

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

Tiago Marcon dos Santos

**AVALIAÇÃO EMOCIONAL, MOTORA E BIOQUÍMICO-MOLECULAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPER-HOMOCISTEINEMIA LEVE EM
ROEDORES**

Porto Alegre

2021

Tiago Marcon dos Santos

**AVALIAÇÃO EMOCIONAL, MOTORA E BIOQUÍMICO-MOLECULAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPER-HOMOCISTEINEMIA LEVE EM
ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Bioquímica.

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

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Tiago Marcon
AVALIAÇÃO EMOCIONAL, MOTORA E BIOQUÍMICO-MOLECULAR
EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPER-HOMOCISTEINEMIA LEVE
EM ROEDORES / Tiago Marcon dos Santos. -- 2021.
139 f.
Orientadora: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Tese (Doutorado) -- 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, 2021.

1. Homocisteína. 2. Estresse Oxidativo. 3.
Inflamação. 4. Comportamento. 5. Na⁺,K⁺-ATPase. I.
Wyse, Angela Terezinha de Souza, orient. II. Título.

Aos meus pais Odila e Wilson.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Angela Wyse por toda a orientação, exemplos e ensinamentos nesses anos de convivência. Obrigado pela acolhida e por sempre deixar as portas do seu laboratório abertas ao desenvolvimento humano-científico. Muito obrigado por tudo.

Agradeço aos meus pais e a minha irmã pelo amor e carinho incondicionais, por ser meu porto-seguro. Obrigado por terem sempre uma palavra de carinho e motivação. Essa realização não teria sido possível sem o apoio de vocês. Obrigado pelos exemplos de vida/de ser humano e por sempre incentivarem a busca pelo aprendizado/ensino/ciência independente das dificuldades. Obrigado a toda a minha família pelas trocas constantes e pelo apoio de sempre. Amo vocês!

Agradeço a todos os meus amigos pelo apoio, cumplicidade, parceria e companheirismo de sempre. Vocês fizeram as etapas dessa jornada serem mais amenas e reconfortantes, assim como fazem a vida ser mais feliz. Amo vocês.

Agradeço a todos os colaboradores/parceiros que, a partir das suas contribuições técnico-científicas e intelectuais, auxiliaram no desenvolvimento dessa tese. Muito Obrigado.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ao Departamento de Bioquímica e todos os seus funcionários pelo auxílio e prestação de serviço de ensino público, gratuito, de qualidade e excelência prestadas durante todos os anos que fui aluno da Universidade. Muito obrigado.

Agradeço aos órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dessa tese e ao longo da minha formação. Mudei somente a ordem!

Enfim, de um modo geral, agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desse projeto e para o desenvolvimento da ciência. Muito obrigado!

“O problema com o mundo é que as pessoas inteligentes estão cheias de dúvidas, enquanto os estúpidos estão cheios de confiança.” — Charles Bukowski

