

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA: PREVENÇÃO PELA VITAMINA C E
GUANOSINA**

FERNANDA ROSSATTO MACHADO

ORIENTADORA

Prof^ª. Dr^ª. Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA: PREVENÇÃO PELA VITAMINA C E
GUANOSINA**

FERNANDA ROSSATTO MACHADO

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 para à
obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre, 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Machado, Fernanda Rossatto

AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA: PREVENÇÃO PELA VITAMINA C E
GUANOSINA / Fernanda Rossatto Machado. -- 2012.
89 f.

Orientadora: Angela T. S. Wyse.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Homocisteína. 2. Glutamato. 3. Na⁺,K⁺-ATPase.
4. Vitamina C. 5. Guanosina. I. Wyse, Angela T. S.,
orient. II. Título.

Dedico essa dissertação ao meu amor Marcelo,
pois o início do mestrado foi também o início da nossa linda
vida juntos. Pelo teu carinho, tua compreensão, tuas comidas
deliciosas que deixavam meus estudos mais prazerosos,
obrigada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa Dra Angela Wyse, pela oportunidade de estágio, e pela sabedoria e dedicação com que orientou esse trabalho. Obrigada pela amizade, incentivo e por sempre acreditar em mim.

Aos inúmeros AMIGOS e colegas de laboratório: Aline, Ana Paula, Andressa, Bá, Bruna, Carol, Cassi, Cris Matté, Déia, Edu, Elias, Emi, Fê, Felipe, Jana, Jeff, Jú, Keila, Lígia, Lucas, Maroca, Nize, Pri, Samantita, Tiago e aos novos bolsistas de iniciação. Em especial a Déia, por ter me acolhido tanto e à Maira, minha irmãzinha e companheira de mestrado, pela companhia incansável e ajuda, sempre que precisei.

Aos demais amigos que fiz no Departamento de Bioquímica, em especial à Ana Carolina, Fernando e Melaine.

Aos colegas dos laboratórios 34 e 38, pela amizade e convívio.

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

Aos meus pais, Ricardo e Heloisa pelo incansável apoio e torcida. Por sempre acreditarem em mim e acharem que tudo ia dar certo. Amo muito vocês!!

À minha mana querida Renata, amor da minha vida, e a família dela, que agora cresce, pela torcida e carinho de sempre!! Amo vocês!!

Ao meu namorado, Marcelo, pelo amor dedicado a mim. Pela ótima companhia, pelo incentivo constante ao estudo, por ter me apoiado tanto em mais esta etapa que vivemos juntos. Te amo!!

Aos meus avós que sempre torceram por mim.

À família Reis que sempre torce por mim e me acolhe tão bem.

Aos amigos que estiveram ao meu lado em mais essa etapa. Em especial à Helena, Paula, Camila, Joseane, Mariana, Patrícia (Artur) e Tábitha.

À Chanel, minha bebê, pela companhia e carinho fiel.

Ao Departamento de Bioquímica e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela possibilidade de realizar esse trabalho de pesquisa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em especial à Cléia pela ajuda de sempre.

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro.

“Um dia a maioria de nós irá se separar. Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, as descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que compartilhamos...

Saudades até dos momentos de lágrima, da angústia, das vésperas de finais de semana, de finais de ano, enfim... do companheirismo vivido... Sempre pensei que as amizades continuassem para sempre...

Hoje não tenho mais tanta certeza disso. Em breve cada um vai pra seu lado, seja pelo destino, ou por algum desentendimento, segue a sua vida, talvez continuemos a nos encontrar, quem sabe... nos e-mails trocados...

Podemos nos telefonar... conversar algumas bobagens. Aí os dias vão passar... meses... anos... até este contato tornar-se cada vez mais raro. Vamos nos perder no tempo...

Um dia nossos filhos verão aquelas fotografias e perguntarão: Quem são aquelas pessoas? Diremos que eram nossos amigos. E... isso vai doer tanto!!! Foram meus amigos, foi com eles que vivi os melhores anos de minha vida!

A saudade vai apertar bem dentro do peito. Vai dar uma vontade de ligar, ouvir aquelas vozes novamente...

...Por isso, fica aqui um pedido deste humilde amigo: não deixes que a vida passe em branco, e que pequenas adversidades sejam a causa de grandes tempestades...”

Vinícios de Moraes

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	1
I.2 Homocisteína.....	2
I.3 Homocistinúria Clássica.....	4
I.4 Toxicidade da Homocisteína.....	5
I.5 Modelo Experimental de Hiper-homocisteinemia Severa.....	6
I.6 Sistema Glutamatérgico.....	7
I.7 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	9
I.8 Radicais Livres e Estresse Oxidativo.....	11
I.9 Metabolismo Energético.....	12
I.10 Vitamina C.....	13
I.11 Guanosina.....	14
I.12 Objetivos.....	15
II MÉTODOS E RESULTADOS.....	18
CAPÍTULO I- Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C.....	19
CAPÍTULO II- Dados não publicados.....	27

1. Materiais e Métodos	27
1.1. Animais e reagentes.....	27
1.2. Administração Crônica de Homocisteína.....	27
1.3. Administração Crônica de Guanosina.....	28
1.4. Preparação da amostra.....	28
1.5. Determinação da Captação de Glutamato.....	29
1.6. Determinação da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ - ATPase.....	29
1.7. Determinação do Imunoconteúdo das subunidades da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	30
1.8. Determinação de TBARS.....	30
1.9. Determinação dos níveis de espécies reativas- DCFH.....	30
1.10. Enzimas Antioxidantes.....	31
a) Superóxido Dismutase.....	31
b) Catalase.....	31
1.11. Conteúdo de sulfidrilas.....	32
1.12. Determinação da atividade do Complexo II.....	32
1.13. Determinação da atividade da Citocromo C Oxidase.....	33
1.14. Determinação dos níveis de ATP.....	33
1.15. Determinação Protéica.....	34
1.16. Análise Estatística.....	34
2. Resultados	35
III. DISCUSSÃO	45
IV. CONCLUSÕES	54
V. PERSPECTIVAS	56
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

A homocistinúria clássica é um erro inato de metabolismo de aminoácidos, causado pela deficiência na atividade da enzima cistationina- β - sintase. Pacientes afetados podem apresentar alterações neurológicas como convulsão e retardo mental. A vitamina C e a guanosina têm sido sugeridas como agentes protetores em diversos modelos que afetam o sistema nervoso central. Sendo assim, no presente estudo utilizamos um modelo animal de homocistinúria a fim de investigar os mecanismos pelos quais a homocisteína exerce sua neurotoxicidade. Nesse trabalho também avaliamos a influência da vitamina C, um antioxidante clássico; e da guanosina, um nucleotídeo derivado da guanina, como possíveis neuroprotetores sobre os efeitos causados pela homocisteína. Inicialmente, investigamos o efeito da administração crônica de homocisteína sobre a captação de glutamato, a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e sobre os níveis de espécies reativas em hipocampo de ratos de 21 dias de vida pós natal. Os resultados mostraram que a hiper-homocisteinemia crônica severa diminuiu a captação de glutamato e a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase, SOD e CAT, bem como aumentou o nível de espécies reativas na estrutura estudada. Além disso, a administração concomitante de vitamina C preveniu significativamente as alterações causadas pela homocisteína. De acordo com os resultados iniciais, podemos sugerir que a redução da captação de glutamato está relacionada à inibição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase, já que os transportadores de glutamato utilizam o gradiente de Na^+ gerado por essa enzima para o transporte, e pela presença de estresse oxidativo, já que a vitamina C preveniu tal efeito. Posteriormente, estendemos nosso estudo para avaliar os efeitos da hiper-homocisteinemia crônica severa sobre outros parâmetros, tais como imunoconteúdo das subunidades catalíticas da Na^+, K^+ -ATPase (α_1 , α_2 e α_3), dano a biomoléculas (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico- TBARS e sulfidrilas totais) e metabolismo energético (complexo II, citocromo C oxidase- COX e níveis de ATP). Também avaliamos o possível efeito protetor da guanosina sobre os parâmetros citados anteriormente. A administração crônica de homocisteína diminuiu o imunoconteúdo da subunidade α_1 e não alterou α_2 e α_3 ; aumentou o TBARS e diminuiu os níveis de sulfidrilas totais; a homocisteína diminuiu a atividade da COX e não alterou a atividade do complexo II e os níveis de ATP. A guanosina, *per se*, não modificou nenhum dos parâmetros analisados, mas foi capaz de prevenir as alterações nas atividades da Na^+, K^+ -ATPase e no imunoconteúdo de α_1 , das enzimas antioxidantes, COX e nos níveis de sulfidrilas totais. Esses resultados reforçam nossa hipótese de que o estresse oxidativo está envolvido na diminuição da captação de glutamato, já que a guanosina, considerada um importante modulador do sistema glutamatérgico, não foi capaz de prevenir totalmente as alterações oxidativas promovidas pela homocisteína e a diminuição na captação de glutamato. A partir desses achados sugerimos que a administração da vitamina C e da guanosina pode ser benéfica como terapia adjuvante na homocistinúria clássica. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nas modulações mostradas nesse estudo.

ABSTRACT

The classical homocystinuria is an inborn error of amino acid metabolism caused by deficient of the enzyme cystathionine β -synthase activity. Affected patients may show neurological abnormalities such as seizures and mental retardation. Vitamin C and guanosine have been suggested as protective agents in several models that affect the central nervous system. Thus, the present study we used an animal model of homocystinuria to investigate the mechanisms by which homocysteine exerts its neurotoxicity. In this work we also evaluated the influence of vitamin C, a classic antioxidant, and guanosine, a guanine nucleotide derivative, as possible neuroprotective on the effects caused by homocysteine. Initially, we investigated the effect of chronic administration of homocysteine on glutamate uptake, the activity of enzymes Na^+, K^+ -ATPase, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and on the levels of reactive species in the hippocampus of rats 21 days of postnatal life. The results showed that chronic severe hyperhomocysteinemia decreased glutamate uptake and activity of the enzyme Na^+, K^+ -ATPase, SOD and CAT as well as increased levels of reactive species in the structure studied. In addition, concomitant administration of vitamin C significantly prevented the changes induced by homocysteine. According to initial results, we suggest that the reduction of glutamate uptake is related to inhibition of the activity of Na^+, K^+ -ATPase, as transporters of glutamate using the gradient of Na^+ generated by this enzyme for the transport, and oxidative stress, since vitamin C prevented this effect. Later, we extend our study to evaluate the effects of chronic severe hyperhomocysteinemia on other parameters, such as immunocontent the catalytic subunits of Na^+, K^+ -ATPase (α_1 , α_2 and α_3), injury to biomolecules (substances reactive to thiobarbituric acid- TBARS and total sulfhydryl) and energy metabolism (complex II, cytochrome c oxidase- COX and ATP levels). We also evaluate the possible protective effect of guanosine on the parameters mentioned above. The chronic administration of homocysteine decreased α_1 subunit immunocontent and not changed α_2 and α_3 ; increased TBARS and decreased levels of total sulfhydryl; homocysteine decreased COX activity and did not alter the activity of complex II and ATP levels. The guanosine, *per se*, did not modify any of the parameters analyzed, but was able to prevent changes in the activities of Na^+, K^+ -ATPase and immunocontent of α_1 , antioxidant enzyme, COX and levels of total sulfhydryl. These results support our hypothesis that oxidative stress is involved in the reduction of glutamate uptake, since guanosine, considered an important modulator of the glutamatergic system was not able to totally prevent oxidative changes promoted by homocysteine and decreased glutamate uptake. From these findings we suggest that administration of vitamin C and guanosine may be beneficial as adjuvant therapy in classical homocystinuria. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the modulation shown in this study.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AdoHcy**- S-adenosil-homocisteína
- AdoMet**- S-adenosilmetionina
- AMPA**- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
- ATP**- adenosina trifosfato
- CAT**- catalase
- CBS**- cistationina β -sintase
- COX**- citocromo C oxidase
- DCFDA**- diacetato de 2'7'- diclorofluoresceína
- DCFH**- 2'7'- diclorofluoresceína
- EIM**- erros inatos do metabolismo
- FADH₂**- flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- Glu**- glutamato
- GSH**- glutationa reduzida
- GSH-Px**- glutationa peroxidase
- GTP**- guanosina trifosfato
- Guo**- guanosina
- HCU**- homocistinúria
- Hcy**- homocisteína
- MS**- metionina sintase
- NADH**- nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- NMDA**- N-metil-D-aspartato
- SNC**- sistema nervoso central
- SOD**- superóxido dismutase
- TBARS**- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Vit C**- vitamina C

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Homocisteína.....	2
Figura 2. Metabolismo da homocisteína.....	3
Figura 3. Sinapse glutamatérgica.....	8

CAPÍTULO I- ARTIGO PUBLICADO

Figura 1. Efeito da administração crônica de homocisteína, vitamina C e homocisteína mais vitamina C sobre a captação de glutamato em hipocampo de ratos jovens.....	22
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 2. Efeito da administração crônica de homocisteína, vitamina C e homocisteína mais vitamina C sobre a atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em hipocampo de ratos jovens.....	23
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 3. Efeito da administração crônica de homocisteína, vitamina C e homocisteína mais vitamina C sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio em hipocampo de ratos jovens.....	23
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 4. Efeito da administração crônica de homocisteína, vitamina C e homocisteína mais vitamina C sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT(A) e SOD(B) em hipocampo de ratos jovens.....	23
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO II- DADOS NÃO PUBLICADOS

Figura 1. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre a captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos jovens.....	35
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 2. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ - ATPase em hipocampo de ratos jovens.....	36
Figura 3. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre imunoconteúdo das subunidades da Na ⁺ ,K ⁺ - ATPase: α ₁ (A), α ₂ (B) e α ₃ (C) em hipocampo de ratos jovens.....	38
Figura 4. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre níveis de espécies reativas em hipocampo de ratos jovens.....	39
Figura 5. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre a atividade da superóxide dismutase (A) e catalase (B) em hipocampo de ratos jovens.....	40
Figura 6. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em hipocampo de ratos jovens.....	41
Figura 7. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre níveis totais de sulfidrilas em hipocampo de ratos jovens.....	42
Figura 8. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre a atividade do complexo II em hipocampo de ratos jovens.....	43
Figura 9. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre a atividade do citocromo C oxidase em hipocampo de ratos jovens.....	44
Figura 10. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre os níveis de ATP em hipocampo de ratos jovens.....	44

I. INTRODUÇÃO

I.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças hereditárias causadas pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, a qual pode apresentar deficiência parcial ou total na sua atividade. Essa deficiência pode resultar no bloqueio da via metabólica envolvida, podendo levar tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais (Scriver et al., 2001).

Os EIM são classificados de acordo com a área do metabolismo afetada (Scriver et al., 2001). Dentre eles podemos destacar os EIM de hormônios, de ácidos orgânicos, de glicídios, de purinas e pirimidinas, de proteínas plasmáticas, entre outros. A frequência dos EIM é baixa, quando analisados individualmente; porém, em conjunto, estima-se que possam atingir cerca de um em cada mil recém-nascidos vivos (Giugliani, 1988). Até o momento, já foram descritos mais de 500 EIM, sendo os mais frequentes os EIM de aminoácidos, como a fenilcetonúria, a hiperprolinemia, a hipermetioninemia e a homocistinúria (HCU) clássica que será o foco do nosso estudo.

Os EIM apresentam manifestações clínicas muito variadas e inespecíficas devido a diferenças no grau da deficiência enzimática e área do metabolismo afetada. No entanto, algumas manifestações clínicas ocorrem com mais frequência, como deficiências no crescimento, vômitos, letargia, coma,

convulsões, hipotonia, dificuldades respiratórias, odor anormal na urina ou na pele e neurodegeneração progressiva (Burton, 1987; Scriver *et al.*, 2001).

I.2 HOMOCISTEÍNA

A homocisteína (Hcy) (Figura 1) é formada a partir da metionina proveniente da dieta ou da degradação de proteínas endógenas, que é convertida em S-adenosil metionina (AdoMet) em uma reação catalisada pela enzima metionina adenosil transferase. Nas reações de transmetilação da AdoMet ocorre a produção de S-adenosil homocisteína (AdoHcy) seguida da hidrólise de AdoHcy em adenosina e Hcy, através da enzima adenosil homocisteína hidrolase (Figura 2). A Hcy é então metabolizada através de duas principais vias no fígado e nos rins: a via de transulfuração, através da enzima cistationina β -sintase (CBS) [EC 4.2.1.22] e transmetilação, catalisada pela metionina sintase (MS) [EC 2.1.1.13] (Fowler, 1997; Mudd *et al.*, 2001).

