

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Estudo bioquímico em modelo animal de hiper-homocisteínemia severa:
papel protetor do ácido acetilsalicílico**

Jeferson Scarpari Graeff

Porto Alegre, Novembro de 2011.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Estudo bioquímico em modelo animal de hiper-homocisteinemia severa:
papel protetor do ácido acetilsalicílico**

Jeferson Scarpari Graeff

Trabalho de Conclusão

da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof^a. Dr^a. Angela T. S. Wyse

Orientadora

Porto Alegre, Novembro de 2011.

*Quem passou pela vida em branca nuvem
E em plácido repouso adormeceu;
Quem não sentiu o frio da desgraça,
Quem passou pela vida e não sofreu;
Foi espectro de homem, não foi homem,
Só passou pela vida, não viveu.*

Francisco Otaviano

Agradecimentos

A Deus, por todas as possibilidades de crescimento e aprendizado que tem me proporcionado fazendo de mim um homem cada vez melhor.

À minha orientadora, Angela, por toda a dedicação, paciência e motivação para o desenvolvimento do meu trabalho, bem como para minha formação acadêmica.

Aos amigos e colegas do laboratório 36 pela amizade e companheirismo. Em especial as amigas Aline e Maira por terem me ajudado tanto na execução deste trabalho.

À minha esposa, Carla, por todo o amor, dedicação e renúncia, por estar presente em todos os momentos de aflição e incertezas, sempre me confortando e me fazendo sentir a pessoa mais especial do mundo, é graças a ela estou aqui hoje: TE AMO!

Às minhas filhas, Amanda, Giulia e Sofia, por todo amor que me dedicam, me fazendo aprender, ensinar e me mostrando o que realmente se deve dar valor na vida, são minhas verdadeiras razões de viver: AMO MUITO VOCÊS!

A meus pais, Claudete e Plínio, que de um modo ou de outro sempre fizeram o máximo que puderam por mim.

Às minhas queridas irmãs Tatiana e Karine, que mesmo de longe transmitiram muito carinho e força, e ao Jauri, por sempre estar presente a me dar conselhos sobre as questões da vida.

Aos amigos, Aline e Cristiane Matté, Tiago Marcon, Silvia e Tatiana que durante a graduação, foram pessoas que sempre pude contar, tanto em momentos de pressão quanto em momentos de alegria e principalmente pela amizade que, com certeza, será para sempre!

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Brasileira de Farmácia (Brazilian Journal of Pharmacy), apresentadas em anexo.

Estudo bioquímico em modelo animal de hiper-homocisteinemia severa: papel protetor do ácido acetilsalicílico

Jeferson Scarpari Graeff¹, Maira Jaqueline da Cunha², Aline Andréia da Cunha², Elias Turcantel² & Angela Teresinha de Souza Wyse^{3*}

¹Acadêmico de Farmácia. Laboratório de Neuroproteção e Doença Metabólica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Colaborador. Laboratório de Neuroproteção e Doença Metabólica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Professora Doutora e Orientadora. Laboratório de Neuroproteção e Doença Metabólica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Endereço para contatos: Dr. 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, Brasil. Telefone 55 51 3308 5573, Fax 55 51 3308 5535, E-mail: wyse@ufrgs.br

RESUMO

O acúmulo tecidual de homocisteína (Hcy) ocorre na homocistinúria clássica, um erro inato do metabolismo dos aminoácidos. Pacientes afetados por esta doença apresentam alterações neurológicas e cardiovasculares. Os mecanismos pelos quais a Hcy exerce os efeitos neuro e cardiotóxicos ainda não foram totalmente esclarecidos, entretanto, alguns trabalhos mostram que a hiper-homocisteïnemia crônica induz estresse oxidativo e altera parâmetros inflamatórios em cérebro e coração de ratos. Por outro lado, o ácido acetilsalicílico (AAS) apresenta ação anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do pré-tratamento com AAS sobre parâmetros de estresse oxidativo no coração de ratos submetidos à administração aguda de Hcy. Ratos Wistar de 22 dias receberam pré-tratamento com AAS (100mg/Kg) e/ou solução de bicarbonato de sódio 1,1% (controle) uma vez ao dia pela via intraperitoneal durante 7 dias; no 8º dia receberam uma única injeção subcutânea de Hcy (0,6 $\mu\text{mol/g}$ peso corporal) ou solução de bicarbonato de sódio tamponada. Uma hora após a injeção, os ratos foram mortos e o coração dissecado. Os resultados demonstraram que a administração aguda de Hcy alterou os parâmetros de estresse oxidativo, além de aumentar a atividade da superóxido dismutase e diminuir a atividade da catalase. Em contraste, não houve alteração na atividade da glutathione peroxidase. O AAS preveniu todas as alterações causadas pela Hcy sobre os parâmetros avaliados. Nossos estudos demonstram que o pré-tratamento com AAS preveniu a indução do estresse oxidativo causada pela Hcy em coração de ratos, provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes.

Palavras chave: Homocisteína. Homocistinúria. Estresse Oxidativo. Ácido acetilsalicílico.

ABSTRACT

The tissue accumulation of homocysteine (Hcy) occurs in classical homocystinuria, an inborn error of amino acid metabolism. Patients affected by this disease have neurological and cardiovascular symptoms. The mechanisms by which Hcy exerts neuro and cardiotoxic effects have not been fully clarified, however, some studies show that chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative stress parameters and inflammatory changes in rat brain and heart. On the other hand, acetylsalicylic acid (ASA) has anti-inflammatory and antioxidant. The aim of this study was to evaluate the effects of pretreatment with ASA on parameters of oxidative stress in the heart of rats subjected to acute administration of Hcy. Wistar rats received 22 days of pretreatment with ASA (100mg/kg) and / or solution of sodium bicarbonate 1.1% (control) once daily intraperitoneally for 7 days. On Day 8 they received a single subcutaneous injection of Hcy (0.6 μmol / g body weight) or sodium bicarbonate buffered solution. One hour after injection, the rats were killed and the hearts dissected. The results showed that acute administration of Hcy altered parameters of oxidative stress, and increased the activity of superoxide dismutase and lower catalase activity. In contrast, there was no change in the activity of glutathione peroxidase. ASA prevented all changes caused by Hcy on the parameters evaluated. Our studies show that pretreatment with ASA prevented the induction of oxidative stress caused by Hcy in rat heart, probably due to its antioxidant properties.