RESUMO

Níveis plasmáticos levemente elevados de homocisteína (Hcy), que caracterizam a hiperhomocisteinemia (HHcy), têm sido relacionados a perturbações na homeostase celular e são considerados um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, psiquiátricas e motoras. No entanto, os mecanismos pelos quais a Hcy exerce seu efeito tóxico ainda não estão completamente elucidados. Baseado nisso, o objetivo desta tese foi avaliar as possíveis alterações causadas pela HHcy leve crônica sobre parâmetros emocionais (testes do labirinto em cruz elevada, exploração claro-escuro e campo aberto, preferência pela sacarose 1%, natação forçada, ganho de peso corpóreo e relação peso adrenal/peso corpóreo) e motores (testes da caminhada em escada horizontal, trave de equilíbrio, suspensão e pole vertical) em ratos. Também investigamos possíveis alterações bioquímico-molecular estrutura-específico em uma ou mais estruturas cerebrais (amígdala, córtex pré-frontal, estriado e/ou cerebelo). Ratos Wistar foram submetidos a uma injeção subcutânea de Hcy (0,03 μ mol/g de peso corporal) duas vezes ao dia, dos 30 aos 60 dias de vida. Após a indução do modelo de HHcy leve crônica os animais foram submetidos à eutanásia e/ou aos testes emocionais/motores seguidos de eutanásia. A HHcy leve induziu comportamento semelhante à ansiedade, aumentou a produção de bolos fecais e o tempo para desenvolver tarefas em alguns aparatos dos testes ansiosos e motores, mas não alterou significativamente o comportamento semelhante à depressão e a motricidade dos animais. Quanto às análises bioquímicas, na amígdala, a HHcy leve aumentou as atividades das enzimas succinato desidrogenase (SDH) e complexo II, superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), Na⁺, K⁺-ATPase e glutamina sintetase, bem como os níveis de nitritos, o dano ao DNA e o imunocontéudo nuclear do fator nuclear eritróide 2 (Nrf-2). A atividade da citocromo c oxidase e os níveis de ATP foram diminuídos. No córtex pré-frontal, a HHcy leve aumentou as atividades da catalase (CAT), GPx, Mg²⁺-ATPase e da glutamina sintetase, bem como o dano ao DNA. Os demais parâmetros avaliados na amígdala e no córtex pré-frontal não foram alterados. No estriado, a HHcy leve aumentou as espécies reativas, as atividades da GPx, CAT e acetilcolinesterase (AChE) e a expressão gênica da interleucina(IL)-1 β , bem como reduziu a atividade da citocromo c oxidase, o imunocontéudo da AChE e a expressão gênica do fator de necrose tumoral (TNF)- α . No cerebelo, a HHcy leve aumentou as espécies reativas, o dano lipídico, e a expressão gênica do TNF- α , IL-1 β , IL-10 e do fator de transformação do crescimento (TGF)- β , bem como diminuiu o conteúdo de glutatona reduzida, a razão SOD/CAT, a atividade da citocromo c oxidase e da AChE e o imunocontéudo da AChE. Os demais parâmetros avaliados em estriado e cerebelo não foram alterados. Em conjunto nossos achados sugerem que a HHcy leve induz comportamento semelhante ao ansioso, prejuízos oxidativos, bioenergéticos, glutamatérgicos e inflamatórios, além de alterar a atividade das ATPases e da AChE de maneira estrutura-específica. Tais alterações podem estar relacionadas aos mecanismos pelos quais a HHcy leve exerce toxicidade, aumentando o risco e a incidência de doenças neurodegenerativas, psiquiátricas e motoras, assim como comorbidades associadas a estas doenças na população em geral.

Palavras-chaves: Hiper-homocisteinemia leve; Comportamento; Na⁺, K⁺-ATPase; Homeostase Glutamatérgica; Sistema colinérgico; Sobrevivência celular.