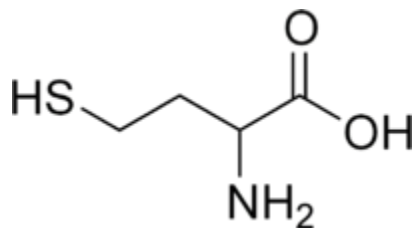


Figura 1: Homocisteína

Na primeira via metabólica, transulfuração, ocorre a condensação da Hcy com o aminoácido serina pela enzima CBS, a qual utiliza como cofator a vitamina B₆ (piridoxal fosfato). Em seguida, a cistationina forma cisteína e α -oxobutirato

pela enzima cistationina γ -liase, que utiliza o mesmo cofator da CBS. A cisteína pode então participar da formação da glutatona reduzida (GSH), um antioxidante não-enzimático muito importante para a proteção de vários tecidos como o cérebro (Fowler, 1997; Mudd et al., 2001).

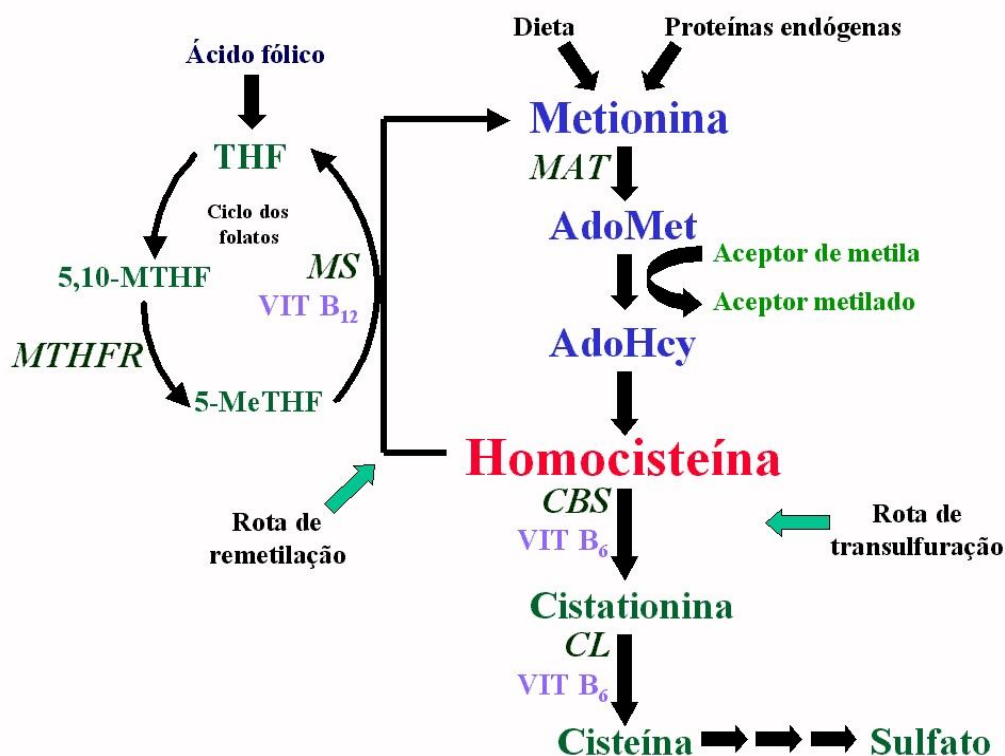


Figura 2. Metabolismo da homocisteína (Adaptado de MUDD et al., 2001).

MAT – metionina adenosil transferase; **CBS** – cistationina β -sintase; **CL** – cistationina γ -liase; **MS** – metionina sintase; **MTHFR** – metileno tetrahydrofolato redutase; **AdoMet** – S-adenosil metionina; **AdoHcy** – S-adenosil homocisteína; **THF** – tetrahydrofolato; **5,10-MTHF** – 5,10-metileno-tetrahydrofolato; **5-MeTHF** – 5-metil-tetrahydrofolato.

A Hcy também pode ser metabolizada a metionina através da via de remetilação, catalisada pela enzima MS, cujo cofator é a vitamina B₁₂ (cobalamina). Um dos principais doadores do grupo metila é o ácido fólico,

também conhecido como vitamina B9. Além disso, a Hcy também pode receber um grupo metila da betaína, através da enzima betaína homocisteína metiltransferase (Fowler, 1997; Mudd et al., 2001).

I.3 HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA

Níveis plasmáticos normais de Hcy variam de 5 - 15 $\mu\text{mol/L}$. No entanto, quando os níveis desse aminoácido excedem 100 $\mu\text{mol/l}$, ocorre a chamada HCU clássica ou hiper-homocisteinemia severa, um EIM do metabolismo de aminoácidos sulfurados cuja herança é do tipo autossômica recessiva, causada pela deficiência na atividade da enzima CBS. O aumento nos níveis de Hcy geralmente é acompanhado pela elevação tecidual dos níveis de seu precursor, o aminoácido essencial metionina, assim como a redução em seus produtos como a cistationina e cisteína. Além disso, ocorre a eliminação urinária de homocistina, metabólito formado por duas moléculas de Hcy ligadas por uma ponte dissulfeto (Mudd et al., 2001).

A frequência dessa doença é de aproximadamente 1:200.000 à 1:335.000 nascidos vivos (Mudd et al., 2001), podendo apresentar maior incidência em regiões com maior cosanguinidade como no Catar, onde a prevalência pode chegar a 1:1800 (Zschocke et al., 2009). A detecção da HCU nos pacientes envolve o aparecimento de sinais e sintomas clínicos característicos da doença. Normalmente, o primeiro achado clínico encontrado é o retardo mental, seguido de outros achados clínicos importantes para o diagnóstico precoce da HCU como alterações vasculares, deformações ósseas, miopia e deslocamento da lente

ocular (Cruysberg *et al.*, 1996; Mudd *et al.*, 2001). Para o diagnóstico laboratorial da HCU clássica é realizado o teste da presença de homocistina na urina do paciente, entretanto, o diagnóstico confirmatório é realizado através de ensaios diretos da atividade da enzima CBS em biópsia de fígado, cultura de fibroblastos da pele ou linfócitos estimulados por fitoemaglutinina obtidos do paciente (Fowler and Jakobs, 1998).

O principal tratamento para a HCU se baseia em uma dieta restrita em metionina, precursora da Hcy, e uma suplementação das vitaminas B₆ e B₁₂ que atuam como cofatores enzimáticos, e de ácido fólico, um doador de grupo metila no metabolismo da Hcy. Além disso, uma dieta suplementada com cisteína também tem sido utilizada devido à sua função como precursora da GSH (Dias *et al.*, 2001; Gebara and Matioli, 2006). Os tratamentos citados têm como objetivo controlar os níveis plasmáticos da Hcy e seus metabólitos, retardando a evolução das complicações neurológicas e cardiovasculares, que frequentemente são responsáveis pelo óbito dos pacientes (Walter *et al.*, 1998; Mudd *et al.*, 2001).

I.4 TOXICIDADE DA HOMOCISTEÍNA

Vários estudos nos últimos anos têm procurado elucidar os mecanismos pelos quais a Hcy causa toxicidade tecidual, entretanto, os exatos mecanismos pelos quais esse aminoácido exerce efeitos deletérios ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que níveis elevados de Hcy estão presentes em doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC) como epilepsia (Sachdev, 2004; Herrmann *et al.*, 2007), doenças neurodegenerativas (Kuhn *et al.*, 1998; Gallucci

et al., 2004; Fuso et al., 2012) e neuropsiquiátricas (Bottiglieri, 2005; Khanna et al., 2011). Além disso, a Hcy também afeta outros tecidos, como vascular (Clarke et al., 1991; Welch and Loscalzo, 1998; Faraci and Lentz, 2004; Gazzaruso et al., 2012), hepático (Adinolfi et al., 2005) e pulmonar (Jiang et al., 2005; Hamelet et al., 2007).

Diversos trabalhos têm demonstrado o envolvimento da Hcy com a excitotoxicidade glutamatérgica através da ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I (Zieminska et al., 2003) e ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA) (Kim and Pae, 1996; Lipton et al., 1997). Elevados níveis de Hcy também têm sido relacionados com o estresse oxidativo. A Hcy possui um grupamento-SH que pode sofrer auto-oxidação a dissulfeto em pH fisiológico na presença de (O_2), dando origem a homocistina e Hcy tiolactona. Além disso, esse mesmo processo gera espécies ativas de oxigênio extremamente tóxicas, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) (Jacobsen, 2000).

I.5 MODELO EXPERIMENTAL DE HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA

Modelos animais são amplamente utilizados para a compreensão da fisiopatologia de doenças humanas. No presente estudo utilizamos um modelo experimental quimicamente induzido de hiper-homocisteinemia severa, a fim de elucidar possíveis mecanismos envolvidos na toxicidade glutamatérgica hipocampal. Nesse modelo, os ratos são submetidos à administração crônica de Hcy a fim de induzir níveis plasmáticos desse aminoácido semelhantes àqueles

encontrados em pacientes com HCU clássica ($>100\mu\text{mol/L}$) (Mudd et al., 2001; Streck et al., 2002a).

I.6 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O aminoácido glutamato (Glu) é considerado o mais importante neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, tendo um importante papel nos mecanismos de memória, cognição e aprendizado (Danbolt, 2001). O Glu é sintetizado nos neurônios pré-sinápticos a partir da glutamina proveniente das células gliais, em uma reação catalisada pela enzima glutaminase, e estocado em vesículas (Meldrum, 2000).

A maioria dos neurônios, e até mesmo as células gliais, apresentam receptores glutamatérgicos em sua membrana plasmática (Berger and Hediger, 2000). Esses receptores são classificados como ionotrópicos ou metabotrópicos, conforme suas características moleculares. Os receptores ionotrópicos, os quais são subdivididos em NMDA, AMPA e cainato, possuem canais iônicos em sua estrutura que, quando ativos, se tornam permeáveis a íons como Na^+ , Ca^{2+} e K^+ . Entretanto, os receptores metabotrópicos, subdivididos em receptores do grupo I, II e III, são moléculas acopladas a proteínas G que atuam modulando a atividade de enzimas como adenilato ciclase e fosfolipase C (Danbolt, 2001).

Após exercer sua função nos receptores glutamatérgicos, o Glu é removido da fenda sináptica pelos seus transportadores dependentes de Na^+ localizados principalmente nas membranas gliais, por um mecanismo chamado captação de

Glu. Os transportadores de Glu de maior importância incluem GLAST (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 e EAAT5 (Danbolt, 2001).

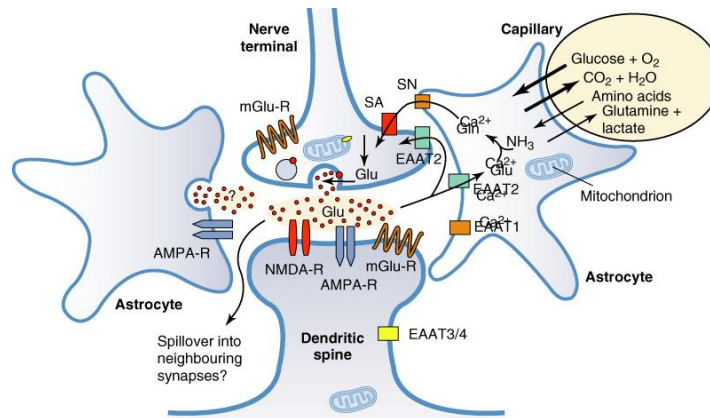


Figura 3. Sinapse glutamatérgica (Siegel et al., 2006)

Tem sido sugerido que a captação de Glu está associada à atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, já que os transportadores de Glu utilizam o gradiente eletroquímico de Na⁺ gerado pela Na⁺, K⁺-ATPase (Rose et al., 2009; Wyse and Netto, 2011). Esse gradiente é estabelecido através do co-transporte de 3 Na⁺: 1 H⁺: 1 Glu para o meio intracelular, enquanto que 1 íon K⁺ é lançado para o meio extracelular, com o gasto de 1 ATP (Kanner, 2006). Há evidências de que os transportadores de Glu possam ser inibidos pela ação de radicais livres, sendo sugerido que os mesmos agem via grupamento-SH da proteína transportadora de Glu (Volterra et al., 1994; Sheldon and Robinson, 2007).

Tendo em vista os pontos abordados, é de extrema importância a manutenção dos níveis de Glu na fenda sináptica através da captação de Glu, a fim de se evitar um estado de excitotoxicidade e dano tecidual (Danbolt, 2001). No entanto, um estudo realizado em nosso laboratório mostrou que a administração

crônica de Hcy reduz a captação de Glu e o imunoconteúdo dos transportadores gliais, GLAST e GLT-1 em córtex parietal de ratos (Matte et al., 2010).

I.7 Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) ou bomba de Na⁺ é uma proteína integral de membrana responsável pelo co-transporte de três íons Na⁺ para o meio extracelular e dois íons K⁺ para o meio intracelular, utilizando como energia uma molécula de trifosfato de adenosina (ATP) hidrolisada, consumindo cerca de 50% do ATP cerebral (Erecinska and Silver, 1994; Erecinska et al., 2004). Através do resultado do gradiente iônico a célula é capaz de desenvolver uma série de funções como estabelecimento e manutenção do potencial de repouso de membrana, além de regular o volume celular, o pH intracelular, o fluxo de íons e o transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na⁺: como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (Erecinska and Silver, 1994; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Sjostrom et al., 2007).

Em relação à estrutura, a Na⁺,K⁺-ATPase é constituída de duas subunidades catalíticas α com dez segmentos transmembrânicos, que contêm os sítios de ligação para Na⁺, K⁺, ATP e ouabaína (glicosídeo cardíaco e inibidor específico da enzima), duas subunidades β regulatórias glicosiladas, e uma subunidade γ com ação moduladora. As isoformas combinam entre si, formando diversas isoenzimas que apresentam diferentes padrões de distribuição nos tecidos. No cérebro, principalmente três isoformas α (α 1, α 2, α 3) e duas β (β 1 e

β_2) são expressas (Skou and Esmann, 1992; Wetzel *et al.*, 1999; Taguchi *et al.*, 2007).

A subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima (Blanco and Mercer, 1998; Kaplan, 2002). Acredita-se que dez domínios da subunidade α estão inseridos na membrana celular. Já a subunidade β , que é uma glicoproteína, está inserida na membrana celular uma única vez e sabe-se que essa subunidade não possui atividade catalítica, mas apresenta uma função estrutural importante (Fambrough *et al.*, 1994; Kaplan, 2002). Estudos mostraram que a subunidade α perde a atividade catalítica quando é separada da subunidade β (Skou and Esmann, 1992). A subunidade γ ainda não tem a sua função completamente elucidada. Acredita-se que essa subunidade não é essencial para a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Kaplan, 2002).

Devido à importância da Na^+, K^+ -ATPase para o funcionamento normal do SNC, a inibição da sua atividade tem sido associada a diversas neuropatologias tais como Alzheimer, esclerose múltipla, doença de Parkinson e epilepsia (Grisar *et al.*, 1992; Rose and Valdes, 1994; Hattori *et al.*, 1998; Jovicic *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011). Estudos realizados em modelos de EIM mostraram uma diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela hiperprolinemia do tipo II, hipermetioninemia e hiper-homocisteinemia severa (Streck *et al.*, 2002b; Stefanello *et al.*, 2011; Wyse and Netto, 2011).

I.8 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Essas espécies são altamente reativas e podem ser formadas pela perda ou pelo ganho de um elétron por um não radical, bem como pelo processo de fissão homolítica, o qual corresponde à quebra de uma ligação covalente (Halliwell and Gutteridge, 2007). Além disso, espécie reativa é um termo que caracteriza tanto espécies radicalares, quanto não radicalares. O O_2^- , o OH^- , H_2O_2 , o oxigênio singlet (1O_2), óxido nítrico (NO^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) são algumas das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio mais conhecidas (Halliwell and Whiteman, 2004).

Normalmente, o nosso organismo dispõe de um sistema de defesa antioxidante eficiente a fim de evitar os danos que as espécies reativas podem causar, agindo como detoxificadores desses agentes oxidantes. As defesas antioxidantes podem ser divididas em enzimáticas e não enzimáticas. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH-Px). As defesas antioxidantes não enzimáticas incluem principalmente a GSH, a vitamina C (Vit C), o α -tocoferol, os polifenóis, a melatonina, a bilirrubina, o urato, o ácido lipóico e os estrógenos (Salvador and Henriques, 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação de radicais livres e as defesas antioxidantes, o que pode resultar em dano celular.