Keywords: Homocysteine. Homocystinuria. Oxidative Stress. Acetylsalicylic acid.

INTRODUÇÃO

A homocistinúria clássica é um erro inato do metabolismo de aminoácidos causada pela inibição da enzima cistationa- β -sintase (CBS), sendo caracterizada pelo aumento de homocisteína (Hcy) e metionina no organismo (MUDD *et al.*, 2001).

O aumento nos níveis de Hcy tem sido considerado um fator de risco para doenças cardiovasculares (MUDD *et al.*, 2001). As alterações vasculares causadas pela hiperhomocisteinemia têm sido relacionadas com o crescimento da musculatura lisa vascular, adesividade plaquetária e ativação da cascata da coagulação (DURAND *et al.*, 1993). Acredita-se que um dos mecanismos envolvidos nas alterações causadas pela Hcy seja o estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação de espécies oxidantes e os compostos antioxidantes endógenos, gerando um ambiente propício à ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1991). Estudos anteriores demonstraram que a administração crônica de Hcy altera parâmetros de estresse oxidativo no coração de ratos (KOLLING *et al.*, 2011), podendo estar envolvida com a alteração de enzimas importantes do músculo cardíaco (REDON *et al.*, 2006; YILMAZ *et al.*, 2006).

O ácido acetilsalicílico (AAS), ácido fraco, pertencente à classe dos salicilatos, possui ação antipirética, analgésica e anti-inflamatória, além de apresentar atividade antioxidante (FUCHS & WANNMACHER, 2004; RENNA *et al.*, 2009). Esse fármaco é relativamente insolúvel em solução aquosa, porém seus sais de sódio e de cálcio são prontamente solúveis. Sua hidrólise ocorre sob a ação de esterases no plasma e nos tecidos produzindo o salicilato, seu tempo de meia vida plasmática é de 15 minutos, porém a duração de sua ação está relacionada à sua ligação irreversível com as enzimas ciclooxigenases, acetilando-as covalentemente. Essas isoenzimas participam do metabolismo do ácido araquidônico, promovendo o bloqueio da síntese de tromboxanos e evitando a agregação plaquetária (FUCHS & WANNMACHER 2004; MONTEIRO *et al.*, 2008; RANG *et al.*, 2007).

Considerando que pacientes com hiper-homocisteinemia severa desenvolvem arteriosclerose e apresentam disfunção cardíaca precoce, e que o estresse oxidativo parece estar relacionado com alterações vasculares, delineamos este estudo com o objetivo de investigar o possível efeito protetor do AAS sobre o estresse oxidativo em coração de ratos submetidos ao modelo agudo de hiper-homocisteinemia severa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Ratos Wistar (22 dias de idade) de ambos os sexos, 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 tinham livre acesso à água e a alimentação padrão livre com ciclo de 12 h claro-escuro em salas climatizadas ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação da Sociedade Brasileira para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da UFRGS.

Administração aguda de Hcy e o tratamento com AAS

Os animais foram randomizados em quatro grupos: grupo 1: (Controle), grupo 2 (Hcy), grupo 3 (Hcy + AAS) e grupo 4 (AAS). Sendo submetidos a um pré tratamento com AAS (100 mg/Kg de peso corporal) do 22º ao 28º dias de vida, os animais controle receberam uma solução de bicarbonato de sódio 1,1%, tamponado a pH 7,4 (SAAD-HOSSNE *et. al.* 2004). A administração foi realizada pela via intraperitoneal uma vez ao dia. Aos 29 dias de vida receberam uma única injeção subcutânea de Hcy (0,6 $\mu\text{mol/g}$ peso corporal) (STRECK *et al.*, 2003). Os animais do grupo controle receberam solução de bicarbonato de sódio 1,1% no mesmo volume que os animais tratados com AAS e Hcy. Os ratos foram mortos por decapitação 1h após a injeção de Hcy e o coração foi dissecado para a realização das análises bioquímicas.

Preparação Tecidual

O coração foi homogeneizado 1:10 (p/v) em tampão fosfato de sódio 20mM contendo KCl 140mM, pH 7,4. As amostras foram centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos a 4°C , para descartar núcleos e restos celulares. O sedimento foi descartado e o sobrenadante reservado para a realização dos ensaios bioquímicos.

Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

TBARS é uma medida para determinar a peroxidação lipídica, é uma técnica na qual o tecido homogeneizado é submetido à reação do ácido tricloroacético 20% e ácido tiobarbitúrico 0,8%, sendo aquecido em banho-maria por 60 min., resultando um composto róseo (OHKAWA *et al.*, 1979). A TBARS foram determinadas pela absorvância a 535 nm e os resultados quantificados como nmol de malonaldeído por mg de proteína.

Oxidação do 2', 7' diclorofluoresceína (DCFH)

A oxidação da 2',7' diclorofluoresceína (H₂DCF) é um método de determinação indireta de espécies reativas. O ensaio baseia-se na conversão do DCFH-DA em diclorofluoresceína (DCF) na presença de espécies reativas (LEBEL *et al.*, 1992). O composto fluorescente formado foi determinado em 480 nm na fase de excitação e 525 nm na fase de emissão. Os resultados foram expressos em nmol / mg de proteína.

Conteúdo de carbonilas

O conteúdo de proteína carbonilada foi determinado pela reação de grupos carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona (NAKAMURA & GOTO, 1996). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Determinação da Atividade Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada em leitora Spectramax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analítica Technologies, Sunnyvale, Califórnia, EUA). Esse método é baseado na capacidade de auto-oxidação do pirogalol (MARKLUND, 1985). É um processo altamente dependente de superóxido (O₂), sendo este, substrato para a SOD. Desde modo, a inibição da auto-oxidação desse composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente medida em espectrofotômetro a 420 nm. Para tanto, foi realizada uma curva de calibração com SOD purificada como padrão, com o objetivo de calcular a atividade da SOD nas amostras. Assim, 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol é definida como uma unidade de SOD, e a atividade específica é representada por unidades/mg de proteína.

