore, although it is difficult to extrapolate our findings to human homocystinuria, if that is the case, the present results may be relevant to explain, at least in part, the neurological symptoms presented by homocystinuric patients. Finally, we suggest that the administration of folic acid should be considered as an adjuvant neuroprotector agent in this disease and in other neuropathological conditions presenting with hyperhomocysteinemia.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from CAPES, CNPq, Brazil and Programa de Núcleos de Excelência-Financiadora de Estudos e Projetos (PRONEX II-FINEP-Brazil).

References

- Achón, M., Alonso-Aperte, E., Reyes, L., Úbeda, N., Varela-Moreiras, G., 2000. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br. J. Nutr.* 83, 177–183.
- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus a cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 20, 141–145.
- Botez, M.I., Young, S.N., Bachevalier, J., Gauthier, S., 1982. Effect of folic acid and vitamin B12 deficiencies on 5-hydroxyindoleacetic acid in human cerebrospinal fluid. *Ann. Neurol.* 12, 479–484.
- Bottiglieri, T., 2005. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1103–1112.
- Boushey, C.J., Beresford, S.A.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G., 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *J. Am. Med. Assoc.* 274, 1049–1057.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brattstrom, L.E., Israelsson, B., Jeppsson, J.O., Hultberg, B.L., 1988. Folic acid—an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 48, 215–221.
- Chan, K.M., Delfer, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.
- Clarke, R., Smith, A.D., Jobst, K.A., Refsum, H., Sutton, L., Ueland, P.M., 1998. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 55, 1449–1455.
- Daly, L.E., Kirke, P.N., Molloy, A., Weir, D.G., Scott, J.M., 1995. Folate levels and neural tube defects: implications for prevention. *JAMA* 274, 1698–1702.
- Delwing, D., Chiarani, F., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2005. Effect of hyperprolinemia on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rats. *Amino Acids* 28, 305–308.
- Doshi, S.N., McDowell, I.F.W., Moat, S.J., Lang, D., Newcombe, R.G., Kredan, M.B., Lewis, M.J., Goodfellow, J., 2001. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1196–1202.
- Dwyer, B.E., Raina, A.K., Perry, G., Smith, M.A., 2004. Homocysteine and Alzheimer's disease: a modifiable risk? *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1471–1475.
- Eikelboom, J.W., Hankey, G.J., Anand, S.S., Lofthouse, E., Staples, N., Baker, R.I., 2000. Association between high homocyst(e)ine and ischemic stroke due to large- and small-artery disease but not other etiologic subtypes of ischemic stroke. *Stroke* 31, 1069–1075.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 21–29.
- Eskes, T.K. Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: review of the literature. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, in press.
- Fillon-Emery, N., Chango, A., Mircher, C., Barbe, F., Blehaut, H., Herbeth, B., Rosenblatt, D.S., Rethore, M.O., Lambert, D., Nicolas, J.P., 2004. Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of B vitamins and genetic polymorphisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1551–1557.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- Halliwel, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.
- Ho, P.I., Ashline, D., Dhitavat, S., Ortiz, D., Collins, S.C., Shea, T.B., Rogers, E., 2003. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol. Dis.* 14, 32–42.
- Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 1998. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 316, 894–898.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Jackson, C.J., Connelly, P.W., Parker, T., Faulkner, D., Vidgen, E., Cunnane, S.C., Leiter, L.A., Josse, R.G., 2002. Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 365–372.
- Jones, D.H., Matus, A.I., 1974. Isolation of plasma synaptic membrane from brain by combination flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 356, 276–287.
- Kado, D.M., Karlamangla, A.S., Huang, M.H., Troen, A., Rowe, J.W., Selhub, J., Seeman, T.E., 2005. Homocysteine versus the vitamins folate, B6, and B12 as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur studies of successful aging. *Am. J. Med.* 118, 161–167.
- Kim, Y.I., 1999. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J. Nutr. Biochem.* 10, 66–88.
- Kim, J.M., Lee, H., Chang, N., 2002. Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. *J. Nutr.* 132, 3418–3421.
- Kuhn, W., Roebroek, R., Blom, H., van Oppenraaij, D., Müller, T., 1998. Hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 245, 811–812.
- Lalonde, R., Joyal, C.C., Botez, M.I., 1993. Effects of folic acid and folic acid on cognitive and motor behaviors in 20-month-old rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 703–707.
- Lamers, Y., Prinz-Langenohl, R., Moser, R., Pietrzik, K., 2004. Supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate or folic acid equally reduces plasma total homocysteine concentrations in healthy women. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 473–478.
- Le Leu, R.K., McIntosh, G.H., Young, G.P., 1998. Ability of endogenous folate from soy protein isolate to maintain plasma homocysteine and hepatic DNA methylation during methyl group depletion in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 44, 457–464.
- Leis, J.A., Bekar, L.K., Walz, W., 2005. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 50, 407–416.
- Loscalzo, J., 2002. Homocysteine and dementias. *N. Engl. J. Med.* 346, 466–468.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–267.
- Matté, C., Monteiro, S.C., Calcagnotto, T., Bavaresco, C.S., Netto, C.A., Wyse, A.T.S., 2004. In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na^+K^+ -ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 185–190.
- Mattson, M.P., Kruman, I.I., Duan, W., 2002. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res. Rev.* 1, 95–111.
- Mattson, M.P., 2003. Will caloric restriction and folate protect against AD and PD? *Neurology* 60, 690–695.
- Mattson, M.P., Haberman, F., 2003. Folate and homocysteine metabolism: therapeutic targets in cardiovascular and neurodegenerative disorders. *Curr. Med. Chem.* 10, 1923–1929.
- Mattson, M.P., Shea, T.B., 2003. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 26, 137–146.
- Moore, J.L., 2005. The significance of folic acid for epilepsy patients. *Epilepsy Behav.* 7, 172–181.
- Morris, M.S., 2003. Homocysteine and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2, 425–428.
- Mudd, S.H., Levy, H.L., Skovby, F., 2001. Disorders of transsulfuration. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1279–1327.
- Nagata, C., Shimizu, H., Takami, R., Hayashi, M., Takeda, N., Yasuda, K., 2003. Soy product intake is inversely associated with serum homocysteine level in premenopausal Japanese women. *J. Nutr.* 133, 797–800.
- Nakano, E., Higgins, J.A., Powers, H.J., 2001. Folate protects against oxidative modification of human LDL. *Br. J. Nutr.* 86, 637–639.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Pogribny, I.P., Basnakian, A.G., Miller, B.J., Lopatina, N.G., Poirier, L.A., James, S.J., 1995. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. *Cancer Res.* 55, 1894–1901.
- Pogribny, I.P., Miller, B.J., James, S.J., 1997. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett.* 115, 31–38.
- Rauchová, H., Drahotová, Z., Koudelová, J., 1999. The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the