Esse desequilíbrio pode ser resultado da diminuição de defesas antioxidantes ou do aumento da produção de espécies reativas, que pode ocorrer tanto em condições fisiológicas como patológicas (Halliwell and Whiteman, 2004).

O cérebro é altamente suscetível ao dano oxidativo, principalmente por apresentar elevado consumo de oxigênio, membrana neuronal rica em ácidos graxos poliinsaturados e modesta defesa antioxidante (Halliwell, 2006). Evidências têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de doenças neurodegenerativas como Huntington, Alzheimer e Parkinson (Petrozzi *et al.*, 2007; Mancuso *et al.*, 2010). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a administração de Hcy diminui as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em cérebro e sangue de ratos (Wyse *et al.*, 2002; Matte *et al.*, 2009).

I.9 METABOLISMO ENERGÉTICO

O cérebro é um órgão que possui elevada atividade metabólica consumindo muita energia para exercer suas funções, porém ele possui pouca reserva energética. Sendo assim, o cérebro necessita de um suprimento contínuo de glicose, seu principal composto energético. A glicólise em conjunto com o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa são as rotas essenciais para a produção de energia cerebral (Erecinska and Silver, 1994; Erecinska *et al.*, 2004).

A glicólise é composta por uma sequência de reações que ocorrem no citosol e que formam como produto final o piruvato. O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial e consiste de uma sequência de reações onde, em cada volta

do ciclo, são formadas três moléculas de NADH, uma de FADH₂, duas de CO₂ e uma de GTP. O NADH e FADH₂ produzidos no ciclo de Krebs são carreadores de elétrons utilizados na cadeia respiratória através da fosforilação oxidativa para a produção de ATP (Nelson and Cox, 2006).

Estudos têm demonstrado que deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP (Heales et al., 1999). Nesse contexto, dados da literatura sugerem que uma diminuição do metabolismo energético pode estar implicada na patogênese de alguns EIM, como a fenilcetonúria (Rech et al., 2002), hiperprolinemia tipo II (Ferreira et al., 2010), hiperargininemia experimental em ratos (Delwing et al., 2003) e homocistinúria clássica (Streck *et al.*, 2003b).

I.10 VITAMINA C

A Vit C é uma vitamina hidrossolúvel amplamente presente nos sistemas biológicos e fisiologicamente se encontra na forma do ânion ascorbato, que em função do seu baixo potencial de redução, atua como um sequestrador de radicais livres (Rose and Bode, 1993; Rice, 2000; Bradshaw *et al.*, 2011). Além disso, essa vitamina também está envolvida em inúmeras funções celulares como a biossíntese do colágeno e no transporte de metais (Englard and Seifter, 1986; Peterkofsky, 1991; Buettner and Jurkiewicz, 1996).

Apesar da maioria dos mamíferos sintetizarem Vit C através da via do ácido hexurônico no fígado (Banhegyi et al., 1997), os seres humanos devem adquirir os micronutrientes solúveis em água de fontes alimentares. Nos últimos anos, vários

trabalhos na literatura têm discutido os possíveis efeitos benéficos da Vit C no tratamento do câncer (Padayatty et al.), sepse (Wilson, 2009) e das doenças neurodegenerativas (Bowman *et al.*, 2009; Butterfield *et al.*, 2010).

I.11 GUANOSINA

Diversos estudos têm sido realizados a fim de elucidar o papel da guanosina (Guo) no SNC. Um estudo de Ciccarelli e colaboradores (Ciccarelli et al., 1999) demonstrou que a Guo é liberada dos astrócitos durante a hipóxia em fatias de cérebro de ratos. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram o efeito neuroprotetor da Guo através da diminuição de convulsões induzidas por estimulação do sistema glutamatérgico em ratos adultos (Schmidt et al., 2000; de Oliveira et al., 2004).

A Guo exerce efeitos tróficos e mitóticos em células neurais, na faixa de concentração de 30 a 300 μM (Rathbone et al., 1999). Uma vez que esses efeitos são parcialmente atenuados por antagonistas de receptores de adenosina, acredita-se que essa modulação da Guo pode ser mediada, pelo menos em parte, pela adenosina (Ciccarelli et al., 2000). Por outro lado, a própria adenosina não é capaz de mimetizar o efeito da Guo na sua totalidade (Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2000), sugerindo que existem outros mecanismos pelos quais a Guo exerce seus efeitos.

Mesmo com a existência de inúmeros trabalhos que investigam os possíveis efeitos protetores da Guo, os exatos mecanismos pelos quais esse nucleotídeo exerce suas funções permanecem não esclarecidos. Os nucleotídeos

derivados da guanina, como a Guo, são classicamente associados ao sistema de transmissão de sinal transmembrana via proteína G (Gudermann et al., 1997) e tem sido sugerida a existência de um sítio de ligação específico para a Guo na membrana plasmática envolvendo as rotas da MAPK e da PI3K/Akt/PKB (Di Iorio et al., 2004; Rathbone et al., 2008).

I.12 OBJETIVOS

Objetivo Geral

A fim de compreender os mecanismos pelos quais a Hcy exerce a sua neurotoxicidade, o objetivo **geral** do presente trabalho foi investigar o efeito da Hcy sobre parâmetros neuroquímicos em ratos submetidos ao modelo experimental de HCU clássica: sistema glutamatérgico e metabolismo energético em hipocampo de ratos jovens. Além disso, investigamos os possíveis efeitos neuroprotetores da Vit C e da Guo sobre as alterações bioquímicas causadas pela Hcy.

Objetivos Específicos

Os objetivos específicos estão subdivididos em dois capítulos, que serão apresentados na forma de artigo científico (Capítulo I) e dados não publicados (Capítulo II), respectivamente, como seguem:

Capítulo I

- Verificar o efeito da administração crônica de Hcy sobre a captação de Glu em hipocampo de ratos de 21 dias;
- Verificar o efeito da administração crônica de Hcy sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em homogenato de hipocampo de ratos de 21 dias;
- Investigar o efeito da administração crônica de Hcy sobre parâmetros de estresse oxidativo denominados oxidação do DCFH, bem como sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em hipocampo de ratos jovens;
- Analisar o efeito do tratamento concomitante de Vit C com a administração crônica de Hcy na captação de Glu, Na^+, K^+ -ATPase e sobre os parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo de ratos de 21 dias.

Capítulo II

- Investigar o efeito da administração crônica de Hcy sobre o imunoconteúdo das subunidades α_1 , α_2 e α_3 da enzima Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratos de 21 dias;
- Verificar o efeito da administração crônica de Hcy sobre parâmetros de estresse oxidativo denominados níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e sulfidrilas em hipocampo de ratos jovens;

- Investigar o efeito da administração crônica de Hcy sobre parâmetros de metabolismo energético, tais como a atividade do Complexo II e da citocromo C oxidase (COX) e níveis de ATP em hipocampo de ratos de 21 dias de idade;
- Analisar o efeito do tratamento concomitante de Guo com a administração crônica de Hcy na captação de Glu, Na⁺,K⁺-ATPase, parâmetros de estresse oxidativo (TBARS, DCFH, sulfidrilas e das enzimas antioxidantes SOD e CAT) e metabolismo energético em hipocampo de ratos de 21 dias.

II MÉTODOS E RESULTADOS

MODELO EXPERIMENTAL

Os capítulos I e II terão desenhos experimentais semelhantes entre si no que se refere ao modelo experimental de HCU clássica.

Administração Crônica de Homocisteína

O modelo experimental de HCU clássica foi induzido através de duas injeções diárias de D- Hcy pela via subcutânea, do 6º ao 21º dias com doses diárias de acordo com Streck e colaboradores (Streck et al., 2002b). Os animais controles receberam injeções de solução salina (0,85% NaCl) nos mesmos volumes que os animais dos demais grupos. Os animais foram decapitados doze horas após a última injeção, o hipocampo dissecado e separado para posteriores análises.

CAPÍTULO I – ARTIGO 1

Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C

Fernanda R. Machado, Andréa G. K. Ferreira, Aline A. da Cunha,
Bárbara Tagliari, Ben Hur M. Mussulini, Susana Wofchuk, Angela T. S. Wyse

Periódico: Metabolic Brain Disease

Status: Publicado

Homocysteine alters glutamate uptake and Na^+, K^+ -ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C

Fernanda R. Machado · Andréa G. K. Ferreira · Aline A. da Cunha ·
Bárbara Tagliari · Ben Hur M. Mussulini · Susana Wofchuk · Angela T. S. Wyse

Received: 18 September 2010 / Accepted: 12 January 2011 / Published online: 3 February 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract In the present study we investigate the effect of homocysteine on glutamate uptake, Na^+, K^+ -ATPase, enzymatic antioxidant defenses, as well as reactive species levels in hippocampus of rats. The influence of vitamin C, a classic antioxidant, on the effects elicited by homocysteine was also tested. Results showed that chronic hyperhomocysteinemia decreased glutamate uptake and the activities of Na^+, K^+ -ATPase, catalase and superoxide dismutase in hippocampus of rats. Reactive species levels were increased by chronic homocysteine administration. Concomitant administration of vitamin C significantly prevented these alterations caused by homocysteine. According to our results, it seems possible to suggest that the reduction in glutamate uptake and Na^+, K^+ -ATPase activity may be mediated by oxidative stress, since vitamin C prevented these effects. We suggest that the administration of antioxidants should be considered as an adjuvant therapy to specific diet in homocystinuria.

Keywords Hyperhomocysteinemia · Vitamin C · Antioxidant · Na^+, K^+ -ATPase · Excitotoxicity · Hippocampus

Introduction

Homocysteine (Hcy) is an amino acid generated metabolically by the S-adenosylmethionine (SAM)-dependent transmethylation pathway (Schalinske 2009) and the tissue accumulation of Hcy occurs in homocystinuria, a metabolic disease characterized biochemically by cystathionine β -synthase (CBS, EC 4.2.1.22) deficiency (Mudd et al. 2001). In addition, homocysteine is present in several disorders that affect the central nervous system (CNS), as epilepsy (Herrmann et al. 2007; Sachdev 2004), Parkinson's (Kuhn et al. 1998) and Alzheimer's disease (Gallucci et al. 2004).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian CNS and is probably involved in most aspects of normal brain function including cognition, memory and learning (Collingridge and Lester 1989; Fonnum 1984; Headley and Grillner 1990). However, when glutamate is present in high concentrations in the synaptic cleft, it may lead to excitotoxicity, a process corresponding to glutamate receptor overstimulation that subsequently leads to neuronal damage (Danbolt 2001; Mattson et al. 2002). Previous data suggests that Hcy induces neurodegeneration by NMDA receptor overstimulation (Lipton et al. 1997; Zieminska and Lazarewicz 2006). More recently, we have shown that Hcy decreased the glutamate uptake in parietal cortex of rats (Matté et al. 2010).

Na^+, K^+ -ATPase (EC 3.6.1.3), also known as the sodium pump, is a membrane-bound enzyme responsible for generating the membrane potential of the cell through ion exchange, that provides energy for various cellular functions such as the establishment and maintenance of membrane resting potential and pH homeostasis (Sjöström et al. 2007). Studies in our laboratory indicated that acute

F. R. Machado · A. G. K. Ferreira · A. A. da Cunha · B. Tagliari ·
B. H. M. Mussulini · S. Wofchuk · A. T. S. Wyse (✉)
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,
CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: wyse@ufrgs.br

administration of Hcy decreased the Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus of rats (Wyse et al. 2002). It has been reported that this enzyme is inhibited by free radicals (Hitschke et al. 1994; Lees 1993). In this context, oxidative stress has also been an important mechanism of damage caused by Hcy (Streck et al. 2003; Wyse et al. 2002). Studies demonstrated that Hcy chronic administration increased lipid peroxidation, reduced antioxidant defenses and total thiol content in the liver and blood of rats (Matté et al. 2009a, b).

Vitamin C is a hydrosoluble vitamin widely present in the biological systems as a naturally occurring free radical scavenger (Rose and Bode 1993). It also is involved in a number of cellular functions such as collagen biosynthesis and iron transport (Buettner and Jurkiewicz 1996; England and Seifter 1986; Peterkofsky 1991). Although most mammals synthesize vitamin C via the hexuronic acid pathway in the liver (Banhegyi et al. 1997), humans must acquire the water-soluble micronutrient from dietary sources. Moreover, multivitamin preparations are commonly used to supplement inadequate dietary intake and because of its antioxidant properties (Fox and Cameron 1989).

In the present study we investigate the effect of homocysteine on glutamate uptake, Na^+, K^+ -ATPase activity, as well as levels of reactive species and enzymatic antioxidant defenses (superoxide dismutase and catalase) in hippocampus of rats. The protective effect of vitamin C was also evaluated.

Materials and methods

Animals and reagents

Wistar rats were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Animals were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). The rats had free access to water and commercial protein chow. Animal care followed the NIH "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication no. 80–23, revised 1996) and our study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul.

L-[2,3- ^3H] glutamate (specific activity 30 Ci/mmol) was purchased from Amersham International, UK. The other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Chronic homocysteine and vitamin C administration

D, L-Hcy was dissolved in saline solution (0.85% NaCl) and buffered to pH 7.4. Hcy solution (0.3–0.6 $\mu\text{mol/g}$ body weight) was administered subcutaneously twice a day at 8 h

interval from their 6 th to their 21 st days of age. Hcy doses were calculated from pharmacokinetic parameters previously determined in our laboratory (Streck et al. 2002). Vitamin C solution (100 mg/kg body weight) was injected intraperitoneally, once a day, also from 6 th to 21 st day of life. Control animals received saline solution in the same volumes as those applied to Hcy and vitamin C treated rats. The rats were sacrificed by decapitation 12 h after the last injection and the brain was carefully removed and hippocampus was dissected.

Tissue and homogenate preparation

In order to measure the Na^+, K^+ -ATPase activity, the hippocampus was homogenized in 10 volumes of 0.32 mM sucrose solution containing 5 mM HEPES and 1 mM EDTA, pH 7.4. Homogenates were centrifuged at 3000 \times RPM for 10 min at 4°C . The pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the measurements.

To determine the oxidative stress parameters, the hippocampus was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 3000 \times RPM for 10 min at 4°C , to discard the nuclei and the cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was taken to biochemical assays. The homogenates used were from individual animals, and they were never pooled. All experiments were repeated with different animals.

Glutamate uptake assay

Glutamate uptake was performed according to Frizzo et al. (2002). Hippocampus was cut into 400 μm thick slices with a McIlwain chopper. Briefly, slices were pre-incubated in Hank's balanced salt solution (HBSS) at 35°C for 15 min, followed by adding a solution containing 0.33 mCi/mL L-[2,3- ^3H] glutamate with 100 μM unlabeled glutamate at 35°C . Incubation was stopped after 5 min with two ice-cold washes of 1 mL HBSS, immediately followed by the addition of 0.5 N NaOH. Sodium-independent uptake was determined on ice (4°C), using HBSS containing N-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride. Both the specific and non-specific uptakes were performed in triplicate. Incorporated radioactivity was measured using a liquid scintillation counter.

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 170 μL . The reaction was initiated by the addition of ATP.

Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. The activity was calculated by the difference between the two assays, as previously described (Wyse et al. 2000). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Specific activity of the enzyme was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. All samples were run in duplicate.

2'7'-dichlorofluorescein fluorescence assay

Reactive species production was measured following Lebel et al. (1992) method based on 2'7'-dichlorofluorescein (DCFH) oxidation. Samples (60 μ L) were incubated for 30 min at 37°C in the dark with 240 μ L of 100 μ M 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) solution in a 96 wells plate. DCFDA is cleaved by cellular esterases and the resultant DCFH is eventually oxidized by reactive species presenting in samples. The last reaction produces the fluorescent compound DCF which was measured at 488 nm excitation and 525 nm emission and the results were represented by nmol DCF/mg protein. A calibration curve was performed with purified DCF as standard.

Catalase assay

Catalase (CAT) activity was assayed using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California, USA). The method used is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL (Aebi 1984). One CAT unit is defined as 1 μ mol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Superoxide dismutase assay

Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California, USA). This method is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide, which is substrate for SOD. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm, using a double beam spectrophotometer with temperature control (Marklund 1985). A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as 1 unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

Protein determination

The protein content of hippocampus samples was determined using bovine serum albumin as standard, according to Peterson (1977), Bradford (1976) or Lowry et al. (1951).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test when the F-test 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 $p < 0.05$.