Determinação da Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada em leitora Spectramax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analítica Technologies, Sunnyvale, Califórnia, EUA), avaliando o decaimento da

concentração do H₂O₂ a 240 nm, inserido em um meio contendo 20 mM de H₂O₂, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 0,1-0,3 mg de proteína / ml (AEBI, 1984). Sendo que uma unidade de CAT é definida como um μmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto, e a atividade específica é calculada como Unidade CAT/mg proteína.

Determinação da Atividade da Glutationa peroxidase (GPX)

A atividade da GPx foi determinada usando terc-butil-hidroperóxido como substrato. O desaparecimento do NADPH foi monitorado a 340 nm em espectrofotômetro com controle de temperatura (WENDEL, 1981). Assim, a atividade da GPx é mensurada como unidade por miligramas de proteína.

Determinação dos níveis de Nitrito

Os níveis de nitrito foram mensurados através da reação de Griess, utilizando 100 μL do sobrenadante do coração solubilizado em 100 μL do reagente de Griess (1:1 de sulfanilamida 1% em 5% de ácido fosfórico e dicloridrato naftiletilediamina 0,1% em água) e incubados em placas de 96 poços por 10 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas em comprimento de onda de 543 nm. A concentração de nitrito foi calculada usando padrões de nitrito de sódio e expressa em μmol/mg proteína. (GREEN *et al.* 1982).

Dosagem de proteínas

A determinação das proteínas totais foi realizada através de método colorimétrico de utilizando albumina bovina como padrão (LOWRY *et al.*, 1951).

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey quando o valor F foi significativo, conforme indicado na legenda. Todas as análises foram realizadas utilizando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Inicialmente, nós investigamos o efeito da administração aguda de Hcy e/ou pré-tratamento com AAS sobre os níveis de TBARS. A Figura 1 mostra que a administração aguda de Hcy aumentou significativamente os níveis de TBARS no coração de ratos [F (3,20) = 7,021; p<0,01]. O tratamento com AAS não teve efeito per se, entretanto preveniu o aumento nos níveis de TBARS causado pela administração aguda de Hcy.

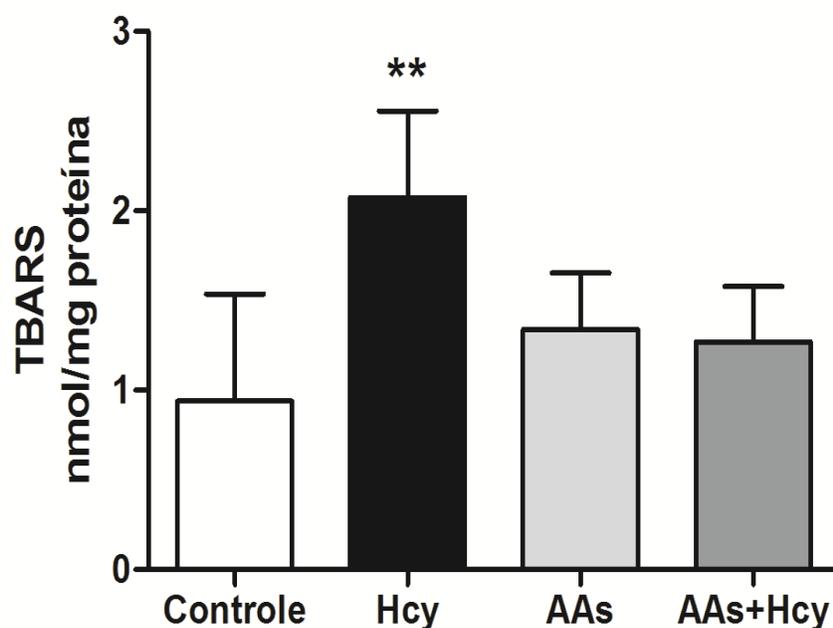


Figura 1: Efeito da administração aguda de Hcy e/ou tratamento com AAS sobre os níveis de TBARS em coração de ratos. Os dados são expressos como média \pm DP para 6 animais por grupo. **p<0,01 (ANOVA de uma via, Post Hoc Teste Tukey). Hcy: homocisteína; AAS: Ácido acetilsalicílico.

O efeito da administração de Hcy e/ou AAS sobre os níveis de espécies reativas no coração de ratos também foi avaliado. A Figura 2 mostra que a Hcy aumentou significativamente os níveis de espécies reativas quando comparado ao grupo controle [$F(3,20) = 7,326$; $p < 0,01$]. O AAS foi eficaz prevenindo a formação de espécies reativas causada pela administração aguda de Hcy.

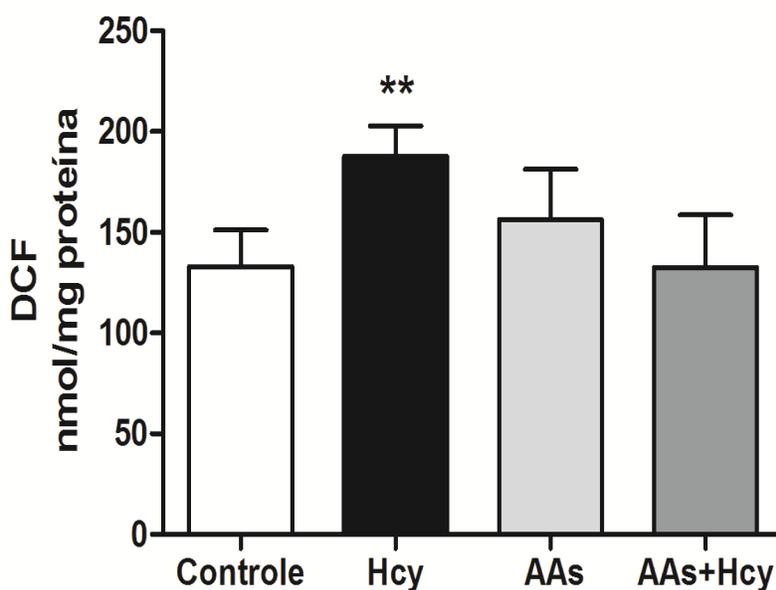


Figura 2: Efeito da administração aguda de Hcy e/ou tratamento com AAS sobre os níveis de DCF em coração de ratos. Os dados são expressos como média \pm DP para 6 animais por grupo. ** $p < 0,01$ (ANOVA de uma via, Post Hoc Teste Tukey). Hcy: homocisteína; AAS: Ácido acetilsalicílico.