- inhibition of cerebral cortex Na^+/K^+ -ATPase activity. *Physiol. Res.* 48, 73–78.
- Reis, E.A., Zugno, A.I., Franzon, R., Tagliari, B., Matté, C., Lamers, M.L., Netto, C.A., Wyse, A.T.S., 2002. Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. *Metab. Brain Dis.* 17, 211–217.
- Rodrigo, R., Passalacqua, W., Araya, J., Orellana, M., Rivera, G., 2003. Homocysteine and essential hypertension. *J. Clin. Pharmacol.* 43, 1299–1306.
- Rydlawicz, A., Simpson, J.A., Taylor, R.J., Bond, C.M., Golden, M.H.N., 2002. The effect of folic acid supplementation on plasma homocysteine in an elderly population. *Q. J. Med.* 95, 27–35.
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Angostino, R.B., Wilson, P.W.F., Wolf, P.F., 2002. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 346, 476–483.
- Shea, T.B., Rogers, E., 2002. Folate quenches oxidative damage in brains of apolipoprotein E-deficient mice: augmentation by vitamin E. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 108, 1–6.
- Schmidt-Kastner, R., Freund, T.F., 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40, 599–636.
- Stanger, O., Semmelrock, H.J., Wonisch, W., Bos, U., Pabst, E., Wascher, T.C., 2002. Effects of folate treatment and homocysteine lowering on resistance vessel reactivity in atherosclerotic subjects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 158–162.
- Stefanello, F.M., Franzon, R., Tagliari, B., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2005. Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocysteinemia. *Metab. Brain Dis.* 20, 97–103.
- Smith, D.L., Bodamer, O.A., 2002. Practical management of combined methylmalonic aciduria and homocystinuria. *J. Child Neurol.* 17, 353–356.
- Streck, E.L., Matté, 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, 1585–1590.
- Streck, E.L., Vieira, P.S., Wannmacher, C.M.D., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2003. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab. Brain Dis.* 18, 147–154.
- Streck, E.L., Bavaresco, C.S., Netto, C.A., Wyse, A.T.S., 2004. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav. Brain Res.* 153, 377–381.
- Tyagi, N., Moshal, K.S., Ovechkin, A.V., Rodriguez, W., Steed, M., Henderson, B., Roberts, A.M., Joshua, I.G., Tyagi, S.C., 2005. Mitochondrial mechanism of oxidative stress and systemic hypertension in hyperhomocysteinemia. *J. Cell. Biochem.* 96, 665–671.
- Verhaar, M.C., Stroes, E., Rabelink, T.J., 2002. Foliates and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 6–13.
- Verhoef, P., de Groot, L.C., 2005. Dietary determinants of plasma homocysteine concentrations. *Semin. Vasc. Med.* 5, 110–123.
- Wainfan, E., Poirier, L.A., 1992. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res.* 52, 2071s–2077s.
- Wyse, A.T.S., Brusque, A.M., Silva, C.G., Streck, E.L., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 1998. Inhibition of Na^+/K^+ -ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport* 9, 1719–1721.
- Wyse, A.T.S., 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.
- Yoo, J.H., Chung, C.S., Kang, S.S., 1998. Relation of plasma homocyst(e)ine to cerebral infarction and cerebral atherosclerosis. *Stroke* 29, 2478–2483.
- Yu, S.P., 2003. Na^+/K^+ -ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1601–1609.
- Zhou, J.F., Zhou, W., Zhang, S.M., Luo, Y.E., Chen, H.H., 2004. Oxidative stress and free radical damage in patients with acute dipterex poisoning. *Biomed. Environ. Sci.* 17, 223–233.
- Zou, B., Li, Y., Deng, P., Xu, Z.C., 2005. Alterations of potassium currents in ischemia-vulnerable and ischemia-resistant neurons in the hippocampus after ischemia. *Brain Res.* 1033, 78–89.