Results

Initially, we investigated the effect of chronic administration of Hcy on glutamate uptake. Figure 1 shows that chronic hyperhomocysteinemia significantly decreased glutamate uptake in hippocampus of young rats when compared to controls (saline administration). Besides, vitamin C alone did not alter this parameter, but prevented the reduction in glutamate uptake caused by chronic Hcy administration [$F(3,20)=4.291$; $p < 0.05$].

Next, we evaluated the effect of chronic hyperhomocysteinemia on Na⁺,K⁺-ATPase activity. Figure 2 shows that rats subjected to hyperhomocysteinemia present a significant reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in homogenate of hippocampus of young rats. In addition, this figure also shows that vitamin C, per se, did not alter the Na⁺,K⁺-ATPase activity, but when administered concomitantly with

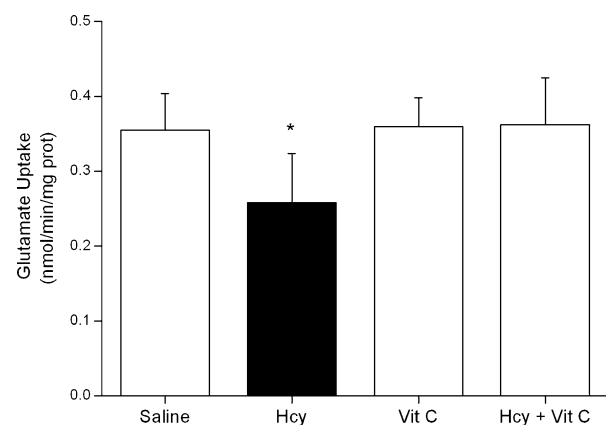


Fig. 1 Effect of chronic administration of homocysteine, vitamin C and homocysteine plus vitamin C on glutamate uptake in slices of hippocampus of young rats. Data are mean \pm S.D. for 5–6 animals in each group. Results are expressed in nmol/min/mg protein. * $p < 0.05$ compared to control (Duncan multiple range test). Hcy, homocysteine; Vit, vitamin

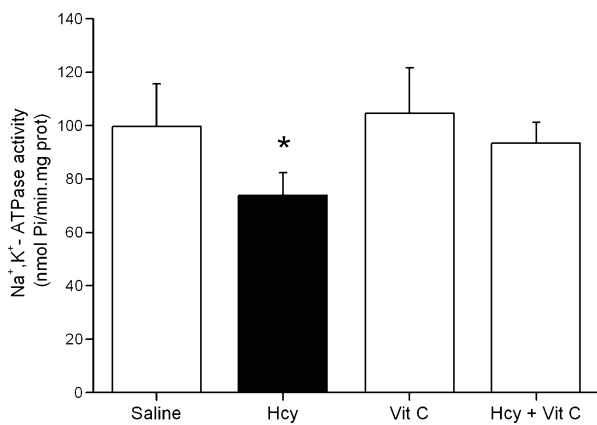


Fig. 2 Effect of chronic administration of homocysteine, vitamin C and homocysteine plus vitamin C on Na⁺,K⁺-ATPase activity in homogenates from hippocampus of young rats. Data are mean \pm S.D. for 5–6 animals in each group. Results are expressed in nmol Pi/min mg protein. * p <0.05 compared to control (Duncan multiple range test). Hcy, homocysteine; Vit, vitamin

Hcy, it was able to prevent the damage caused by Hcy [$F(3,20)=4.122$; p <0.05].

We also investigated some parameters of oxidative stress in order to determine the involvement of reactive species on the effects promoted by Hcy in hippocampus of young rats subjected to hyperhomocysteinemia. Figure 3 shows that Hcy increased the levels of reactive species in this cerebral structure. Moreover, vitamin C, per se, significantly increased the amount of reactive species, but when administered concomitantly with Hcy, the vitamin was able to prevent the damage caused by the aminoacid [$F(3,24)=4.34$; p <0.01]. Besides, the effect of chronic hyperhomocysteinemia on antioxidant enzymes CAT and SOD in hippocampus of young rats was also evaluated. Figure 4 shows that Hcy significantly reduced the activities of CAT

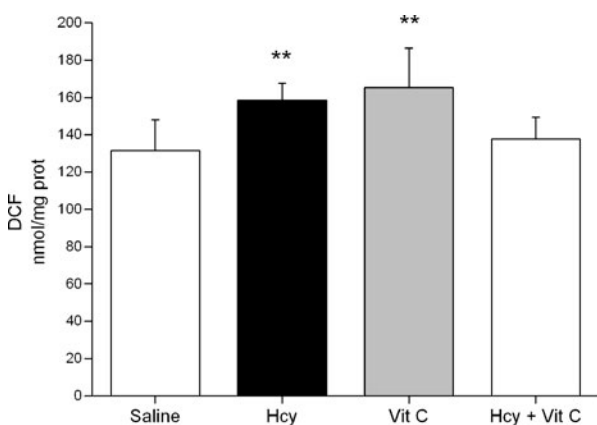


Fig. 3 Effect of chronic administration of homocysteine, vitamin C and homocysteine plus vitamin C on the levels of reactive oxygen species in hippocampus of young rats. Data are mean \pm S.D. for 5–6 animals in each group. Results are expressed in nmol/mg protein. ** p <0.01 compared to control (Duncan multiple range test). Hcy, homocysteine; Vit, vitamin

[$F(3,24)=3.759$; p <0.05] and SOD [$F(3,24)=8.324$; p <0.001]. Furthermore, vitamin C, per se, did not alter the SOD and CAT activities, but prevented the inhibition of these enzymes caused by Hcy.

Discussion

Inborn errors of metabolism (IEM) are multifactorial diseases, mostly autosomal recessive, covering genetic and biochemical changes. These disorders involve chemical changes in phenotype as a consequence of blocking the metabolic pathways where these anomalous enzymes are inserted (Scriver et al. 2001). Homocystinuria is an IEM, which occurs due to the accumulation of Hcy, a methionine-derived sulphur amino acid. Clinically, affected patients present neurological manifestations such as mental retardation, psychiatric disturbances and seizures (Mudd et al. 2001), whose physiopathology is still unknown.

It has been showed that chronic hyperhomocysteinemia decreases the glutamate uptake in parietal cortex of rats (Matté et al. 2010). On this basis, we decided to extend our investigation in order to investigate whether this alteration also occur in hippocampus, a cerebral structure essential to spatial memory processes, which has been shown to be impaired in rats subjected to Hcy administration (Streck et al. 2004). Our results showed that chronic hyperhomocysteine-

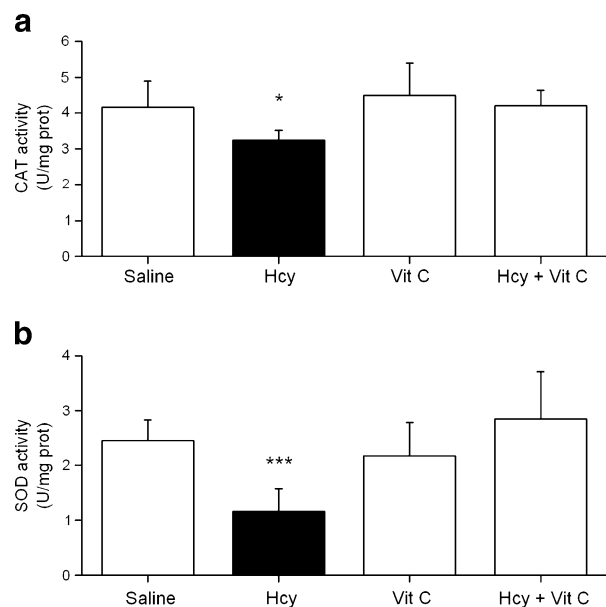


Fig. 4 Effect of chronic administration of homocysteine, vitamin C and homocysteine plus vitamin C on antioxidant enzyme activities CAT (a) and SOD (b) in hippocampus of young rats. Data are mean \pm S.D. for 5–6 animals in each group. Results are expressed in U/mg protein. * p <0.05 compared to control; *** p <0.001 compared to control (Duncan multiple range test). CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; Hcy, homocysteine; Vit, vitamin

mia significantly decreased the glutamate uptake in hippocampus of young rats.

Glutamate uptake is a crucial mechanism of deactivation of glutamatergic signalling in the brain, mediated by glutamate transporters (Danbolt 2001). It has been suggested that glutamate uptake is associated to Na^+, K^+ -ATPase activity, since glutamate transporters are sodium-dependent proteins that use the inwardly directed electrochemical sodium gradient generated by Na^+, K^+ -ATPase activity, to drive the uphill transport of this neurotransmitter (Rose et al. 2009). With this idea in mind, we also investigated the effect of Hcy administration on Na^+, K^+ -ATPase activity. Results showed that chronic hyperhomocysteinemia decreased the Na^+, K^+ -ATPase activity in rat hippocampus. Therefore, the ineffective glutamate uptake found in hippocampus of rats submitted to chronic hyperhomocysteinemia in this work may be intimately linked to failure of Na^+, K^+ -ATPase activity.

Since free radicals can impair the glutamate transport by direct oxidation of SH-group of the carrier protein (Sheldon and Robinson 2007; Volterra et al. 1994) and inhibit Na^+, K^+ -ATPase (Pari and Murugavel 2007; Potts et al. 2006; Siems et al. 1996), in the present study we also investigated the influence of vitamin C, a classical antioxidant, on the effects elicited by Hcy on glutamate uptake and Na^+, K^+ -ATPase activity in order to verify the involvement of oxidative stress in these parameters. Data showed that vitamin C was able to prevent the decrease of glutamate uptake and Na^+, K^+ -ATPase activity caused by Hcy, suggesting that oxidative stress is probably involved in such effects. In fact, Hcy has been shown as a potent oxidizing agent of SH-group by inducing reactive species production as peroxynitrite (Radi et al. 1991), which can be produced by Hcy autooxidation (Dayal et al. 2004; Faraci and Lentz 2004).

In this context, previous studies performed in our laboratory showed that acute hyperhomocysteinemia decreased tissue antioxidant potential in cerebral cortex of rats (Wyse et al. 2002) and that chronic administration of Hcy reduced total radical-trapping antioxidant potential and the activities of antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase in parietal cortex of rats (Matté et al. 2009a). Considering that oxidation of Hcy may lead to the formation of reactive species as superoxide and hydrogen peroxide which subsequently alter neuronal function and predispose to brain damage (White et al. 2001), we extend our study and investigated other oxidative stress parameters, namely DCFH that measures reactive species. Results showed that chronic administration of Hcy enhanced the oxidation of DCFH in hippocampus of young rats and that antioxidant vitamin C was able to prevent such effect. However, we observed that vitamin C, per se, also increased the DCFH oxidation. This finding is in agreement with Brömme et al. (2008) who

showed the prooxidant effect of vitamin C on DCFH oxidation induced by $\cdot\text{OH}$. In addition, other recent studies have shown that this vitamin can act as prooxidant, generating hydrogen peroxide and ascorbate radical at pharmacologic concentrations (Chen et al. 2007, 2008).

Regarding the enzymatic antioxidant defenses that are responsible for removing reactive species, our results showed that chronic administration of Hcy reduces CAT and SOD activities in hippocampus of rats and that vitamin C administration prevents such effects. We believe that this imbalance between antioxidant enzymes caused by Hcy probably alters reactive species elimination, increasing the free radicals amount. These effects of Hcy could be responsible for, at least in part, by the ability of Hcy to inhibit the expression of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase and superoxide dismutase (Upchurch et al. 1997; Yamamoto et al. 2000).

Although clinical studies have demonstrated a negative association between vitamin C and Hcy concentration in healthy individuals (Cascalheira et al. 2008), we have observed that the pretreatment with vitamin C did not decrease the elevated Hcy plasma levels after acute Hcy administration in rats (data not published), but this vitamin C prevented oxidative damage caused by Hcy (Wyse et al. 2002). In agreement with our data, Chambers et al. (1999) showed that vitamin C did not alter the increase of Hcy levels, but prevented the impairment of vascular endothelial function caused by this amino acid, suggesting that the adverse effects of homocysteine are mediated through oxidative stress mechanisms.

In conclusion, we showed that chronic Hcy administration decreases glutamate uptake and the activities of Na^+, K^+ -ATPase and enzymatic antioxidant defenses, as well as enhances reactive species, reinforcing the hypothesis that this amino acid can act as an oxidative stressor. We also showed that vitamin C administration prevents Hcy effects possibly by its antioxidant propriety. Together, these observations prompt us to hypothesize that free radicals can decrease Na^+, K^+ -ATPase activity and consequently to lead to an ineffective glutamate uptake. Considering that oxidative stress elicited by Hcy could contribute to pathophysiology of disorders that accumulate this amino acid such as metabolic and neurodegenerative disorders and if confirmed in human beings, we might propose the use of vitamin C as an adjuvant therapy in hyperhomocysteinemic patients. However, we reinforce the importance of careful prescription of vitamin C for healthy people, because of their possible prooxidant properties.

Acknowledgements This work was supported in by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—Brazil) and by the FINEP Research Grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) - # 01.06.0842-00”.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Banhegyi G, Braun L, Csala M, Puskas F, Mandl J (1997) Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic Biol Med* 23:793–803
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brömme H-J, Zühlke L, Silber R-H, Simm A (2008) DCFH2 interactions with hydroxyl radicals and other oxidants—influence of organic solvents. *Exp Gerontol* 43:638–644
- Buettner GR, Jurkiewicz BA (1996) Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 145:532–541
- Cascalheira JF, Parreira MC, Viegas AN, Faria MC, Domingues FC (2008) Serum homocysteine: relationship with circulating levels of cortisol and ascorbate. *Ann Nutr Metab* 53:67–74
- Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS (1999) Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 99:1156–1160
- Chan KM, Delfert D et al (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E et al (2007) Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8749–8754
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC et al (2008) Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11105–11109
- Collingridge GL, Lester RAJ (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 40:143–210
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105
- Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, Boger RH, Sigmund CD, Faraci FM, Lentz SR (2004) Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke* 35:1957–1962
- Englard S, Seifter S (1986) The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr* 6:365–406
- Faraci FM, Lentz SR (2004) Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 35:345–347
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1–11
- Fox BA, Cameron AG (1989) In: Arnold E (ed) *Food science. Nutrition and Health*, London
- Frizzo ME, Lara DR et al (2002) Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol* 22:353–363
- Gallucci M, Zanardo A, De Valentin L, Vianello A (2004) Homocysteine in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Gerontol Geriatr Suppl* 9:195–200
- Headley PM, Grillner S (1990) Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 11:205–211
- Herrmann W, Lorenzl S, Obeid R (2007) Review of the role of hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiency in neurological and psychiatric disorders—current evidence and preliminary recommendations. *Fortschr Neurol Psychiatr* 75:515–527
- Hitschke K, Buhler R, Apell HJ, Stark G (1994) Inactivation of the Na⁺, K⁺-ATPase by radiation-induced free radicals. Evidence for a radical-chain mechanism. *FEBS Lett* 353:297–300
- Kuhn W, Roebroek R, Blom H, Van Oppenraaj D, Przuntek H, Kretschmer A, Buttner T, Woitalla D, Muller T (1998) Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 40:225–227
- Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227–231
- Lees GJ (1993) Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54:287–322
- Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS (1997) Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5923–5928
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–267
- Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243–247
- Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andreazza AC, Zanotto C, Moro AM, Garcia SC, Gonçalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Wyse AT (2009a) Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int* 54:7–13
- Matté C, Stefanello FM, Mackedanz V, Pederzoli CD, Lamers ML, Dutra-Filho CS, Dos Santos MF, Wyse AT (2009b) Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. *Int J Dev Neurosci* 27:337–344
- Matté C, Mussulini BH, Dos Santos TM, Soares FM, Simão F, Matté A, De Oliveira DL, Salbego CG, Wofchuk ST, Wyse AT (2010) Hyperhomocysteinemia reduces glutamate uptake in parietal cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 28:183–187
- Mattson MP, Chan SL, Duan W (2002) Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev* 82:637–672
- Mudd SH, Levy HL, Skovby F (2001) Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 1279–1327
- Pari L, Murugavel P (2007) Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology* 234:44–50
- Peterkofsky B (1991) Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 54:1135–1140
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346–356
- Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, Manvelyan HM, Noble-Haesslein LJ (2006) Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *NeuroRx* 3:143–153
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266:4244–4250
- Rose RC, Bode AM (1993) Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J* 7:1135–1142
- Rose EM, Koo JC, Antflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR (2009) Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci* 29:8143–8155
- Sachdev PS (2004) Homocysteine and neuropsychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr* 26:50–56
- Schalinske KL (2009) Hepatic sulfur amino acid metabolism. In: Masella R, Mazza G (eds) *Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease*. Wiley, Hoboken, pp 73–90
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (2001) *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York

- Sheldon AL, Robinson MB (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 51:333–355
- Siems WG, Hapner SJ, van Kuijk FJ (1996) 4-hydroxynonenal inhibits Na⁺,K⁺-ATPase. *Free Radic Biol Med* 20:215–223
- Sjöström M, Stenström K, Eneling K, Zwiller J, Katz AI, Takemori H, Bertorello AM (2007) SIK1 is part of a cell sodium-sensing network that regulates active sodium transport through a calcium-dependent process. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16922–16927
- Streck EL, Matte C et al (2002) Reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochem Res* 27:1593–1598
- Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT (2003) In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18:147–154
- Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT (2004) Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 153:377–381
- Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL Jr, Keaney JF, Loscalzo J (1997) Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 272:17012–17017
- Volterra A, Trotti D, Racagni G (1994) Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol* 46:986–992
- White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AL, Cappai R (2001) Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem* 76:1509–1520
- Wyse AT, Streck EL et al (2000) Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 25:971–975
- Wyse AT, Zugno AI, Streck EL, Matté C, Calcagnotto T, Wannmacher CMD, Wajner M (2002) Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 27:1685–1689
- Yamamoto M, Hara H, Adachi T (2000) Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 486:159–162
- Zieminska E, Lazarewicz JW (2006) Excitotoxic neuronal injury in chronic homocysteine neurotoxicity studied in vitro: the role of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors. *Acta Neurobiol Exp Wars* 66:301–309

Capítulo II- DADOS NÃO PUBLICADOS

1. Materiais e Métodos

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

1.1 Animais e reagentes

Foi realizado um estudo experimental controlado, utilizando ratos Wistar, obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, mantidos em ciclos claro/escuro de 12/12 h em temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com livre acesso à água e alimento comercial protéico (20%). Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

1.2 Administração Crônica de Homocisteína

O modelo experimental de HCU clássica foi induzido conforme descrito na página 18.