Também avaliamos o efeito da Hcy e/ou AAS sobre o conteúdo de carbonilas. A Figura 3 mostra que a administração aguda de Hcy aumentou significativamente o conteúdo de carbonilas [F (3,20) = 4,740; p<0,05]. O AAS per se não alterou esse parâmetro, porém foi eficaz prevenindo o aumento do conteúdo de carbonilas causado pela administração aguda de Hcy.

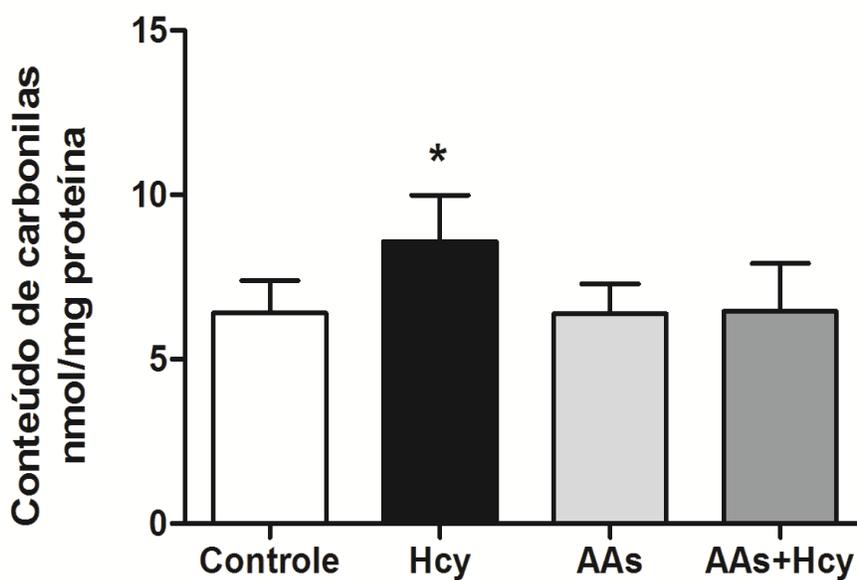


Figura 3: Efeito da administração aguda de Hcy e/ou tratamento com AAS sobre os níveis de carbonilas em coração de ratos. Os dados são expressos como média \pm DP para 6 animais por grupo. *p<0,05 (ANOVA de uma via, Post Hoc Teste Tukey). Hcy: homocisteína; AAS: Ácido acetilsalicílico.

Em seguida verificamos os efeitos da administração aguda de Hcy e/ou AAS sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. A Figura 4 mostra que a Hcy aumentou significativamente a atividade de SOD (A) [F (3,20) = 9,67; p<0,05], diminuiu a atividade da CAT (B) [F (3,20) = 9,50; p<0,01] e não promoveu alteração significativa na atividade da GPx (C) [F (3,20) = 4,39; p>0,05] em coração da ratos. O AAS per se não alterou as atividades dessas enzimas, no entanto preveniu as alterações causadas pela Hcy sobre as atividades da SOD e CAT. A Hcy não alterou a GPx, mas podemos observar que os animais submetidos ao pré-tratamento com AAS e administração aguda de Hcy tiveram uma diminuição significativa na atividade da GPx [F (3,20) = 4,39; p<0,05].

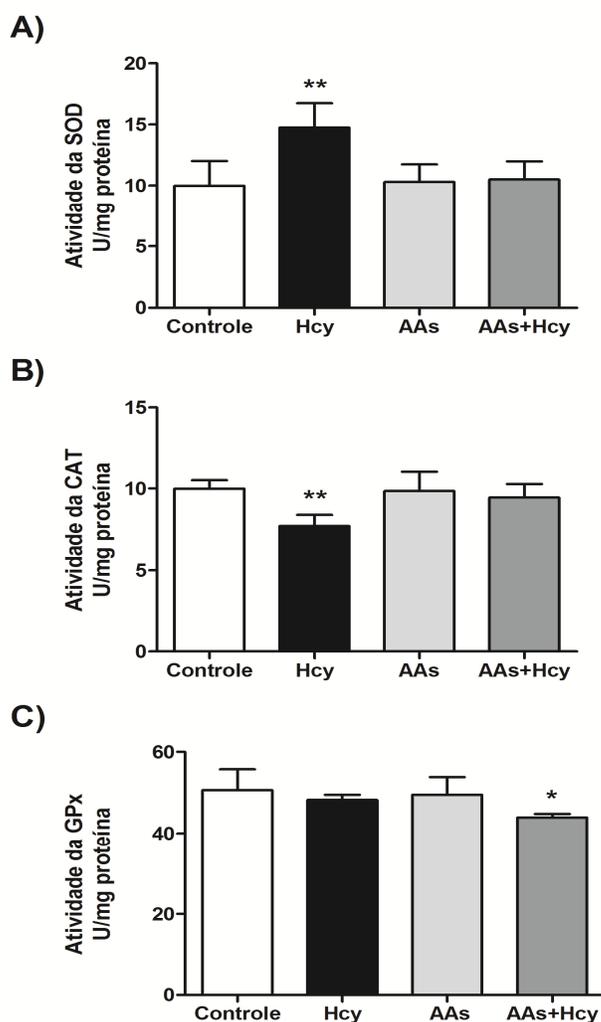


Figura 4: Efeito da administração aguda de Hcy e/ou tratamento com AAS sobre a atividade da SOD (A); CAT (B); GPx (C) em coração de ratos; Os dados são expressos como média \pm DP para 6 animais por grupo. *p<0,05 **p<0,01 (ANOVA de uma via, Post Hoc Teste Tukey). Hcy: homocisteína; AAS: Ácido acetilsalicílico; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase.

Finalmente, avaliamos o efeito da administração de Hcy e/ou AAS sobre os níveis de nitrito. A Figura 5 mostra que a Hcy aumentou significativamente os níveis de nitritos no coração de ratos [$F(3,20) = 12,577$; $p < 0,01$]. A administração de AAS per se, não alterou os níveis de nitritos, mas foi capaz de prevenir o efeito causado pela Hcy.