CAPÍTULO III – RESULTADOS NÃO SUBMETIDOS A ARTIGOS

1. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento dos objetivos deste capítulo foram utilizados os seguintes métodos:

1.1. Animais e reagentes

Ratos Wistar de 6 dias de vida foram obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Os animais foram mantidos em ciclos de 12 h claro/12 h escuro em salas climatizadas com temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Os animais tinham livre acesso a água e ração protéica comercial.

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

1.2. Procedimento de indução da hiperhomocisteinemia crônica e tratamento com ácido fólico

Os ratos foram divididos em 4 grupos: controle, Hcy, ácido fólico, e Hcy combinado com ácido fólico. No grupo Hcy foi induzida a hiperhomocisteinemia crônica através da administração subcutânea de Hcy (42 - 80 mg/Kg), duas vezes ao dia com intervalo de 8 h, do 6º ao 28º dia de vida dos ratos (Streck et al., 2002a). O grupo ácido fólico recebeu uma administração intraperitoneal diária de ácido fólico (5 mg/Kg) do 6º

ao 28º dia de vida dos ratos (adaptado de Lalonde et al., 1993). O grupo Hcy combinado com ácido fólico recebeu os dois tratamentos concomitantemente. Os ratos controles receberam semelhantes volumes de solução fisiológica (NaCl 0,85%). Os ratos foram sacrificados 12 horas após a última injeção. O sangue foi obtido por punção cardíaca, com adição de 100 µL heparina (5.000 UI) para cada 1 mL de sangue total. O cérebro foi rapidamente removido e o córtex parietal foi dissecado.