1.3 Administração Crônica de Guanosina

Em outra série de experimentos os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo I (salina); Grupo II (Hcy); Grupo III (Guo); Grupo IV (Hcy + Guo). Os ratos do grupo Guo e Hcy+Guo receberam uma única injeção diária de 7,5 mg/Kg de Guo (Schmidt et al., 2009) pela via intraperitoneal, também do 6º ao 21º dias. Todos os animais foram decapitados 12 horas após a última injeção, o hipocampo dissecado e separado para posteriores análises.

1.4 Preparação da amostra

Para a determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase o tecido foi homogeneizado em 10 volumes de solução de sacarose 0,32 mM contendo HEPES 5,0 mM e EDTA 1,0 mM em pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 3000 × RPM por 10 min a 4°C, o pellet foi descartado e o sobrenadante retirado para o ensaio bioquímico.

Para determinar os parâmetros de estresse oxidativo, a hipocampo foi homogeneizado em 10 volumes (1:10, p/v) de 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,4 contendo 140 mM KCl. Os homogenatos foram centrifugados a 3000 × RPM por 10 min a 4°C, para descartar o núcleo e os detritos celulares. O pellet foi descartado e o sobrenadante retirado para os ensaios bioquímicos. Os homogeneizados foram usados de animais individuais, e eles nunca foram agrupados. Todos os experimentos foram repetidos com diferentes animais.

1.5 Determinação da Captação de Glutamato

A captação de Glu foi medida de acordo com Frizzo e colaboradores (Frizzo et al., 2002). O hipocampo foi cortado em fatias de 400µm que foram pré-incubadas em solução salina balanceada de Hank (HBSS) a 35°C por 15 min, seguido pela adição de solução contendo 0,33 mCi / mL L-[2,3-3 H glutamato] com 100 mM de Glu não marcado em 35°C. A incubação foi interrompida após 5 min com duas lavagens a frio com 1 ml de HBSS, imediatamente seguido pela adição de 0,5 N NaOH. A captação de Glu independente de Na⁺ foi determinada no gelo a 4°C. A radioatividade incorporada foi medida utilizando um contador de cintilação em meio líquido.

1.6 Determinação da atividade da Na⁺,K⁺- ATPase

A atividade da enzima Na⁺,K⁺- ATPase foi mensurada de acordo com Wyse e colaboradores (Wyse et al., 2000). A amostra foi incubada em meio MgCl₂ 5,0 mM, NaCl 80,0 mM, KCl 20,0 mM e Tris-HCl 40,0 mM em pH 7,4, em um volume final de 170µL. A reação foi iniciada pela adição de ATP. Os controles negativos foram realizados nas mesmas condições, porém com a adição de 1,0 mM de ouabaína. A atividade da enzima Na⁺,K⁺ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios. O fosfato inorgânico liberado foi medido pelo método de Chan e colaboradores (Chan et al., 1986).

1.7 Determinação do Imunoconteúdo das subunidades da Na⁺,K⁺- ATPase

A determinação do imunoconteúdo foi realizado de acordo com Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando anticorpos específicos para as subunidades α_1 , α_2 e α_3 da enzima Na⁺,K⁺- ATPase. As proteínas foram separadas em mini gel SDS-PAGE 10% e transferidos para membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules CA). As amostras foram processadas e a quimioluminescência detectada utilizando filmes de raios-X. Os filmes foram digitalizados e a intensidade das bandas analisadas usando Image J software (desenvolvido na E.U. National Institutes of Health e disponível na Internet no <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

1.8 Determinação de TBARS

TBARS, índice de lipoperoxidação, foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkaha e colaboradores (Ohkawa et al., 1979). A técnica consistiu na adição de 25 μ L de uma solução de dodecil sulfato de sódio 8,1%, 195 μ L de solução de ácido acético 20% em pH 3,5 e 195 μ L de ácido tiobarbitúrico 0,8% em 100 μ l de homogenato de tecido em um eppendorf. Em seguida, o eppendorf foi aquecido em banho de água fervente por 60 min. Depois do resfriamento com água da torneira, a mistura foi centrifugada a 3000 \times RPM por 10 min e o sobrenadante retirado para determinação em espectrofotômetro a 535 nm.

1.9 Determinação dos níveis de espécies reativas- DCFH

A produção de espécies reativas foi medida de acordo com Lebel e colaboradores (LeBel et al., 1992), método baseado na oxidação do reagente 2'7'-

diclorofluoresceína (DCFH). As amostras (60µL) foram incubadas por 30 min a 37°C, no escuro, com 240µL de solução de diacetato de 2'7'- diclorofluoresceína (DCFDA) 100µM em placa de 96 poços. O DCFDA é clivado por esterases celulares e o DCFH eventualmente resultante é oxidado por espécies reativas presentes nas amostras. A última reação produz o composto fluorescente DCF que foi medido em 488 nm de excitação e 525 nm de emissão e os resultados foram representados por nmol DCF/mg proteínas. A calibração da curva foi realizada com padrão de DCF purificado.

1.10 Enzimas Antioxidantes

a) Superóxido Dismutase:

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Marklund (Marklund, 1985). A técnica se baseou na capacidade de auto-oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente de O_2^- , que é substrato para a SOD. A inibição da auto-oxidação desse composto ocorreu na presença da SOD, cuja atividade foi indiretamente medida em espectrofotômetro a 412 nm.

b) Catalase:

A atividade da CAT foi baseada na medida da diminuição do consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 240 nm, em uma reação contendo H_2O_2 20 mM com 0,1 mM de Triton X-100, fosfato de potássio 10 mM, pH: 7,4. Uma unidade de

CAT é definida em 1 μM de H_2O_2 consumido por minuto. A atividade da CAT foi representada em unidades/mg de proteína (Aebi, 1984).

1.11 Conteúdo de sulfidrilas

Este parâmetro foi realizado de acordo com Aksenov e Markesbaery (Aksenov and Markesbery, 2001). A oxidação de tióis livres na amostra levou à formação de pontes dissulfeto. O Ácido 5,5 'ditio-bis (2-nitrobenzóico), reagente de cor, é reduzido pelos tióis, e não pelos tióis oxidados, gerando um derivado amarelo TNB, lido espectrofotometricamente em 412 nm. O conteúdo de sulfidrilas é inversamente proporcional ao dano oxidativo à proteína. Os resultados foram representados como nmol TNB/mg proteína.

1.12 Determinação da atividade do Complexo II

Imediatamente antes da técnica, as amostras foram congeladas e descongeladas três vezes para romper as membranas mitocondriais. A atividade da succinato: DCIP oxirredutase foi medida em homogeneizado depois da redução a 2,6-dicloroindofenol a 600 nm com 700 nm de comprimento de onda de referência ($\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) na presença de metassulfato de fenazina, de acordo com Fischer e colaboradores (Fischer et al., 1985). A mistura de reação consistiu de 40 mM de fosfato de potássio, pH 7,4, 16 mM succinato e DCIP $8\mu\text{M}$ e foi pré-incubada com 40-80 mg de homogenato de proteína a 30°C por 20 min. Posteriormente, para a atividade do complexo II, foi adicionado 4 mM de azida de Na^+ , a fim de inibir a atividade do Complexo I e rotenona $7\mu\text{M}$ para inibir a

atividade do complexo IV. A reação foi iniciada pela adição de 40 mM DCIP e foi monitorada por 5 min.

1.13 Determinação da atividade da Citocromo C Oxidase

A atividade da COX foi medida de acordo com Rustin e colaboradores (Rustin et al., 1994). A atividade enzimática foi mensurada observando a queda da absorvância devido à oxidação do citocromo c anteriormente reduzido a 550 nm com 580 nm de comprimento de onda de referência ($\text{Å} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 19,1$). O tampão de reação continha 10 mM fosfato de potássio, pH 7,0, 0,6 mM n-dodecil- α -D-maltosídeo e a reação foi iniciada com a adição de 2-4 mg de homogeneizado protéico e 0,7 mg de citocromo c reduzido. A atividade da COX foi medida a 25°C por 10 min.

1.14 Determinação dos níveis de ATP

Imediatamente após os ratos serem sacrificados, o hipocampo foi dissecado e congelado em nitrogênio líquido. A estrutura cerebral foi pesada e homogeneizada em 1 ml de 0,1 M NaOH (para inativar a atividade das ATPases celulares). As amostras foram analisadas usando o sistema de detecção de Luminescência ATPlite (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), de acordo com Witt et al. (Witt et al., 2003). A quimioluminescência foi medida utilizando a microplaca microbeta analisadora de cintilação Perkin-Elmer. As concentrações de ATP foram calculadas a partir de uma curva padrão, normalizado contra pesos de tecido em gramas e expressa como $\mu\text{mol/g}$.

1.15 Determinação Protéica

A determinação das proteínas totais foi realizada através do método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), de Lowry *et al.* (Lowry et al., 1951) ou de Peterson (Peterson, 1977), utilizando albumina bovina como padrão.

1.16 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste múltiplo de Duncan quando F foi significativo.

2. Resultados

Inicialmente, investigamos o efeito neuroprotetor da Guo sobre as alterações causadas pela administração crônica de Hcy sobre a captação de Glu. Como mostrado no capítulo I, a Hcy diminuiu a captação de Glu em hipocampo de ratos jovens. Entretanto, a Guo não foi capaz de prevenir as alterações causadas pela Hcy [$F(3,20) = 6,312$; $p < 0,01$] (Figura 1).

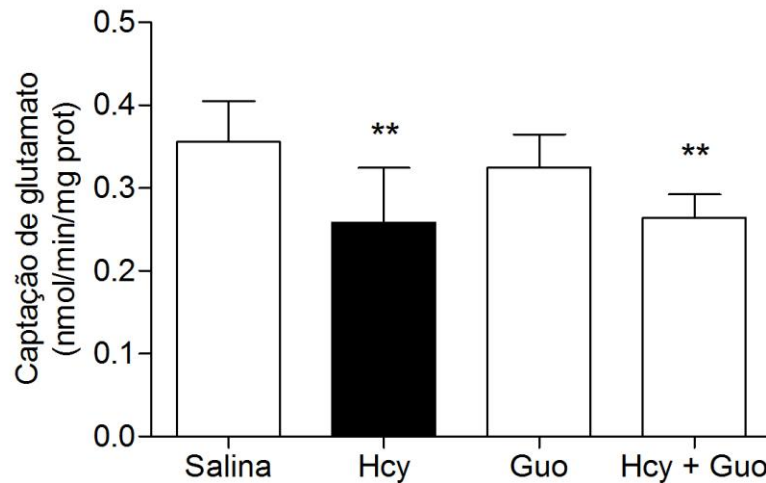


Figura 1. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre a captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média ± DP para 5-7 animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ comparado com controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanosina.

Posteriormente, avaliamos o efeito protetor da Guo sobre a diminuição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela hiper-homocisteinemia crônica severa. A Figura 2 mostra que a Guo, *per se*, não alterou esse parâmetro, no entanto foi capaz de prevenir as alterações causadas pela Hcy em hipocampo de ratos jovens [F (3,20) = 3,97; $p < 0,05$].

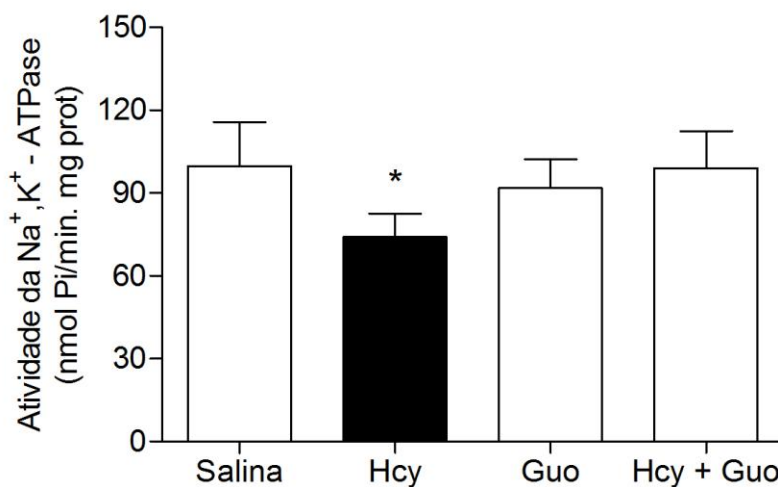


Figura 2. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média \pm DP para 5-7 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanosina.

Também avaliamos o imunocontéudo das subunidades catalíticas α_1 , α_2 e α_3 da Na^+, K^+ -ATPase em animais submetidos a administração crônica de Hcy e/ou Guo. Como pode ser observado na Figura 3, a administração de Hcy diminuiu o imunocontéudo da subunidade α_1 (A) [F (3,12) = 9,46; $p < 0,005$]. A Guo não alterou, *per se*, esse parâmetro, no entanto, foi capaz de prevenir tal alteração. Por outro lado, a administração de Hcy e/ou Guo não alterou o imunocontéudo das subunidades α_2 (B) [F (3,12) = 0,007; $p > 0,05$] e α_3 (C) [F (3, 12) = 0,267; $p > 0,05$] na estrutura cerebral estudada.