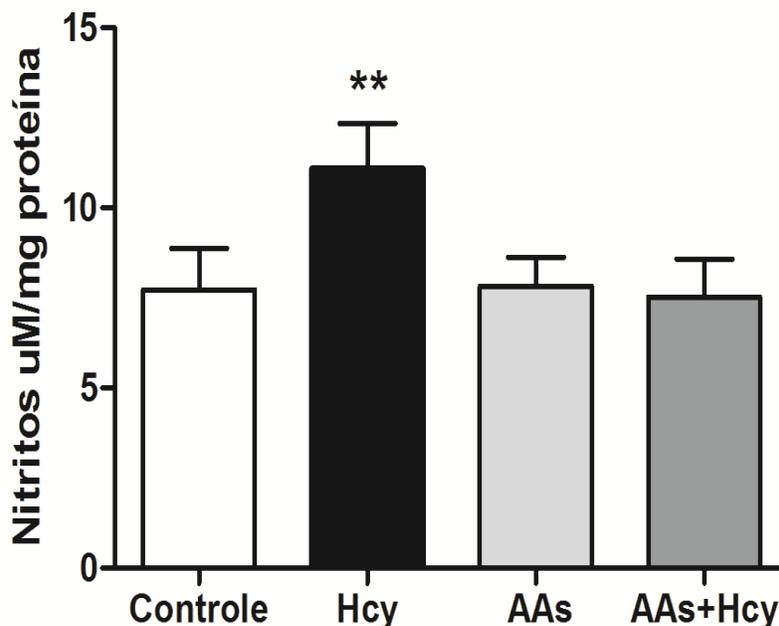


Figura 5: Efeito da administração aguda de Hcy e/ou tratamento com AAS sobre os níveis de nitritos em coração de ratos. Os dados são expressos como média \pm DP para 6 animais por grupo. ** $p < 0,01$ (ANOVA de uma via, Post Hoc Teste Tukey). Hcy: homocisteína; AAS: Ácido acetilsalicílico.

DISCUSSÃO

A hiper-homocisteinemia severa tem sido relacionada a doenças cardiovasculares e arterioescleróticas (MUDD *et al.* 2001). Estudos mostram que a administração crônica de Hcy em concentrações similares àsquelas encontradas em plasma de pacientes com homocistinúria, induz estresse oxidativo em coração de ratos (KOLLING *et al.*, 2011). O AAS apresenta ações anti-inflamatória e antioxidante (FUCHS & WANNMACHER 2004; RIBEIRO, 2008; RENNA *et al.*, 2009). Este estudo avaliou a ação desse fármaco sobre os efeitos causados pela administração aguda de Hcy sobre parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos,

utilizando o modelo experimental agudo de hiper-homocisteinemia severa desenvolvido em nosso laboratório (STRECK *et al.*, 2002; WYSE *et al.*, 2002), no qual concentrações desse aminoácido atingiram valores semelhantes aos encontrados em portadores de homocistinúria (MUDD *et al.* 2001). No presente estudo foi realizado um pré-tratamento de sete dias (22º ao 28º dia de vida) com AAS, no 29º dia de vida pós-natal, os animais receberam uma única dose de Hcy como mencionado anteriormente na descrição do tratamento.

Nossos resultados mostraram que houve um aumento significativo dos níveis de TBARS em ratos submetidos à administração aguda de Hcy, sugerindo a indução da lipoperoxidação e possivelmente ocasionando dano oxidativo ao miocárdio (MENDES, 2009; KOLLING *et al.*, 2011). A oxidação lipídica está relacionada às etapas iniciais de disfunções cardiovasculares, acarretando processos inflamatórios, aumento da expressão de moléculas de adesão as células endoteliais, produção de proteína quimioatraente a monócitos-1 (MCP-1) e efeito quimiotático direto (FAN e WATANABE, 2003). Além dos níveis de TBARS, nossos resultados demonstraram um aumento significativo nas concentrações de carbonilas, que determina dano oxidativo às proteínas (MENDES, 2009). Nossos resultados também mostraram um aumento do nível de espécies reativas, sendo estes resultados condizentes aos encontrados na literatura científica (KOLLING *et al.*, 2011).

Além das espécies reativas, houve alteração na atividade das enzimas antioxidantes, pois a auto-oxidação da Hcy gera compostos radicalares, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, que agem como estressores. A atividade da SOD foi significativamente aumentada enquanto que a atividade da CAT foi diminuída. Por outro lado, a administração de Hcy não promoveu alteração na atividade da GPx. A partir desses achados podemos sugerir um mecanismo adaptativo ocasionado pelo estresse oxidativo gerado pela administração de Hcy (MATTE *et al.* 2009).

No presente estudo nós, também, demonstramos um aumento nos níveis de nitritos em animais submetidos à administração de Hcy. Identificamos o aumento de nitritos, este fator pode estar relacionado com a ativação de mecanismos pró-inflamatórios, como as citocinas (BILATE, 2007; CUNHA *et al.* 2010). Quando há uma alteração nos níveis das espécies reativas de nitrogênio no coração, as funções cardíacas ficam comprometidas, alterando o tônus de vasos coronários e mecanismos de angiogênese, trombogenicidade e respiração celular (SMITH *et al.* 2007).

Demonstramos que o AAS previne o estresse oxidativo induzido pela administração aguda de Hcy, sendo que os níveis de TBARS, conteúdo de carbonilas e os níveis de espécies reativas se mantiveram semelhantes aos níveis do grupo controle, da mesma forma ocorreu com as enzimas antioxidantes (SOD e CAT), sendo este resultado reforçado por estudos anteriores que relatam as propriedades antioxidantes deste fármaco (WU *et al.* 2002), tendo como possíveis mecanismos de ação a capacidade de retirar íons ferro do meio (OBERLE *et al.*, 1998), como *scavenger* das espécies reativas como o óxido nítrico (ASANUMA *et al.*, 2001) e através da redução da atividade de NADPH oxidase (RENNA *et al.*, 2009). A diminuição da atividade da glutathiona peroxidase, no grupo Hcy+AAS foi um resultado inesperado, visto que todos os demais parâmetros direcionam para um mecanismo de proteção oxidativa, tornando necessária a realização de novos estudos para a elucidação desse fato. Também demonstramos uma redução dos níveis de nitritos, no grupo tratado com AAS; esses resultados estão de acordo com a literatura científica, a qual relata que elevadas concentrações de AAS, apresentam a capacidade de inibir a produção de nitritos e diminuir a atividade enzimática da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) produzida por citocinas (FARIVAR *et al.*, 1996).