1.3. Preparação da membrana plasmática sináptica de córtex parietal de ratos

Para a preparação da membrana plasmática sináptica e determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, o córtex parietal foi homogeneizado na proporção de 1:10 (massa/volume) em tampão pH 7,4 contendo sacarose 0,32 mM, HEPES 5,0 mM e EDTA 1,0 mM. As membranas plasmáticas sinápticas foram preparadas de acordo com Jones e Matus (1974) com algumas modificações (Wyse et al., 1998). Os homogeneizados foram centrifugados a 1.000 g por 10 min., o sobrenadante foi removido e centrifugado a 12.000 g por 20 min. O sedimento foi suspenso em tampão hipotônico (tampão Tris-HCl 5 mM, pH 8,1) a 0°C por 30 min., e aplicado num gradiente descontínuo de sacarose consistindo de sucessivas camadas de diferentes densidades (0,3; 0,8 e 1,0 M). Após a centrifugação de 69.000 g por 120 min., a fração entre as camadas mais densas de sacarose (0,8 e 1,0 M) foi coletada e utilizada para dosagem da atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

1.4. Dosagem da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase

A mistura reacional para dosagem da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase contém MgCl₂ 5,0 mM, NaCl 80,0 mM, KCl 20,0 mM e Tris-HCl 40,0 mM, pH 7,4, em um volume final de 200 µL. A reação foi iniciada pela adição de ATP. Os controles foram incubados nas mesmas condições, diferenciando-se pela adição de ouabaína 1,0 mM, um inibidor específico da Na⁺,K⁺-ATPase. A atividade enzimática foi calculada pela diferença entre os ensaios com e sem adição de ouabaína, como descrito por Wyse e colaboradores (1998). O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi medido pelo método de Chan e colaboradores (1986). A atividade específica da Na⁺,K⁺-ATPase foi expressa como nmol Pi liberado por min por mg de proteína. Todas as amostras foram incubadas em duplicata.

1.5. Ensaio cometa

O protocolo padrão para a realização do ensaio cometa foi adaptado de Tice e colaboradores (2001). As lâminas foram preparadas através da mistura de 5 µL de sangue total com 90 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%). A mistura (células/agarose) foi adicionada a lâminas completamente cobertas com 300 µL de agarose com ponto de fusão normal (1%). Após a solidificação, a lamínula foi gentilmente removida e as lâminas colocadas em solução de lise refrigerada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0 – 10,5 adicionada de Triton X-100 1% e dimetil sulfóxido 10%) por no mínimo 1 h e no máximo 7 dias. Posteriormente, as lâminas ficaram em tampão alcalino refrigerado (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 12,6) por 20 min. O DNA foi submetido à eletroforese por 30 min à 25 V (0,90 V/cm) e

300 mA, as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 M (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com nitrato de prata. As lâminas foram analisadas por análise cega.

Controles positivos e negativos foram utilizados para cada ensaio de eletroforese a fim de validar o procedimento. Imagens de 100 células foram, aleatoriamente, selecionadas (50 células de cada lâmina feita em duplicata) e analisadas para cada amostra. As células foram classificadas, visualmente, de acordo com o tamanho da cauda, em cinco classes, desde sem cauda (0) até cauda máxima (4), resultando em um escore de dano ao DNA único para cada amostra, e conseqüentemente para cada grupo de estudo. Portanto, o índice de dano ao DNA pode situar-se de 0 (todas as células sem cauda, 100 células x 0) até 400 (todas as células com comprimento máximo de cauda, 100 células x 4).

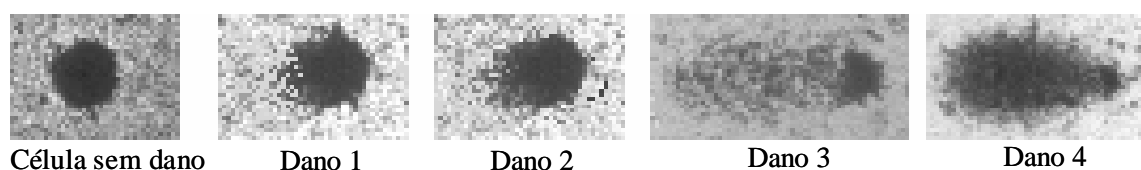


Figura 5. Caracterização do tipo de dano ao DNA verificado no ensaio Cometa.

Dano 0 = célula sem dano – Dano 4 = dano máximo ao DNA.