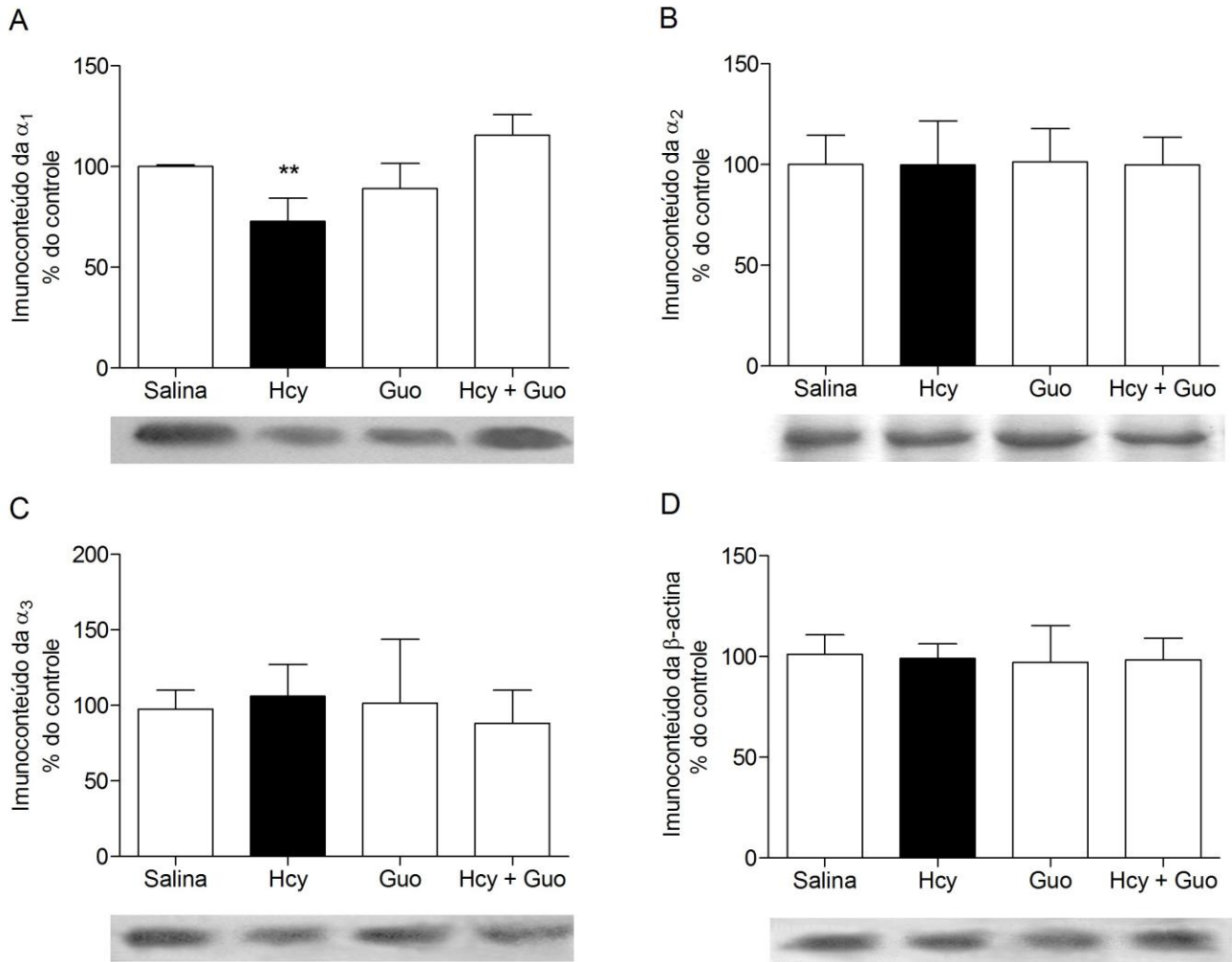


Figura 3. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanósina sobre imunoconteúdo das subunidades da Na^+, K^+ -ATPase: α_1 (A), α_2 (B) e α_3 (C) em hipocampo de ratos jovens. A uniformidade de carga de gel foi confirmada com β -actina como padrão (D). Os dados estão expressos como média \pm DP para 4 animais em cada grupo. A figura representativa do western blot das subunidades esta disposta abaixo de cada gráfico. ** $p < 0,01$ comparado com controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanósina.

A fim de elucidar o possível efeito antioxidante da Guo sobre as alterações causadas pela Hcy, investigamos os efeitos desse nucleotídeo sobre os níveis de espécies reativas e a atividade de enzimas antioxidantes. Como observado na figura 4, a Guo não foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de espécies reativas causado pela administração crônica de Hcy [F (3,23) = 5,665; p < 0,01]; Entretanto, ela foi capaz de prevenir a diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes SOD [F (3,20) = 20,197; p < 0,001] Figura 5 (a) e CAT [F (3,20) = 4,309; p < 0,05] Figura 5 (b) causadas pela Hcy. A Guo não foi capaz de alterar, *per se*, nenhum dos parâmetros citados anteriormente.

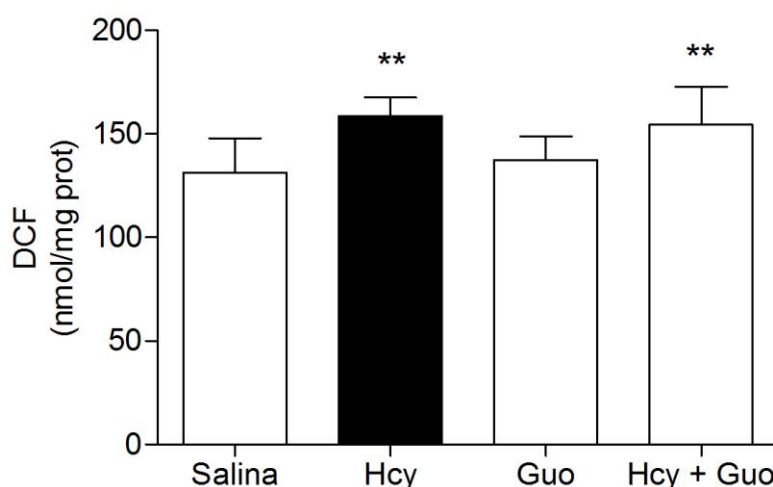


Figura 4. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanosina sobre níveis de espécies reativas em hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média \pm DP para 5-7 animais em cada grupo. **p<0,01 comparado com controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanosina.

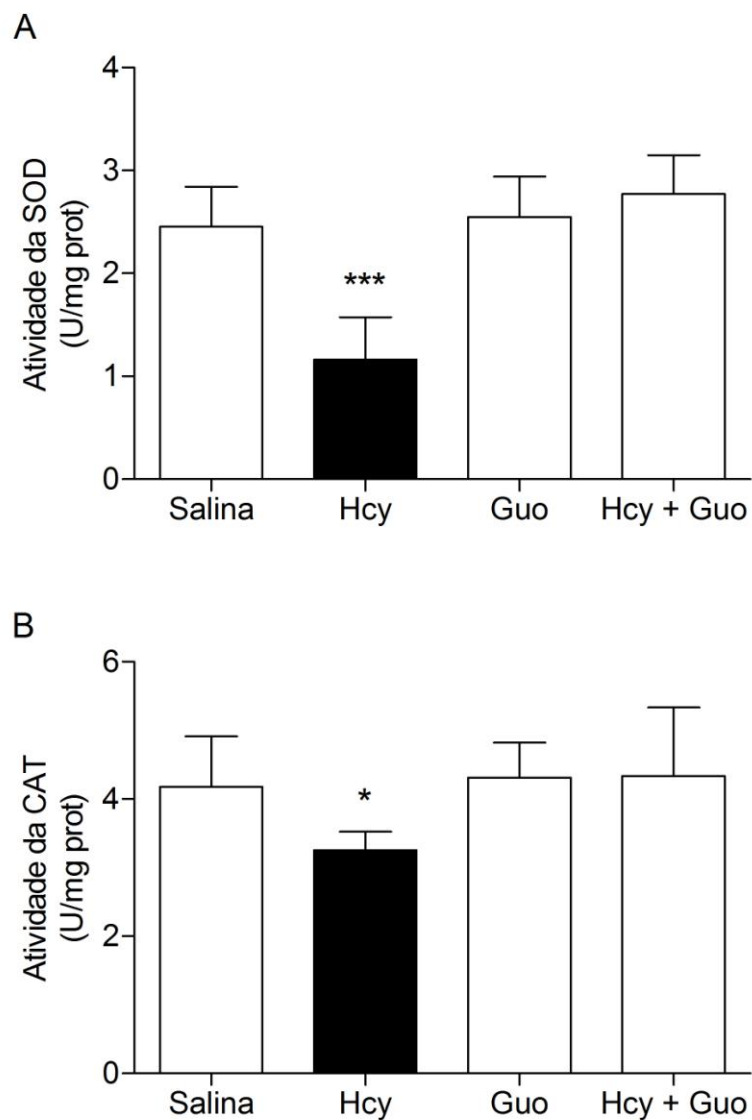


Figura 5. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanósina sobre a atividade da superóxido dismutase (A) e catalase (B) em hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média \pm DP para 5-7 animais em cada grupo. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ comparado com controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanósina.

A seguir, avaliamos se o estresse oxidativo causado pela Hcy promove danos às biomoléculas (lipídios e proteínas) no hipocampo de ratos submetidos ao modelo experimental crônico de hiper-homocisteinemia severa. Como observado na figura 6, a Hcy promoveu aumento no TBARS, um marcador de lipoperoxidação; a Guo não foi capaz de prevenir tal alteração [F (3,20) = 7,378; p < 0,01]. Na figura 7, mostramos que a administração crônica de Hcy diminuiu os níveis totais de sulfidrilas, uma medida de dano protéico. A Guo, *per se*, não alterou os níveis de sulfidrilas, mas foi capaz de prevenir tal efeito causado pela Hcy [F (3,20) = 4,705; p < 0,05].

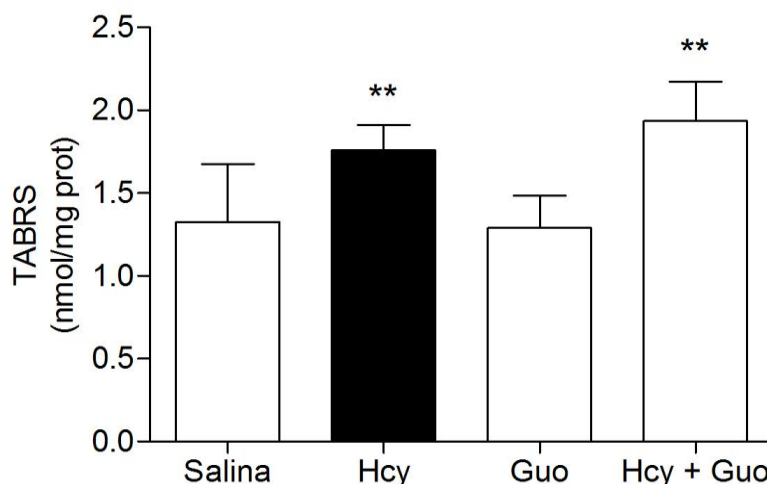


Figura 6. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanósina sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média \pm DP para 5-7 animais em cada grupo. **p<0,01 comparado com controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanósina.

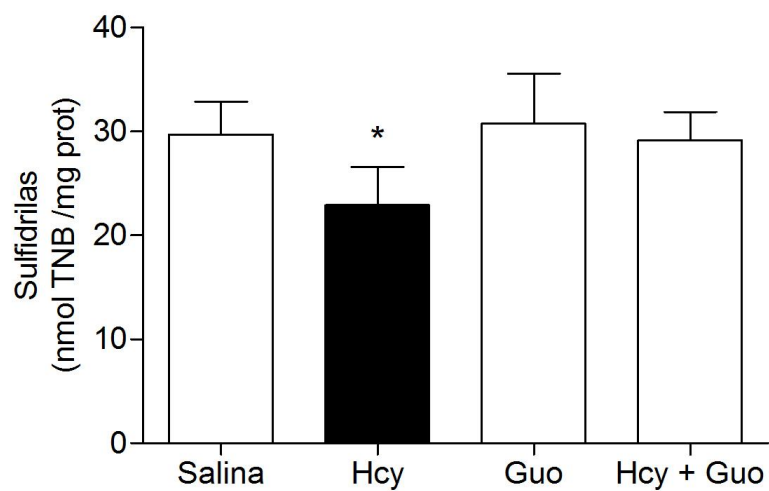


Figura 7. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanósina sobre níveis totais de sulfidrilas em hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média \pm DP para 5-7 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanósina.

Para melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a Hcy exerce sua neurotoxicidade, também investigamos o efeito da administração crônica de Hcy sobre alguns parâmetros de metabolismo energético (Complexo II, COX e níveis de ATP). A figura 8 mostra que a administração de Hcy e/ou Guo, não alterou a atividade do complexo II da cadeia respiratória [$F(3,24) = 1,834$; $p > 0,05$]. Entretanto, a figura 9 mostra que a hiper-homocisteinemia crônica severa diminuiu a atividade da COX em hipocampo de ratos jovens e que a Guo apesar de não alterar, *per se*, esse parâmetro, preveniu tal alteração [$F(3,20) = 4,427$; $p < 0,05$]. Por fim, analisamos o efeito da administração de Hcy e/ou Guo sobre os níveis de ATP, e os nossos resultados mostraram que não houve alteração significativa em nenhum dos grupos avaliados [$F(3,20) = 0,133$; $p > 0,05$] (figura 10).

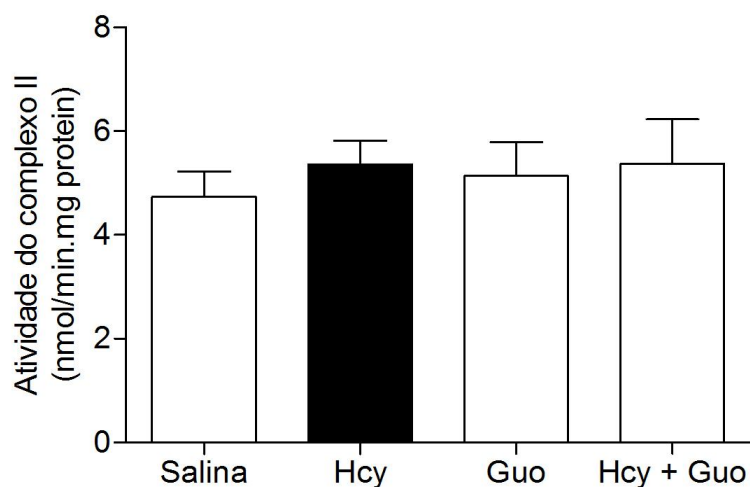


Figura 8. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanósina sobre a atividade do complexo II em hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média \pm DP para 5-7 animais em cada grupo. $p > 0,05$ (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanósina.

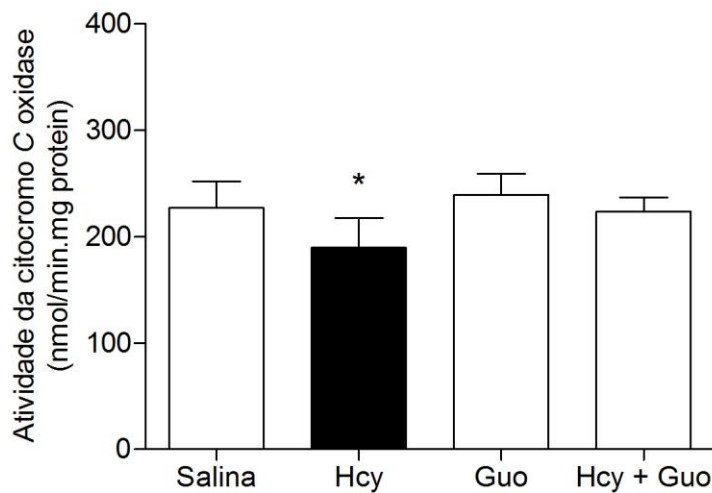


Figura 9. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanósina sobre a atividade do citocromo C oxidase em hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média \pm DP para 5-7 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanósina.

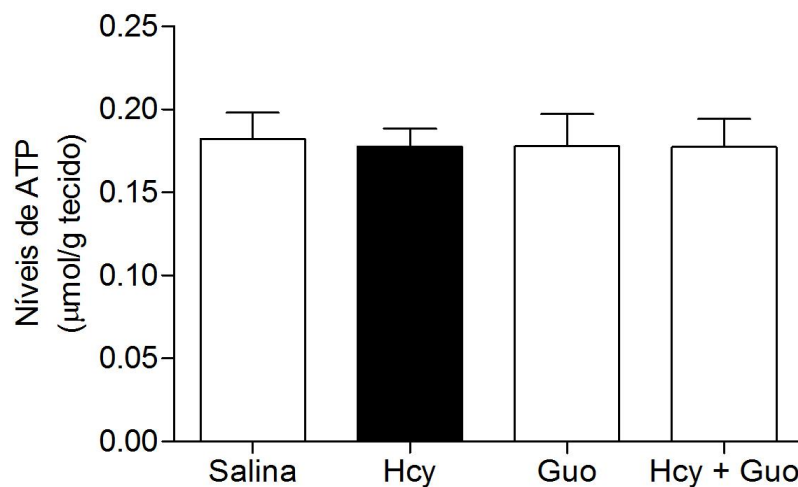


Figura 10. Efeito da administração crônica de homocisteína e/ou guanósina sobre os níveis de ATP em hipocampo de ratos jovens. Os dados estão expressos como média \pm DP para 5-7 animais em cada grupo. $p > 0,05$ (ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan). Hcy: homocisteína; Guo: guanósina.

III. DISCUSSÃO

A HCU é um EIM, que ocorre devido ao acúmulo de Hcy, causada pela deficiência da enzima CBS, resultando no bloqueio da via metabólica de transulfuração da Hcy à cisteína. A HCU foi reportada pela primeira vez em 1969 por McCully, com a identificação de homocistina [duas moléculas de Hcy ligadas por ponte dissulfeto] na urina de uma paciente. Clinicamente, pacientes afetados apresentam manifestações neurológicas, tais como retardo mental, transtornos psiquiátricos e convulsões, os quais ainda possuem fisiopatologia desconhecida (McCully, 1969; Mudd *et al.*, 2001).