O processo inflamatório é uma resposta do organismo contra infecções e injúria tecidual. Assim, há o envolvimento de diversos mediadores que participam da resposta inflamatória, tais como as quimiocinas, tromboxanos, prostaglandinas e citocinas (BILATE, 2007). Nesse contexto sugerimos que os mecanismos protetores do AAS estão relacionados com sua capacidade de reagir com radicais hidroxilas e possivelmente com seu perfil anti-inflamatório, visto que estudos anteriores demonstraram que elevados níveis de Hcy promovem resposta inflamatória, com o aumento significativo de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e quimiocinas CCL2 (MCP-1) (CUNHA *et al.*, 2010), além de agir como potente agente oxidante e induzir a produção de espécies reativas, durante a sua auto-oxidação (FARACI & LENTZ, 2004). Desse modo, devido à presença de células anti-inflamatórias, e sabendo que estas promovem a produção de espécies reativas, há a possibilidade da ação sinérgica desses dois fatores no desenvolvimento de patologias (NEVES *et al.* 2008).

Em conclusão, a administração aguda de Hcy promoveu estresse oxidativo no coração de ratos, observado pelo aumento da lipoperoxidação, da oxidação de proteínas, dos níveis de espécies reativas e nitritos. Além disso, os altos níveis de Hcy causaram um distúrbio nas defesas antioxidantes enzimáticas. O pré-tratamento de AAS preveniu os efeitos causados pela Hcy com a exceção da GPx. Acreditamos que esse efeito seja devido ao sinergismo das

propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que esse fármaco possui, entretanto, mais estudos são necessários para avaliar outros efeitos do AAS sobre as alterações causadas pela Hcy e a possibilidade da sua utilização em pacientes homocistinúricos.

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. **Catalase in vitro.** *Method Enzymol.* 105: 121–126, 1984.
- ASANUMA, M.; NISHIBAYASHI, S.; MIYAZAKI, I.; KOHNO M.; OGAWA N. **Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals.** *J. Neurochem.* 76: 1895–1904, 2001.
- BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *T. Reumat. Clín.*, 8: 47-51, 2007.
- CUNHA, A.A.; FERREIRA, A.G.K.; WYSE, A.T.S. **Increased inflammatory markers in brain and blood of rats subjected to acute homocysteine administration.** *Metab. Brain Dis.* 25: 199–206, 2010.
- DURAND, P.; PROST, M.; BANCHE, D. **Prothrombotic effects of folic-acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased N-3 polyunsaturated fatty acids.** *Atherosclerosis.* 121: 231–43, 1993.
- FAN, J.; WATANABE, T. **Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis.** *J. Atheroscler. Thromb.* 10: 63-71, 2003.
- FARACI, F.M. & LENTZ, S.R. **Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction.** *Stroke.* 35: 345-347, 2004.

FARIVAR R.S.; CHOBANIAN A.V.; BRECHER P. **Salicylate or Aspirin Inhibits the Induction of the Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Cardiac Fibroblasts.** *Circ. Res.* 78:759-768, 1996.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica fundamentos de terapêutica racional.** 3º ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. Cap. 25, 413 - 419.

GREEN L.C.; WAGNER D.A.; GLOGOWSKI J.; SKIPPER P.L.; WISHNOK J.S.; TANNENBAUM S.R. **Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids.** *Anal Biochem.* 126: 131–138, 1982.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** Oxford. Claredon press, 1991. 543 p.

KOLLING J.; SCHERER E.B.S.; CUNHA, A.A.; CUNHA M.J.; WYSE A.T.S. **Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid.** *Cardiovasc. Toxicol.* 11: 67-73, 2011.

LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. **Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.** *Chem. Res. Toxicol.* 5: 227-311, 1992.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL R.J. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.*, 193: 265–267, 1951.

MATTÉ, C.; MACKEDANZ, V.; STEFANELLO, F.M.; SCHERER, E.B.; ANDREAZZA, A.C.; ZANOTTO, C.; MORO, A.M.; GARCIA, S.C.; GONÇALVES, C.A.; ERDTMANN, B.; SALVADOR, M.; WYSE, A.T.S. **Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid.** *Neurochem. Internat.* 54: 7-13, 2009.

MARKLUND, S.L. **Pyrogallol autoxidation.** In: Greenwald RA (ed) **Handbook for oxygen radical research.** *CRC Press.* 243–247, 1985.

MENDES, R.H. **Aspectos da morfofuncionalidade cardiovascular, variabilidade cardíaca e do estresse oxidativo em diferentes modelos experimentais de hiper-homocisteinemia.** 2009. 127 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADE W. H. **Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs).** *T. Reumat. Clín.* 2: 54 – 63, 2008.

MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; SKOVBY, F. **Disorders of transsulfuration.** In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**, McGraw-Hill, New York, 2: 1279–1327, 2001.

NAKAMURA, A.; GOTO, S. **Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis.** *J. Biochem.* 119(4): 768-774, 1996.

NEVES P. L. **Inflamação na doença renal crônica.** 2008. 326 p. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa. Lisboa.

OBERLE, S.; POLTE, T. ABATE, A.; PODHAISKY, H.; SCHROEDER, H.; **Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cell: a novel antioxidant pathway.** *Circ. Res.* 82: 1016–1020, 1998.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Anal Biochem.* 95: 351–8, 1979.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K.; Flower R.J. **Farmacologia.** 6^o ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2007. cap. 14, 232 - 236.

REDON, J.; CEA-CALVO, L.; LOZANO, J.V.; FERNANDEZ-PEREZ, C.; NAVARRO, J.; BONET, A. **Kidney function and cardiovascular disease in the hypertensive population: the ERIC-HTA study.** *J. Hypertens* 24: 663-9, 2006.

RENNA N.F.; VAZQUEZ M.A.; LAMA M.C.; GONZÁLEZ E.S.; MIATELLO R.M. **Effect Of Chronic Aspirin Administration On An Experimental Model Of Metabolic Syndrome.** *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36: 162–168, 2009.