1.6. Determinação protéica

A determinação protéica foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

1.7. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan, quando o F teste foi significativo. As análises foram realizadas utilizando-se o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

2. RESULTADOS

2.1. Efeito do tratamento com ácido fólico sobre a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal de ratos hiperhomocisteinêmicos

A figura 6 mostra o efeito da administração crônica de Hcy sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex parietal de ratos. A Hcy reduz (30%), significativamente, a atividade dessa enzima, confirmando dados anteriores obtidos em nosso laboratório (Matté et al., 2004). O ácido fólico *per se* não altera a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, entretanto, previne a inibição desta enzima quando administrado simultaneamente com a Hcy [F(3,12) = 4,48; $p < 0,05$].

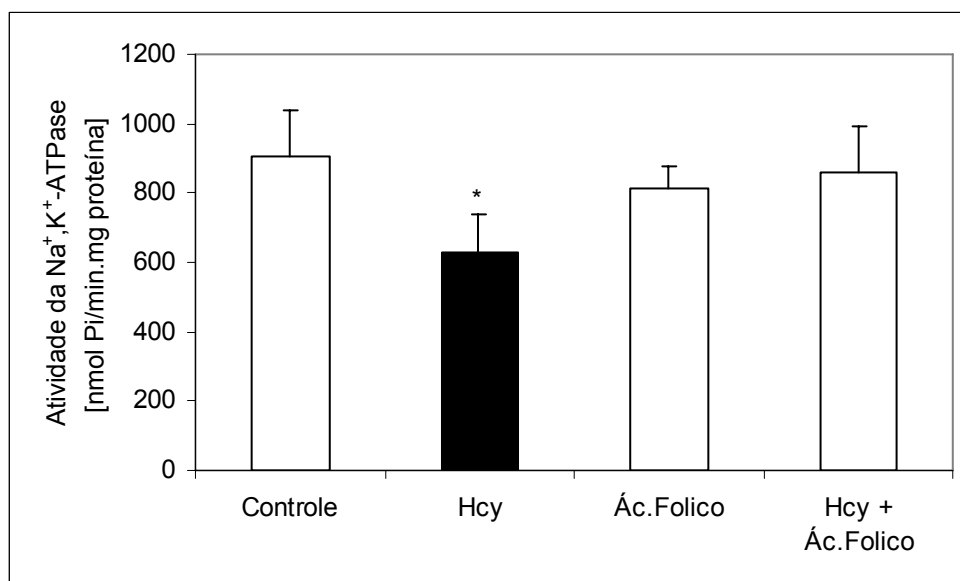


Figura 6. Efeito da administração crônica de ácido fólico sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex parietal de ratos hiperhomocisteinêmicos. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para 4 experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença do controle, * $p < 0,05$ (Teste de Duncan).

2.2. Efeito da administração crônica de ácido fólico sobre o aumento do índice de dano ao DNA em sangue total de ratos hiperhomocisteinêmicos

A figura 7 mostra o efeito da Hcy sobre o índice de dano ao DNA medido através do ensaio cometa em sangue total de ratos. Como podemos observar, a hiperhomocisteinemia crônica aumenta (170%), significativamente, o dano ao DNA quando comparado ao grupo controle. O ácido fólico *per se* não altera significativamente o índice de dano ao DNA. Os animais que receberam administrações concomitantes de Hcy e ácido fólico também não apresentaram índice de dano estatisticamente diferente do controle, indicando que o ácido fólico foi eficaz em prevenir o aumento do índice de dano ao DNA provocado pela administração crônica de Hcy [F(3,20) = 27,81; p<0,001].