Para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos danos ocasionados por diversas doenças metabólicas que ocorrem em humanos, os modelos animais têm sido importantes instrumentos de pesquisa. Diversos modelos de EIM já foram desenvolvidos em nosso grupo, tais como a fenilcetonúria (Wyse *et al.*, 1995), a hiperprolinemia do tipo II (Moreira *et al.*, 1989) e também a HCU clássica (Streck *et al.*, 2002b).

Utilizando o modelo animal de HCU clássica, citado anteriormente, foram realizados diversos estudos em nosso grupo de pesquisa com a finalidade de compreender os mecanismos pelos quais a Hcy exerce efeitos tóxicos. Os resultados mostraram que a administração de Hcy alterou parâmetros de metabolismo energético (Streck *et al.*, 2003a), diminuiu a atividade da Na^+, K^+ -

ATPase (Matte et al., 2004) e induziu estresse oxidativo em cérebro de ratos (Wyse et al., 2002; Streck et al., 2003c; Matte et al., 2009). Além disso, a hiper-homocisteinemia crônica severa também diminuiu a captação de Glu em córtex parietal de ratos (Matte et al., 2010).

A captação de Glu é um mecanismo crucial de desativação de sinalização glutamatérgica no cérebro, mediada pelos transportadores de Glu (Danbolt, 2001). Com base nessas informações, decidimos expandir a nossa investigação, a fim de elucidar se essa alteração também ocorre no hipocampo, uma estrutura cerebral essencial para processos de memória espacial, e que tem se mostrado alterada em ratos submetidos à administração de Hcy (Streck et al., 2004). Nossos resultados mostraram que a hiper-homocisteinemia crônica severa diminuiu significativamente a captação de Glu no hipocampo de ratos jovens.

Além disso, tem sido sugerido que a captação de Glu está associada à atividade da Na^+, K^+ -ATPase, desde que os transportadores de Glu são dependentes do gradiente eletroquímico de Na^+ gerado por esta enzima para realizar o transporte (Rose et al., 2009). Considerando o que foi exposto, também investigamos o efeito da administração de Hcy sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Nossos resultados mostraram que a Hcy diminuiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo de ratos. Portanto, a ineficaz captação de Glu encontrada em hipocampo de ratos submetidos à hiper-homocisteinemia crônica severa, pode estar intimamente ligada à inibição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase apresentada em nosso estudo.

Uma vez que os radicais livres podem prejudicar o transporte de Glu pela oxidação direta do grupamento-SH da proteína transportadora (Volterra et al., 1994; Sheldon and Robinson, 2007) e inibir a Na⁺,K⁺-ATPase (Siems et al., 1996; Potts et al., 2006; Pari and Murugavel, 2007), investigamos a influência da Vit C, um antioxidante clássico, sobre os efeitos causados pela Hcy na captação de Glu e sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. Nossos resultados mostraram que a Vit C foi capaz de prevenir a diminuição na captação de Glu e a inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase causadas pela Hcy, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo em tais efeitos.

Espécies reativas podem ser geradas de diversas formas pela Hcy, entre elas via auto-oxidação, produzindo superóxido (Loscalzo, 1996; Dayal et al., 2004; Faraci and Lentz, 2004), e via superativação dos receptores NMDA (Lipton et al., 1997; Das, 2003), permitindo o influxo excessivo de Ca²⁺ e a ativação da óxido nítrico sintase, com consequente produção de espécies reativas em neurônios. Considerando que essas alterações podem levar a um prejuízo na função neuronal e pré-dispor ao dano cerebral (Culcasi et al., 1994; Gbadegesin et al., 1999; White et al., 2001; Nelson et al., 2003), estendemos nosso estudo para investigar outros parâmetros de estresse oxidativo que podem estar relacionados aos efeitos tóxicos da Hcy no hipocampo de ratos.

Nossos resultados mostraram que administração crônica de Hcy aumentou os níveis de espécies reativas em hipocampo de ratos jovens e que a Vit C foi capaz de prevenir tal efeito. No entanto, observamos que Vit C, *per se*, também

aumentou os níveis de espécies reativas. Esse achado está de acordo com estudo (Bromme et al., 2008) que mostrou o efeito pró-oxidante da Vit C sobre a oxidação do DCFH induzida por OH^\cdot . Além disso, outros estudos recentes têm demonstrado que essa vitamina pode atuar como pró-oxidante, gerando peróxido de hidrogênio e radical ascorbato em concentrações farmacológicas (Chen et al., 2007; Chen et al., 2008).

Posteriormente, no presente trabalho, analisamos o efeito da hiperhomocisteinemia crônica severa sobre as defesas antioxidantes enzimáticas, que são responsáveis pela remoção de espécies reativas no nosso organismo. Resultados mostraram que a administração crônica de Hcy reduziu as atividades da SOD e da CAT no hipocampo de ratos e que a administração de Vit C preveniu tais efeitos. Acreditamos que esse desequilíbrio entre as enzimas antioxidantes, causado pela Hcy, provavelmente altere a eliminação de espécies reativas, aumentando a quantidade de radicais livres. Esses efeitos observados podem estar relacionados, pelo menos em parte, à capacidade da Hcy em inibir a expressão de enzimas antioxidantes como já foi observado na GHS-Px e SOD (Upchurch et al., 1997; Yamamoto et al., 2000).

Embora não possamos explicar precisamente os mecanismos pelos quais a Hcy exerce seus efeitos sobre o metabolismo glutamatérgico é razoável propor que o estresse oxidativo pode estar envolvido em tais alterações, desde que a Vit C, um antioxidante clássico, preveniu os efeitos oxidativos da Hcy e a inibição da Na^+, K^+ -ATPase. Em conjunto, esses dados sugerem que a Hcy induz estresse

oxidativo, prejudicando direta e indiretamente a captação de Glu através do efeito das espécies reativas sobre os transportadores e sobre a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, respectivamente.

A seguir, investigamos o possível efeito protetor da Guo sobre as alterações causadas pela Hcy, desde que esse nucleotídeo tem demonstrado efeito modulador em modelos animais que envolvem o metabolismo glutamatérgico (Dalcim *et al.*; Ferreira *et al.*; Molz *et al.*, 2009). Estudos prévios mostraram que hiperhomocisteinemia crônica severa diminuiu a captação de Glu em córtex parietal e hipocampo de ratos (Matte *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2011) e o imunocontéudo dos transportadores GLAST e GLT-1 em córtex parietal de ratos (Matte *et al.*, 2010). Porém, nossos resultados mostraram que a Guo não foi capaz de prevenir a diminuição na captação de Glu causada pela administração crônica de Hcy em hipocampo de ratos.

Como mostrado no capítulo I dessa dissertação, a Hcy inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratos de 21 dias. A Guo preveniu tal efeito causado pela Hcy. Com o intuito de avaliar os mecanismos envolvidos nessa prevenção, avaliamos o efeito da administração de Hcy e/ou Guo sobre o imunocontéudo das subunidades catalíticas da Na^+, K^+ -ATPase α_1 , α_2 e α_3 . Nossos resultados mostraram que a administração crônica de Hcy diminuiu o imunocontéudo da subunidade α_1 da Na^+, K^+ -ATPase, e não alterou as subunidades α_2 e α_3 . Nossos experimentos também mostraram que a Guo foi capaz de prevenir essa alteração no imunocontéudo da subunidade α_1 ,

fundamental para a função catalítica da Na^+, K^+ -ATPase neuronal, indicando um possível mecanismo neuroprotetor sobre a inibição dessa enzima. Nossos achados permitem sugerir que a ineficácia da Guo em prevenir os efeitos da Hcy sobre o sistema glutamatérgico hipocampal possa ser devido aos complexos mecanismos pelos quais a Hcy atua nesse sistema, tais como nos transportadores de Glu. Novos estudos serão necessários para elucidar os mecanismos dos efeitos da Hcy sobre o sistema glutamatérgico.

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, a Guo não preveniu o aumento das espécies reativas causado pela Hcy, porém foi capaz de prevenir a inibição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em hipocampo de ratos. Apesar de a Guo ter prevenido a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes causada pela Hcy, provavelmente, essa modulação não foi suficiente para a depuração total dos níveis de espécies reativas presentes em hipocampo de ratos, como veremos a seguir.

O efeito da administração crônica de Hcy e da Guo sobre os níveis de TBARS, um parâmetro clássico para avaliação de peroxidação lipídica foi investigado. Nossos resultados mostraram que a administração crônica de Hcy aumentou os níveis de TBARS no hipocampo de ratos jovens. Porém, a administração concomitante de Guo não foi capaz de prevenir tal alteração.

Considerando que a Hcy é conhecida como um potente agente oxidante do grupamento-SH, induzindo a produção de espécies reativas (Radi et al., 1991)

através da sua auto-oxidação (Dayal *et al.*, 2004; Faraci and Lentz, 2004), avaliamos também outro indicador de dano tecidual, os níveis de sulfidrilas. Os resultados indicaram que a hiper-homocisteinemia crônica severa diminuiu os níveis de sulfidrilas no hipocampo de ratos, e que a Guo preveniu tal alteração. Sabendo que os grupos sulfidrilas são essenciais para a atividade catalítica da Na^+, K^+ -ATPase (Radi *et al.*, 1991; Kurella *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003), podemos sugerir que a prevenção das sulfidrilas é um mecanismo pelo qual a Guo age como protetor na diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

Baseado em estudos que mostram que anormalidades no metabolismo energético parecem estar envolvidas na fisiopatologia de doenças que afetam o SNC (Heales *et al.*, 1999; Blass, 2001; Schurr, 2002; Beal, 2005; Petrozzi *et al.*, 2007), avaliamos o efeito da hiper-homocisteinemia crônica severa sobre as atividades do complexo II e da enzima COX em ratos de 21 dias. Nossos resultados mostraram que a administração crônica de Hcy não alterou a atividade do complexo II, porém diminuiu a atividade da enzima COX, sugerindo que a Hcy pode alterar o funcionamento da cadeia respiratória em cérebro de ratos jovens. Além disso, também mostramos que a Guo foi capaz de prevenir a diminuição na atividade da COX.

A COX, complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, catalisa a transferência de elétrons do citocromo *c* para o O_2 (Capaldi, 1990). Tem sido descrito que os radicais livres podem danificar os componentes mitocondriais (Sharpe and Cooper, 1998; Cadenas and Davies, 2000) e que produtos da

peroxidação lipídica como o malondialdeído podem prejudicar a atividade da COX (Chen et al., 2000; Chen et al., 2001), podendo levar à redução incompleta do O₂ e, por consequência, à formação de radicais livres e diminuição da produção de ATP (Gupta et al., 2001; Milatovic et al., 2001).

Considerando que uma inibição na atividade da COX pode estar relacionada a uma menor disponibilidade de ATP (Gupta et al., 2001; Milatovic et al., 2001), avaliamos os níveis de ATP no hipocampo de ratos submetidos à administração crônica de Hcy e/ou Guo. Nossos resultados mostraram que os níveis de ATP não foram alterados pela hiper-homocisteinemia crônica, e nem pela administração de Guo. Nossos dados corroboram com estudos que mostram que a produção de ATP é regulada por inúmeros mecanismos compensatórios mitocondriais, a fim de manter a respiração celular e a produção de ATP, mesmo quando as células são submetidas a insultos (Rossignol et al., 2003). Esses mecanismos incluem complexos da cadeia respiratória estocados como reserva na matriz mitocondrial, conhecidos como supercomplexos (Rossignol et al., 2003). Nossos achados reforçam a hipótese que a inibição da Na⁺,K⁺-ATPase causada pela Hcy é devido principalmente ao estresse oxidativo uma vez que o fornecimento de energia para a sua atividade parece não estar prejudicado.

Embora os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral presente nos pacientes homocistinúricos sejam pouco conhecidos, demonstramos ao longo desse trabalho que a HCU clássica experimental comprometeu o metabolismo glutamatérgico cerebral provavelmente através da indução do estresse oxidativo,

pela inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e/ou por outros mecanismos que necessitam ser avaliados no futuro, tal como os transportadores de glutamato. Também demonstramos que a Hcy prejudicou o metabolismo energético, observado através da diminuição da COX, e não alterou os níveis de ATP. Através da administração da Vit C e Guo mostramos algumas possibilidades de prevenção para os efeitos causados pela Hcy. Esses achados podem ser relevantes para o entendimento das alterações neurológicas presentes na HCU clássica e como possíveis estratégias de neuroproteção.

IV. CONCLUSÕES

1. A administração crônica de Hcy diminui a captação de Glu em hipocampo de ratos jovens;
2. A hiper-homocisteinemia crônica severa reduz a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e diminui o imunoconteúdo da subunidade catalítica α_1 dessa enzima em hipocampo;
3. A hiper-homocisteinemia crônica severa aumenta o nível de espécies reativas em hipocampo de ratos;
4. A administração crônica de Hcy diminui a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT na mesma estrutura;
5. A hiper-homocisteinemia crônica severa aumenta o dano a biomoléculas (TBARS e SULFIDRILAS);
6. A administração crônica de Hcy diminui a atividade da COX, e não altera a atividade do complexo II e níveis de ATP em hipocampo;
7. A administração concomitante de Vit C previne alterações no metabolismo glutamatérgico (captação de Glu), na atividade da Na^+, K^+ -ATPase e em parâmetros de estresse oxidativo (DCFH e atividade da SOD e CAT), causados pela Hcy em hipocampo de ratos jovens;
8. A administração concomitante de Guo previne a diminuição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase e no imunoconteúdo da sua subunidade α_1 , a inibição das enzimas antioxidantes SOD e CAT, os níveis de sulfidrilas, bem como a

diminuição da COX em hipocampo de ratos de 21 dias submetidos a HCU clássica experimental.

A partir desses achados sugerimos que a administração da Vit C e da Guo pode ser benéfica como terapia adjuvante na homocistinúria clássica. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nas modulações mostradas nesse estudo.

V. PERSPECTIVAS

- Investigar o efeito da administração crônica de Hcy sobre o imunoconteúdo dos transportadores de Glu GLAST e GLT-1 em hipocampo de ratos jovens;
- Avaliar o efeito da hiper-homocisteinemia crônica severa sobre a atividade da enzima glutamina sintetase em hipocampo;
- Avaliar o efeito neuroprotetor da administração crônica de Vit C sobre a alteração da COX;
- Avaliar o efeito da administração crônica de Hcy e/ou Guo e Vit C sobre outros parâmetros mitocondriais, tais como massa e potencial de membrana mitocondrial.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adinolfi, L.E., Ingrosso, D., Cesaro, G., Cimmino, A., D'Anto, M., Capasso, R., Zappia, V., Ruggiero, G., 2005. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 41, 995-1003.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302, 141-145.
- Banhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskas, F., Mandl, J., 1997. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic Biol Med* 23, 793-803.
- Beal, M.F., 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 58, 495-505.
- Berger, U.V., Hediger, M.A., 2000. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 421, 385-399.
- Blanco, G., Mercer, R.W., 1998. Isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275, F633-650.
- Blass, J.P., 2001. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res* 66, 851-856.
- Bottiglieri, T., 2005. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 1103-1112.

- Bowman, G.L., Dodge, H., Frei, B., Calabrese, C., Oken, B.S., Kaye, J.A., Quinn, J.F., 2009. Ascorbic acid and rates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16, 93-98.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradshaw, M.P., Barril, C., Clark, A.C., Prenzler, P.D., Scollary, G.R., 2011. Ascorbic acid: a review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51, 479-498.
- Bromme, H.J., Zuhlke, L., Silber, R.E., Simm, A., 2008. DCFH2 interactions with hydroxyl radicals and other oxidants--influence of organic solvents. *Exp Gerontol* 43, 638-644.
- Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A., 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 145, 532-541.
- Burton, B.K., 1987. Inborn errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics* 79, 359-369.
- Butterfield, D.A., Bader Lange, M.L., Sultana, R., 2010. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801, 924-929.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222-230.
- Capaldi, R.A., 1990. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59, 569-596.

- Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157, 375-380.
- Chen, J., Henderson, G.I., Freeman, G.L., 2001. Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1919-1927.
- Chen, J., Petersen, D.R., Schenker, S., Henderson, G.I., 2000. Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcohol Clin Exp Res* 24, 544-552.
- Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Lee, J.H., Krishna, M.C., Shacter, E., Choyke, P.L., Pooput, C., Kirk, K.L., Buettner, G.R., Levine, M., 2007. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8749-8754.
- Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Pooput, C., Kirk, K.L., Krishna, M.C., Khosh, D.B., Drisko, J., Levine, M., 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11105-11109.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Bruno, V., Battaglia, G., D'Alimonte, I., D'Onofrio, M., Nicoletti, F., Caciagli, F., 1999. Activation of A(1) adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia* 27, 275-281.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., D'Alimonte, I., Giuliani, P., Florio, T., Caciagli, F., Middlemiss, P.J., Rathbone, M.P., 2000. Cultured astrocyte proliferation

induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia* 29, 202-211.

Clarke, R., Daly, L., Robinson, K., Naughten, E., Cahalane, S., Fowler, B., Graham, I., 1991. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324, 1149-1155.

Cruysberg, J.R., Boers, G.H., Trijbels, J.M., Deutman, A.F., 1996. Delay in diagnosis of homocystinuria: retrospective study of consecutive patients. *BMJ* 313, 1037-1040.

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.

Dal-Cim, T., Martins, W.C., Santos, A.R., Tasca, C.I., Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience* 183, 212-220.

Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.

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 Oliveira, D.L., Horn, J.F., Rodrigues, J.M., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S., 2004. Quinolinic acid promotes seizures and decreases

- glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res* 1018, 48-54.
- Delwing, D., Tagliari, B., Streck, E.L., Wannamacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003. Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. *Brain Res* 983, 58-63.
- Di Iorio, P., Ballerini, P., Traversa, U., Nicoletti, F., D'Alimonte, I., Kleywegt, S., Werstiuk, E.S., Rathbone, M.P., Caciagli, F., Ciccarelli, R., 2004. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia* 46, 356-368.
- Dias, P.M.T., Mezzomo, A., Peteffi, C., Pezzi, D.R., 2001. Homocisteína: Um fator de risco vascular. *Revista Científica da AMECS* 1, 53-58.
- Englard, S., Seifter, S., 1986. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr* 6, 365-406.
- Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I.A., 2004. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol* 73, 397-445.
- Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43, 37-71.
- Fambrough, D.M., Lemas, M.V., Hamrick, M., Emerick, M., Renaud, K.J., Inman, E.M., Hwang, B., Takeyasu, K., 1994. Analysis of subunit assembly of the Na-K-ATPase. *Am J Physiol* 266, C579-589.
- Faraci, F.M., Lentz, S.R., 2004. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 35, 345-347.
- Ferreira, A.G., da Cunha, A.A., Scherer, E.B., Machado, F.R., da Cunha, M.J., Braga, A., Mussulini, B.H., Moreira, J.D., Wofchuk, S., Souza, D.O., Wyse,

- A.T., Evidence that Hyperprolinemia Alters Glutamatergic Homeostasis in Rat Brain: Neuroprotector Effect of Guanosine. *Neurochem Res* 37, 205-213.
- Ferreira, A.G., Lima, D.D., Delwing, D., Mackedanz, V., Tagliari, B., Kolling, J., Schuck, P.F., Wajner, M., Wyse, A.T., 2010. Proline impairs energy metabolism in cerebral cortex of young rats. *Metab Brain Dis* 25, 161-168.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C., Janssen, A.J., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153, 23-36.
- Fowler, B., 1997. Disorders of homocysteine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 20, 270-285.
- Fowler, B., Jakobs, C., 1998. Post- and prenatal diagnostic methods for the homocystinurias. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2, S88-93.
- Frizzo, M.E., Lara, D.R., Prokopiuk Ade, S., Vargas, C.R., Salbego, C.G., Wajner, M., Souza, D.O., 2002. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol* 22, 353-363.
- Fuso, A., Nicolia, V., Ricceri, L., Cavallaro, R.A., Isopi, E., Mangia, F., Fiorenza, M.T., Scarpa, S., 2012. S-adenosylmethionine reduces the progress of the Alzheimer-like features induced by B-vitamin deficiency in mice. *Neurobiol Aging*.

- Gallucci, M., Zanardo, A., De Valentin, L., Vianello, A., 2004. Homocysteine in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Gerontol Geriatr Suppl*, 195-200.
- Gazzaruso, C., Coppola, A., Montalcini, T., Baffero, E., Garzaniti, A., Pelissero, G., Collaviti, S., Grugnetti, A., Gallotti, P., Pujia, A., Solerte, S.B., Giustina, A., 2012. Lipoprotein(a) and homocysteine as genetic risk factors for vascular and neuropathic diabetic foot in type 2 diabetes mellitus. *Endocrine* 41, 89-95.
- 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, C673-683.
- Gebara, K.S., Matioli, G., 2006. Relação da hiper-homocisteinemia com a doença cardiovascular e a doença de Alzheimer. *Revista Brasileira de Nutrição* 21, 239-243.
- Giugliani, R., 1988. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatrics Moderna* 23, 29-40.
- Grisar, T., Guillaume, D., Delgado-Escueta, A.V., 1992. Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res* 12, 141-149.
- Gudermann, T., Schoneberg, T., Schultz, G., 1997. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 20, 399-427.

- Gupta, R.C., Milatovic, D., Dettbarn, W.D., 2001. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. *Neurotoxicology* 22, 271-282.
- Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97, 1634-1658.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. Oxford University Press, New York.
- 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.
- Hamelet, J., Maurin, N., Fulchiron, R., Delabar, J.M., Janel, N., 2007. Mice lacking cystathionine beta synthase have lung fibrosis and air space enlargement. *Exp Mol Pathol* 83, 249-253.
- 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.
- Heales, S.J., Bolanos, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M., Clark, J.B., 1999. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 1410, 215-228.
- Herrmann, W., Lorenz, S., Obeid, R., 2007. [Review of the role of hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiency in neurological and psychiatric disorders--current evidence and preliminary recommendations]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 75, 515-527.

- Jacobsen, D.W., 2000. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1182-1184.
- Jiang, H., Wang, X.F., Fang, L., Tang, C., Zhu, Y., Wang, X., 2005. Upregulation of aldose reductase by homocysteine in type II alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 1084-1091.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., Karlsh, S.J., 2003. Structure and mechanism of Na⁺,K⁺-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* 65, 817-849.
- Jovicic, M.E., Popovic, M., Nestic, K.J., Popovic, N., Pavlovic, S.J., Rakic, L., 2008. Aging, aluminium and basal forebrain lesions modify substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase in the rat. *J Alzheimers Dis* 14, 85-93.
- Kanner, B.I., 2006. Structure and function of sodium-coupled GABA and glutamate transporters. *J Membr Biol* 213, 89-100.
- Kaplan, J.H., 2002. Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71, 511-535.
- Khanna, S., Kapoor, P., Pillai, K.K., Vohora, D., 2011. Homocysteine in neurological disease: a marker or a cause? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10, 361-369.
- 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.
- Kuhn, W., Roebroek, R., Blom, H., van Oppenraaij, D., Przuntek, H., Kretschmer, A., Buttner, T., Voitalla, D., Muller, T., 1998. Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 40, 225-227.

- Kurella, E.G., Tyulina, O.V., Boldyrev, A.A., 1999. Oxidative resistance of Na/K-ATPase. *Cell Mol Neurobiol* 19, 133-140.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5, 227-231.
- Lipton, S.A., Kim, W.K., Choi, Y.B., Kumar, S., D'Emilia, D.M., Rayudu, P.V., Arnette, D.R., Stamler, J.S., 1997. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5923-5928.
- Loscalzo, J., 1996. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 98, 5-7.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Machado, F.R., Ferreira, A.G., da Cunha, A.A., Tagliari, B., Mussulini, B.H., Wofchuk, S., Wyse, A.T., 2011. Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C. *Metab Brain Dis* 26, 61-67.
- Mancuso, M., Orsucci, D., LoGerfo, A., Calsolaro, V., Siciliano, G., 2010. Clinical features and pathogenesis of Alzheimer's disease: involvement of mitochondria and mitochondrial DNA. *Adv Exp Med Biol* 685, 34-44.
- Marklund, S.L., 1985. Pyrogallol autoxidation. In: RA, G. (Ed.), *Handbook for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 243-247.

- Matte, C., Mackedanz, V., Stefanello, F.M., Scherer, E.B., Andreazza, A.C., Zanotto, C., Moro, A.M., Garcia, S.C., Goncalves, C.A., Erdtmann, B., Salvador, M., Wyse, A.T., 2009. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int* 54, 7-13.
- Matte, C., Monteiro, S.C., Calcagnotto, T., Bavaresco, C.S., Netto, C.A., Wyse, A.T., 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.
- Matte, C., Mussulini, B.H., dos Santos, T.M., Soares, F.M., Simao, F., Matte, A., de Oliveira, D.L., Salbego, C.G., Wofchuk, S.T., Wyse, A.T., 2010. Hyperhomocysteinemia reduces glutamate uptake in parietal cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 28, 183-187.
- McCully, K.S., 1969. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56, 111-128.
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130, 1007S-1015S.
- Milatovic, D., Zivin, M., Gupta, R.C., Dettbarn, W.D., 2001. Alterations in cytochrome c oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus. *Brain Res* 912, 67-78.
- Molz, S., Dal-Cim, T., Tasca, C.I., 2009. Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. *Neurochem Int* 55, 703-709.

- Moreira, J.C., Wannmacher, C.M., Costa, S.M., Wajner, M., 1989. Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. *Pharmacol Biochem Behav* 32, 885-890.
- Mudd, S.H., Levy, H.L., Skovby, F., 2001. Disorders of Transsulfuration. In: SCRIVER, C.R.B., A.L.; SLY, W.S.; VALLED, D. (Ed.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill New York, pp. 1279-1327.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2006. *Lehninger Princípios de bioquímica*. São Paulo.
- Nelson, E.J., Connolly, J., McArthur, P., 2003. Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol Cell* 95, 3-8.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.
- Padayatty, S.J., Sun, A.Y., Chen, Q., Espey, M.G., Drisko, J., Levine, M., Vitamin C: intravenous use by complementary and alternative medicine practitioners and adverse effects. *PLoS One* 5, e11414.
- Pari, L., Murugavel, P., 2007. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology* 234, 44-50.
- Peterkofsky, B., 1991. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 54, 1135S-1140S.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-356.
- Petrozzi, L., Ricci, G., Giglioli, N.J., Siciliano, G., Mancuso, M., 2007. Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci Rep* 27, 87-104.

- Potts, M.B., Koh, S.E., Whetstone, W.D., Walker, B.A., Yoneyama, T., Claus, C.P., Manvelyan, H.M., Noble-Haeusslein, L.J., 2006. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *NeuroRx* 3, 143-153.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266, 4244-4250.
- Rathbone, M., Pilutti, L., Caciagli, F., Jiang, S., 2008. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27, 666-672.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 59, 663-690.
- Rech, V.C., Feksa, L.R., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., Wajner, M., Wannmacher, C.M., 2002. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 27, 353-357.
- Rice, M.E., 2000. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 23, 209-216.
- Rose, A.M., Valdes, R., Jr., 1994. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem* 40, 1674-1685.
- Rose, E.M., Koo, J.C., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Angers, S., Hampson, D.R., 2009. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci* 29, 8143-8155.

- Rose, R.C., Bode, A.M., 1993. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J* 7, 1135-1142.
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J.P., Letellier, T., 2003. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 370, 751-762.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228, 35-51.
- Sachdev, P.S., 2004. Homocysteine and neuropsychiatric disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 26, 50-56.
- Salvador, M., Henriques, J.A.P., 2004. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Editora da Ulbra, Canoas.
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., de Faria Maraschin, J., da Silveira Perla, A., Onofre Souza, D., 2000. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res* 864, 40-43.
- Schmidt, A.P., Tort, A.B., Silveira, P.P., Bohmer, A.E., Hansel, G., Knorr, L., Schallenberger, C., Dalmaz, C., Elisabetsky, E., Crestana, R.H., Lara, D.R., Souza, D.O., 2009. The NMDA antagonist MK-801 induces hyperalgesia and increases CSF excitatory amino acids in rats: reversal by guanosine. *Pharmacol Biochem Behav* 91, 549-553.
- Schurr, A., 2002. Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. *Neurochem Int* 41, 1-8.
- Scriver, C.R., Beaudet, A.A., Sly, W.S., Valle, D., 2001. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York, McGraw-Hill.

- Sharpe, M.A., Cooper, C.E., 1998. Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J Biol Chem* 273, 30961-30972.
- Sheldon, A.L., Robinson, M.B., 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 51, 333-355.
- Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L., 2006. Basic neurochemistry. Academic Press, California, USA.
- Siems, W.G., Hapner, S.J., van Kuijk, F.J., 1996. 4-hydroxynonenal inhibits Na^+, K^+ -ATPase. *Free Radic Biol Med* 20, 215-223.
- Silva, L.F., Hoffmann, M.S., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Lima, F.D., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Figuera, M.R., Royes, L.F., 2011. The involvement of Na^+, K^+ -ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury. *J Neurol Sci* 308, 35-40.
- Sjostrom, M., Stenstrom, K., Eneling, K., Zwiller, J., Katz, A.I., Takemori, H., Bertorello, A.M., 2007. SIK1 is part of a cell sodium-sensing network that regulates active sodium transport through a calcium-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16922-16927.
- Skou, J.C., Esmann, M., 1992. The Na, K -ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24, 249-261.
- Stefanello, F.M., Ferreira, A.G., Pereira, T.C., da Cunha, M.J., Bonan, C.D., Bogo, M.R., Wyse, A.T., 2011. Acute and chronic hypermethioninemia alter

- Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. *Int J Dev Neurosci* 29, 483-488.
- Streck, E.L., Bavaresco, C.S., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2004. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 153, 377-381.
- Streck, E.L., Delwing, D., Tagliari, B., Matte, C., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003a. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem Int* 43, 597-602.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P.S., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003b. Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia. *Biochim Biophys Acta* 1637, 187-192.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P.S., Rombaldi, F., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2002a. Reduction of Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochem Res* 27, 1593-1598.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P.S., Rombaldi, F., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2002b. Reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochem Res* 27, 1593-1598.
- Streck, E.L., Vieira, P.S., Wannmacher, C.M., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003c. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18, 147-154.

- Taguchi, K., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Maekawa, S., 2007. Ouabain-induced isoform-specific localization change of the Na⁺, K⁺-ATPase alpha subunit in the synaptic plasma membrane of rat brain. *Neurosci Lett* 413, 42-45.
- Upchurch, G.R., Jr., Welch, G.N., Fabian, A.J., Freedman, J.E., Johnson, J.L., Keaney, J.F., Jr., Loscalzo, J., 1997. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 272, 17012-17017.
- Volterra, A., Trotti, D., Racagni, G., 1994. Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol* 46, 986-992.
- Walter, J.H., Wraith, J.E., White, F.J., Bridge, C., Till, J., 1998. Strategies for the treatment of cystathionine beta-synthase deficiency: the experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2, S71-76.
- 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 Engl J Med* 338, 1042-1050.
- Wetzel, R.K., Arystarkhova, E., Sweadner, K.J., 1999. Cellular and subcellular specification of Na⁺,K⁺-ATPase alpha and beta isoforms in the postnatal development of mouse retina. *J Neurosci* 19, 9878-9889.

- White, A.R., Huang, X., Jobling, M.F., Barrow, C.J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Bush, A.I., Cappai, R., 2001. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem* 76, 1509-1520.
- Wilson, J.X., 2009. Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *Biofactors* 35, 5-13.
- Witt, K.A., Mark, K.S., Hom, S., Davis, T.P., 2003. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2820-2831.
- Wyse, A.T., Netto, C.A., 2011. Behavioral and neurochemical effects of proline. *Metab Brain Dis*.
- Wyse, A.T., Zugno, A.I., Streck, E.L., Matte, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M., 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.
- Wyse, A.T.S., Bolognesi, G., Brusque, A.M., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 1995. Na⁺,K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med Sci Res* 23, 261-263.
- 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, 971-975.

- Yamamoto, M., Hara, H., Adachi, T., 2000. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 486, 159-162.
- Zieminska, E., Stafiej, A., Lazarewicz, 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.
- Zschocke, J., Kebbewar, M., Gan-Schreier, H., Fischer, C., Fang-Hoffmann, J., Wilrich, J., Abdoh, G., Ben-Omran, T., Shahbek, N., Lindner, M., Al Rifai, H., Al Khal, A.L., Hoffmann, G.F., 2009. Molecular neonatal screening for homocystinuria in the Qatari population. *Hum Mutat* 30, 1021-1022.