RIBEIRO V.B. **Efeito do ácido acetilsalicílico sobre as atividades nucleotídicas em linfócitos e soros de ratos submetidos ao modelo tumoral de Walker 256.** 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em bioquímica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SAAD-HOSSNE, R.; PRADO, R.G.; SAAD-HOSSNE, W. **Efeito da solução de ácido acetilsalicílico e de ácido acético em fígado de coelhos.** *Acta Cirurg. Bras.*, 19: 667-686, 2004.

SMITH, C.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, J. **Marks basic medical biochemistry : a clinical approach**. 2° ed., Porto Alegre, Artmed, 2007 cap. 21, 327 - 340.

STRECK, E.L.; MATTÉ, C.; VIEIRA, P.S.; ROMBALDI, F.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. **Reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia**. *Neurochem. Res.* 27: 1585-1590, 2002.

STRECK, E.L., VIEIRA, P.S., WANNMACHER, C.M.D., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. **In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus**. *Metab. Brain Dis.* 18: 147–154, 2003.

WENDEL, A. **Glutathione peroxidase**. *Methods Enzymol.*, 77: 325–332, 1981.

WU, R.; LAMONTAGNE, D.; DE CHAMPLAIN, J. **Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and hypertensive rats**. *Circulation*. 105: 387-92, 2002.

WYSE, A.T.S.; ZUGNO, A.I.; STRECK, E.L.; MATTÉ, C.; CALCAGNOTTO, T.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M. **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: 1677–1681, 2002.

YILMAZ, M.I.; SAGLAM, M.; CAGLAR, K.; CAKIR, E.; SONMEZ, A.; OZGURTAS, T. **The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine**. *Am. J. Kidney Dis.* 47: 42-50, 2006.

ANEXO

Revista Brasileira de Farmácia (Brazilian Journal of Pharmacy)

A Revista Brasileira de Farmácia (Brazilian Journal of Pharmacy) é um periódico, da Associação Brasileira de Farmacêuticos, de publicação trimestral, cuja missão é publicar trabalhos originais de autores brasileiros e estrangeiros relativos às Ciências Farmacêuticas e áreas afins.

CRITÉRIOS PARA PREPARAÇÃO DOS MANUSCRITOS:

Aceita-se para análise manuscritos originais nos idiomas português, espanhol e inglês, nos seguintes formatos:

(a) Artigo Original: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa científica e concluída, segundo a metodologia científica, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Os manuscritos deverão seguir a seguinte estrutura:

Introdução: apresentar o problema de estudo, destacar sua importância e lacunas de conhecimento, com revisão da literatura; incluir objetivos e outros elementos necessários para situar o tema da pesquisa.

Material e métodos: incluir de forma objetiva e completa a natureza/tipo do estudo; dados sobre o local onde foi realizada a pesquisa; população/sujeitos do estudo e seus critérios de seleção; material; equipamentos; procedimentos técnicos e métodos adotados para a coleta de dados; tratamento estatístico/categorização dos dados; informar a data e o número do protocolo da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa ou pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, para todos os trabalhos envolvendo estudos com humanos ou animais, respectivamente. Uma cópia assinada desse documento (aprovação pelo CEP) deverá ser encaminhada por correio eletrônico.

Resultados e discussão: devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em seqüência lógica, utilizando ilustrações (figuras e tabelas) quando necessário. Deve-se comparar com informações da literatura sobre o tema ressaltando-se aspectos novos e/ou fundamentais, as limitações do estudo e a indicação de novas pesquisas.

Conclusões: apresentar considerações significativas fundamentadas nos resultados encontrados e vinculadas aos objetivos do estudo.

Os manuscritos deverão ser escritos preferencialmente na ortografia adotada no Brasil em aplicativos compatíveis com o *Microsoft Word*. O manuscrito deverá ser formatado em A4, com margens de 2,5 cm, espaçamento de 1,5 cm, na fonte *Times New Roman*, tamanho 12, com páginas numeradas a partir do título até as referências e 15 páginas no máximo (não contabilizado as ilustrações).

Deve-se adotar no texto apenas as abreviações padronizadas. A primeira citação da abreviatura entre parênteses deve ser precedida da expressão correspondente por extenso. O recurso de itálico deverá ser adotado apenas para destacar partes importantes do texto, como por exemplo, citações *ipsis literis* de autores no texto do manuscrito, partes de depoimentos, entrevistas transcritas, nomes científicos de organismos vivos e termos estrangeiros.

Todos os manuscritos deverão ser submetidos **exclusivamente** através do e-mail: revista@abf.org.br. Os autores deverão informar a área de concentração ([Apêndice 1](#)), a categoria do manuscrito (artigo original, artigo de revisão, relato de experiência, biografia, assunto geral ou editorial); apresentar carta de encaminhamento ao editor ([Apêndice 2](#)) e declaração de originalidade e cessão de direitos autorais ([Apêndice 3](#)).

É responsabilidade dos autores reconhecerem e informar ao Conselho Editorial a existência de conflitos de interesse que possam exercer qualquer influência em seu manuscrito. Desta forma, as relações financeiras ou de qualquer outra ordem deverão ser comunicadas por cada um dos autores em declarações individuais ([Apêndice 4](#)).

No processo de submissão, os manuscritos originais deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos na seqüência: Título, Autores, Endereço, Resumo, Palavras-chave, Abstract, *Keywords*, Introdução*, Material e Métodos*, Resultados e Discussão*, Conclusão*, Agradecimentos* (Opcional) e Referências*. Esses itens* deverão ser digitados em letras maiúsculas, na fonte *Times New Roman*, tamanho 12, centralizado, em negrito e não deverão ser numerados.

O título, com no máximo vinte palavras, deverá ser conciso, informativo e digitado em negrito com letras minúsculas, na fonte *Times New Roman*, tamanho 14, centralizado, com exceção da primeira letra, dos nomes próprios e/ou científicos. A um espaço abaixo do título, centralizado, separados por vírgula deve-se inserir os nomes completos dos autores, por extenso, com letras minúsculas com exceção da primeira de cada nome. O último autor deverá estar separado dos demais pelo símbolo &. O sobrenome de cada autor deverá ter um índice numérico sobrescrito, que fornecerá informação sobre sua filiação profissional.