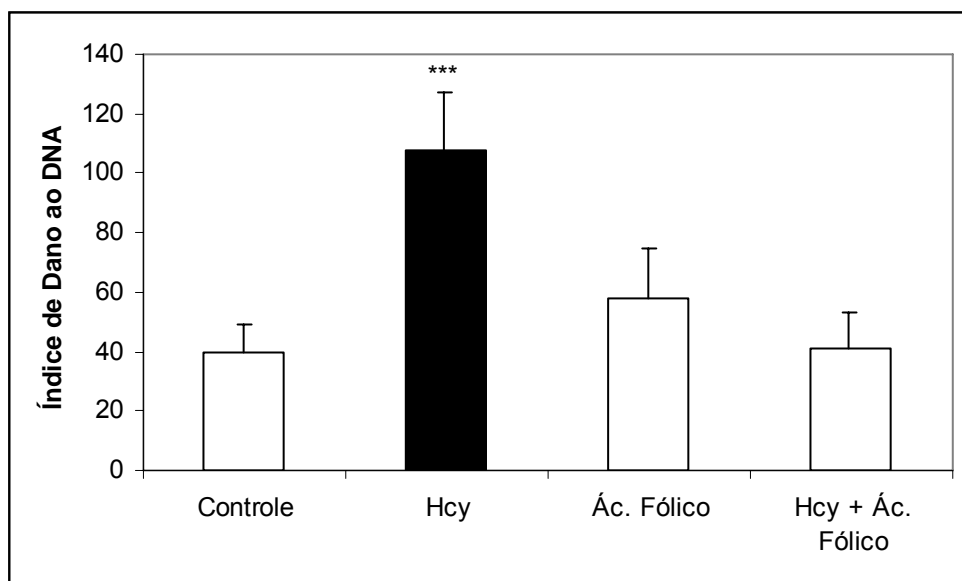


Figura 7. Efeito da administração crônica de ácido fólico sobre o índice de dano ao DNA em sangue total de ratos hiperhomocisteinêmicos. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para 5 - 7 experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença do controle, *** p<0,001 (Teste de Duncan).

IV. DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

V. CONCLUSÕES

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

VI. PERSPECTIVAS

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

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

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achón, M.; Alonso-Aperte, E.; Reyes, L.; Úbeda, N.; Varela-Moreiras, G. (2000). High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br. J. Nutr.* 83:177-183.
- Álvarez-Maqueda, M.; Bekay, R.E.; Monteseirín, J.; Gonzalo, A.; Chacón, P.; Veja, A.; Santa María, C.; Tejado, J.R.; Martín-Nieto, J.; Bedoya, F.J.; Pintado, E.; Sobrino, F. (2004). Homocysteine enhances superoxide anion release and NADPH oxidase assembly by human neutrophils. Effects on MAPK activation and neutrophil migration. *Atherosclerosis.* 172:229-238.
- Avrova, N.F.; Shestak, K.I.; Zakharova, I.O.; Sokolova, T.V.; Leontev, V.G. (1999). The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. *Neurochem. Res.* 24:1101-1106.
- Benzi, G.; Moretti, A. (1998). Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur. J. Pharmacol.* 346:1-13.
- Bottiglieri, T. (2005). Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 29:1103-1112.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brosnan, J.T.; Jacobs, R.L.; Stead, L.M.; Brosnan, M.E. (2004). Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim. Pol.* 51:405-413.

- Cavalca, V.; Cighetti, G.; Bamonti, F.; Loaldi, A.; Bortone, L.; Novembrino, C.; De Franceschi, M.; Belardinelli, R.; Guazzi, M.D. (2001). Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin. Chem.* 47:887-892.
- Chakraborty, H.; Sen, P.; Sur, A.; Chatterjee, U.; Chakrabarti, S. (2003). Age-related oxidative inactivation of Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 38:705-710.
- Chan, K.M.; Delfer, D.; Junger, K.D. (1986). A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157:375-380.
- Clarke, R.; Smith, A.D.; Jobst, K.A.; Refsum, H.; Sutton, L.; Ueland, P.M. (1998). Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 55:1449-1455.
- Culcasi, M.; Lafon-Cazal, M.; Pietri, S.; Bockaert, J. (1994). Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J. Biol. Chem.* 269:12589-12593.
- Darley-Usmar, V.; Wiseman, H.; Halliwell, B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters.* 369:131-135.
- Darvesh, S.; Hopkins, D.A.; Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:131-138.
- Das, U.N. (2003). Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition.* 19:686-692.
- Dayal, S.; Arning, E.; Bottiglieri, T.; Boger, R.H.; Sigmund, C.D.; Faraci, F.M.; Lentz, S.R. (2004). Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke.* 35:1957-1962.
- De Franchis, R.; Sperandeo, M.P.; Sebatio, G.; Andria, G. (The Italian Collaborative Study Group on Homocystinuria). (1998). Clinical aspects of cystathionine β-synthase deficiency: how wide is the spectrum? *Eur. J. Pediatr.* 157:S67-S70.