Prenome Aaaa Bbbb Sobrenome¹, José Cc Silva-Santos² & Mario Silva-Neto³

O parágrafo seguinte deverá conter o endereço institucional de cada autor e o e-mail do autor correspondente, conforme exemplo abaixo:

1. Acadêmico de Farmácia / Pós-Graduando. Instituição / Universidade, Instituto/Faculdade, Departamento, CEP, Cidade, Estado, País.
2. Colaborador / Pesquisador. Instituição / Universidade, Instituto / Faculdade, Departamento, CEP, Cidade, Estado, País.
3. Docente orientador / Pesquisador orientador. Instituição / Universidade, Instituto / Faculdade, Departamento, CEP, Cidade, Estado, País.

***Correspondência:** Mario Silva-Neto: silva@abcd.ufff.br

** Preferência para e-mail institucional.*

O resumo não deverá exceder 250 palavras, deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais experimentais, os métodos empregados, os resultados e a conclusão.

Os descritores (palavras-chave/*keywords*) são palavras fundamentais para a classificação da temática abordada no manuscrito em bancos de dados nacionais e internacionais. Serão aceitos entre 3 e 6 descritores que não estejam citadas no título. Após a seleção desses descritores, sua existência em português, espanhol e/ou inglês deve ser confirmada pelo(s) autor(es) do manuscrito no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br> (Descritores em Ciências da Saúde - Bireme). As palavras-chave deverão ser separadas por ponto e a primeira letra de cada palavra deverá ser maiúscula.

Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.

As equações, fórmulas e estruturas químicas deverão ser editadas utilizando *software* compatível com o editor de texto e centralizadas no texto. As variáveis deverão ser identificadas após a equação.

Recomenda-se que os autores realizem a análise de regressão ou outro teste estatístico aplicável para fatores quantitativos.

A revista recomenda que pelo menos oitenta por cento (80%) das referências bibliográficas tenham menos de 10 anos e não ultrapassem o número total de 30 referências.

As ilustrações (tabelas, gráficos, figuras, mapas, gravuras, esquemas e fotos), devem ser apresentadas o mais próximo possível do texto, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto e deverão ser digitadas com espaçamento simples. As fotos deverão evitar a identificação de pessoas ou apresentar permissão específica e escrita para a publicação das mesmas. As tabelas e quadros devem apresentar um título breve. As figuras devem conter legenda. As tabelas devem apresentar dados numéricos como informação central, e não utilizar traços internos horizontais ou verticais e sim linhas intercaladas com sombreamento cinza 5%. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das ilustrações, com os seus respectivos símbolos. Se houver ilustração extraída de outra fonte, publicada ou não, a fonte original deve ser mencionada abaixo das mesmas.

As citações bibliográficas deverão ser adotadas de acordo com as exigências da RBF. Citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (LOPES, 2005); para dois autores (SOUZA & SCAPIM, 2005); três ou mais autores, utilizar o primeiro autor seguido por *et al.* (WAYNER *et al.*, 2007), porém na lista de referências deverão aparecer os sobrenomes de todos os autores na ordem que estão publicado. As referências deverão aparecer listadas, em ordem alfabética crescente pelo sobrenome do primeiro autor, em caixa alta e sem espaço entre as referências. A veracidade das referências é de responsabilidade dos autores. Deve-se levar em consideração os seguintes exemplos:

MODELOS DE REFERÊNCIA:

Estes dados foram adaptados, em sua maioria, do documento original da ABNT (NBR 6023, agosto de 2002).

a) Artigos de periódicos:

A abreviatura do periódico deverá ser utilizada, em itálico, definida no Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) ou na Base de dados PubMed, da US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.gov>), selecionando Journals Database.

Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizada, deve-se citar o título completo.

AUTOR(ES)*. **Título do artigo em negrito.** *Título do periódico em itálico*, volume (a indicação do fascículo é entre parênteses): páginas inicial - final do artigo e ano de publicação.

b) Livros:

AUTOR. **Título.** Edição (a partir da 2ª). Cidade: Editora, ano de publicação. Número total de páginas.

Capítulos de livros (o autor do capítulo citado não é o autor da obra): AUTOR(es) do capítulo. Título da parte referenciada. *In:* AUTOR(ES) da obra (ou editor etc.) **Título da obra.** Cidade: Editora, ano de publicação. Paginação da parte referenciada.

Citação indireta:

Utiliza-se *apud* (citado por) nas citações que foram transcritas de uma obra de um determinado autor, mas que na verdade pertence a outro autor.

c) Teses, Dissertações e demais trabalhos acadêmicos: AUTOR. **Título** (inclui subtítulo se houver). Ano. Total de páginas. Tipo (Grau) - Instituição (Faculdade e Universidade) onde foi defendida, Cidade.

d) Eventos científicos (Congressos, Seminários, Simpósios e outros): AUTOR(es). **Título do trabalho.** *In:* NOME DO EVENTO, nº do evento, ano, cidade de realização do evento. Tipo de publicação gerada pelo evento. Cidade da publicação: Editora ou Instituição responsável pela publicação; ano de edição (nem sempre é o mesmo do evento). Paginação do trabalho ou resumo.

e) Patentes: Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado.

O apoio das entidades e/ou órgãos financiadores da pesquisa deverá ser citado, obrigatoriamente, nos Agradecimentos.

ITENS DE VERIFICAÇÃO PARA SUBMISSÃO:

Como parte do processo de submissão, os autores deverão verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito encontra-se no escopo da Revista Brasileira de Farmácia.
2. A contribuição é original, inédita e não está sendo avaliada por outra revista.
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word.
4. O e-mail para envio do manuscrito está disponível.
5. O texto está em espaçamento 1,5 cm; fonte tamanho 12, estilo *Times New Roman*; com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos em Critérios para preparação dos manuscritos.
7. Todos os apêndices estão preenchidos.
8. Ao submeter um manuscrito, os autores aceitam que o *copyright* de seu artigo seja transferido para a Revista Brasileira de Farmácia, se e quando o artigo for aceito para publicação. Artigos e ilustrações aceitos tornam-se propriedade da Revista Brasileira de Farmácia.