- Den Heijer, T.; Vermeer, S.E.; Clarke, R.; Oudkerk, M.; Koudstaal, P.J.; Hofman, A.; Breteler, M.M.B. (2003). Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-dement elderly. *Brain*. 126:170-175.
- Devlin, T.M. (2003). Membranas biológicas: estrutura e transporte em membranas. In: Manual de bioquímica com correlações clínicas. Estados Unidos da América: editora Edgard Blücher LTDA. Tradução da 5ª edição americana. 462-463.
- Dobrota, D.; Matejovicova, M.; Kurrela, E.G.; Boldyrev, A.A. (1999). Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19:141-149.
- Doshi, S.N.; McDowell, I.F.W.; Moat, S.J.; Lang, D.; Newcombe, R.G.; Kredan, M.B.; Lewis, M.J.; Goodfellow, J. (2001). Folate improves endothelial function in coronary artery disease. An effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1196-1202.
- Duan, W.; Ladenheim, B.; Cutler, R.G.; Kruman, I.I.; Cadet, J.L.; Mattson, M.P. (2002). Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry.* 80:101-110.
- Dudzinski, D.M.; Igarashi, J.; Greif, D.; Michel, T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:235-276. *in press.*
- Durand, P.; Prost, M.; Loreau, N.; Lussier-Cacan, S.; Blache, D. (2001). Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab. Invest.* 81: 645-672.
- Duthie, S.J.; Grant, G.; Narayanan, S. (2000). Increased uracil misincorporation in lymphocytes from folate-deficient rats. *Br. J. Cancer.* 83:1532-1537.
- Dwyer, B.E.; Raina, A.K.; Perry, G.; Smith, M.A. (2004). Homocysteine and Alzheimer's disease: a modifiable risk? *Free Radic. Biol. Med.* 36:1471-1475.

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

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

- Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. (1998). Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 316:894-898.
- Izquierdo, I.; Medina, J.H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68:285-316.
- Izquierdo, I.; Medina, J.H.; Vianna, M.R.M.; Izquierdo, L.A.; Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* 103:1-11.
- Jara-Prado, A.; Ortega-Vazquez, A.; Martinez-Ruano, L.; Rios, C.; Santamaría, A. (2003). Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotox. Res.* 5:237-243.
- Jones, D.H.; Matus, A.I. (1974). Isolation of plasma synaptic membrane from brain by combination flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta.* 356:276-287.
- Jorgensen, P.L.; Hakansson, K.O.; Karlsh, S.J.D. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65:817-849.
- Kaplan, J.H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71:511-535.
- Kim, W.K.; Pae, Y.S. (1996). Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci. Lett.* 216:117-120.
- Kim, Y.I., (1999). Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J. Nutr. Biochem.* 10:66-88.

- Kim, J.; Lee, H.; Chang, N. (2002). Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. *J. Nutr.* 132:3418-3421.
- Koning, A.B.L.; Werstuck, G.H.; Zhou, J.; Austin, R.C. (2003). Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin. Biochem.* 36:431-441.
- Kruman, I.I.; Culmsee, C.; Chan, S.L.; Kruman, Y.; Guo, Z.; Penix, L.; Mattson, M.P. (2000). Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 20: 6920-6926.
- Kruman, I.I.; Kumaravel, T.S.; Lohani, A.; Pedersen, W.A.; Cutler, R.G.; Kruman, Y.; Haughey, N.; Lee, J.; Evans, M.; Mattson, M.P. (2002). Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22:1752-1762.
- Kubova, H.; Folbergrova, J.; Mares, P. (1995). Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. *Epilepsia.* 36:750-756.
- Kuhn, W.; Roebroek, R.; Blom, H.; Van Oppenraaij, D.; Müller, T. (1998). Hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 245:811-812.
- Kurella, E.G.; Tyulina, O.V.; Boldyrev, A.A. (1999). Oxidative resistance of Na/K-ATPase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19:133-140.
- Lalonde, R.; Joyal, C.C.; Botez, M.I. (1993). Effects of folic acid and folinic acid on cognitive and motor behaviors in 20-month-old rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:703-707.
- Lamers, Y.; Prinz-Langenohl, R.; Moser, R.; Pietrzik, K. (2004). Supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate or folic acid equally reduces plasma total homocysteine concentrations in healthy women. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:473-478.

- Lees, G.J. (1993). Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience*. 54:287-322.
- Lipton, S.A.; Kim, W.K.; Choi, Y.B.; Kumar, S.; D'Emilia, D.M.; Rayudu, P.V.; Arnelle, D.R.; Stamler, J.S. (1997). Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:5923-5928.
- Loscalzo, J. (1996). The oxidative stress of hyperhomocysteinemia. *J. Clin. Invest.* 98:5-7.
- Loscalzo, J. (2002). Homocysteine and dementias. *N. Engl. J. Med.* 346:466-468.
- Mack, A.; Robitzki, A. (2000). The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5' butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog. Neurobiol.* 60:607-628.
- Matté, C.; Monteiro, S.C.; Calcagnotto, T.; Bavaresco, C.S.; Netto, C.A.; Wyse, A.T.S. (2004). In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na⁺, K⁺-ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22:185-190.
- Mattson, M.P.; Kruman, I.I.; Duan, W. (2002). Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res. Rev.* 1:95-111.
- Mattson, M.P.; Shea, T.B. (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 26:137-146.
- Moat, S.J.; Lang, D.; McDowell, I.F.W.; Clarke, Z.L.; Madhavan, A.K.; Lewis, M.J.; Goodfellow, J. (2004). Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 15:64-79.

- Morel, P.; Tallineau, C.; Pontcharraud, R.; Piriou, A.; Huguet, F. (1999). Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem. Int.* 33:531-540.
- Morris, M.S. (2003). Homocysteine and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2:425-428.
- Mudd, S.H.; Skovby, F.; Levy, H.L.; Pettigrew, K.D.; Wilcken, B.; Pyeritz, R.E.; Andria, G.; Boers, G.H.; Bromberg, I.L.; Cerone, R.; Fowler, B.; Gröbe, H.; Schmidt, H.; Schweitzer, L. (1985). The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am. J. Hum. Gen.* 37:1-31.
- Mudd, S.H.; Levy, H.L.; Skovby, F. (2001). Disorders of Transulfuration. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valled, D. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 8^a edição. New York: McGraw-Hill. 1279-1327.
- Mudd, S.H.; Braverman, N.; Pomper, M.; Tezcan, K.; Kronick, J.; Jayakar, P.; Garganta, C.; Ampola, M.G.; Levy, H.L.; McCandless, S.E.; Wiltse, H.; Stabler, S.P.; Allen, R.H.; Wagner, C. Borschel, M.W. (2003). Infantile hypermethioninemia and hyperhomocysteinemia due to high methionine intake: a diagnostic trap. *Mol. Genet. Metab.* 79:6-16.
- Nelson, E.J.; Connolly, J.; McArthur, P. (2003). Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol. Cell.* 95:3-8.
- Oikawa, S.; Murakami, K.; Kawanishi, S. (2003). Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene.* 22:3530-3538.
- Perna, A.F.; Ingrosso, D.; De Santo, N.G. (2003). Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids.* 25:409-417.
- Pintó, X.; Vilaseca, M.A.; Balcells, S.; Artuch, R.; Corbella, E.; Meco, J.F.; Vila, R.; Pujol, R.; Grinberg, D. (2005). A folate-rich diet is as effective as folic acid from

- supplements in decreasing plasma homocysteine concentrations. *Int. J. Med. Sci.* 2:58-63.
- Quadri, P.; Fragiaco, C.; Pezzati, R.; Zanda, E.; Forloni, G.; Tettamanti, M.; Lucca, U. (2004). Homocysteine, folate and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease and vascular dementia. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:114-122.
- Radi, R.; Beckman, J.S.; Bush, K.M.; Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* 266:4244-4250.
- Rauchová, H.; Drahoř, Z.; Koudelová, J. (1999). The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na^+/K^+ -ATPase activity. *Physiol. Res.* 48:73-78.
- Regland, B.; Johansson, B.V.; Grenfeldt, B.; Hjelmgren, L.T.; Medhus, M. (1995). Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 100:165-169.
- Reis, E.A.; Zugno, A.I.; Franzon, R.; Tagliari, B.; Matté, C.; Lamers, M.L.; Netto, C.A.; Wyse, A.T.S. (2002). Pretreatment with vitamins e and c prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. *Metab. Brain Dis.* 17:211-217.
- Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B.A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 269:26066-26075.
- Rytlewicz, A.; Simpson, J.A.; Taylor, R.J.; Bond, C.M.; Golden, M.H.N. (2002). The effect of folic acid supplementation on plasma homocysteine in an elderly population. *Q. J. Med.* 95:27-35.

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

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

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

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