ABSTRACT

Elevated levels of homocysteine (Hcy) are linked to disturbances in cell homeostasis. Hyperhomocysteinemia (HHcy) has been considered a risk factor for the development of neurodegenerative, psychiatric, and motor diseases. However, the mechanisms by which Hcy exerts its toxic effect are not yet fully understood. Thus, the objective of the thesis was to assess the possible changes caused by chronic mild HHcy on parameters of emotional behavior (elevated plus maze tests, light-dark exploration, and open field, sucrose preference, forced swimming, body weight gain and adrenal weight/body weight ratio), as well as the motor system (horizontal stair walk tests, balance beam, suspension, and vertical pole) in rats. We aim to perform a structure-specific biochemical-molecular screening in the amygdala, prefrontal cortex, striatum, and cerebellum. For this, Wistar rats received a subcutaneous injection of HCY (0.03 μ mol / g of body weight) twice a day, from 30 to 60 days of life. After the mild HHcy model induction, the animals were euthanized and/or submitted to emotional/motor tests followed by euthanasia. Mild HHcy induced anxiety-like behavior, increased the fecal boli production and the time to develop tasks in some apparatus of anxious and motor tests, without, however, significantly altering the depressive-like behavior and motricity of animals. As for biochemical parameters, in the amygdala, mild HHcy increased the activities of succinate dehydrogenase (SDH) and complex II, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), Na⁺, K⁺-ATPase and glutamine synthetase, as well as nitrite levels, DNA damage and nuclear immunocontent of nuclear erythroid factor 2 (Nrf-2). Cytochrome c oxidase activity and ATP levels were decreased. In the prefrontal cortex, mild HHcy increased the activity of catalase (CAT) and GPx, DNA damage, and the activities of Mg²⁺-ATPase and glutamine synthetase. The other assays in the amygdala and prefrontal cortex were not changed. In the striatum, mild HHcy increased reactive species, activities of CAT, GPx, and AChE, and interleukin (IL)-1 β gene expression, as well as reduced cytochrome c oxidase activity, AChE immunocontent, and tumor necrosis factor (TNF)- α gene expression. In the cerebellum, mild HHcy increased reactive species, lipid damage, and gene expression of TNF- α , IL-1 β , IL-10, and transformation growth factor (TGF)- β , as well as decreased reduced glutathione content, SOD/CAT ratio, the activity of cytochrome c oxidase and AChE, and the immunocontent of AChE. The other assays in the striatum and cerebellum were not changed. Our findings suggest that mild HHcy induces anxiety-like behavior, oxidative, bioenergetic, glutamatergic, and inflammatory damages, in addition to altering ATPase and AChE activities in a structure-specific manner. Such changes may be related to the mechanisms by which mild HHcy exerts toxicity, increasing the risk and incidence of neurodegenerative, psychiatric, and motor diseases, as well as comorbidities associated with these diseases in the general population.

Key-words: Mild Hiper-homocysteinemia; Behavior; Sodium-Potassium-Exchanging ATPase; Glutamate Homeostasis; Cholinergic system; Cell Survival.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfatases
ATPase	enzima que hidrolisa ATP
CAT	catalase
CoA	coenzima A
CβS	cistationina β-sintase
DCFH	2,7'-diclorofluorisceína
DNA	ácido desoxirribonucleico
EEAT	transportadores de aminoácidos excitatórios
ELA	esclerose amiotrófica lateral
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina-adenina dinucleótido oxidado
FADH ₂	flavina-adenina dinucleótido reduzido
GALST	transportador de glutamato-aspartato
GDP	difosfato de guanosina
GLT-1	transportador de glutamato
GPx	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
GTP	trifosfato de guanosina
Hcy	homocisteína
HHcy	hiper-homocisteinemia
IGluRs	receptores específicos ionotrópicos de glutamato
IL	interleucina
Met	metionina
MS	metionina sintase
MT	metionina sintase
MTHFR	metileno tetrahidrofolato redutase
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NMDA	N-metil D-Aspartato
Nrf-2	nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
Pi	fosfato inorgânico
PPi	pirofosfato inorgânico
RNA	ácido ribonucleico
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SDH	succinato desidrogenase
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TBARS	níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	fatores de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
PARTE I.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
1.1. Metabolismo de aminoácidos sulfurados.....	2
1.1.1. Metabolismo da Homocisteína.....	2
1.2. Hiper-homocisteinemias e Doenças.....	4
1.3. Metabolismo energético.....	5
1.4. Estresse oxidativo	6
1.5. ATPases	8
1.6. Sistema glutamatérgico.....	10
1.7. Inflamação	12
1.8. Sistema colinérgico.....	13
1.9. Memória, Emoções e Motoricidade.....	14
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	17
3. OBJETIVO GERAL	17
3.1. Objetivos específicos	17
3.1.1. Objetivos específicos 1 – Capítulo 1.....	17
3.1.2. Objetivos específicos 2 – Capítulo 2.....	18
3.1.3. Objetivos específicos 3 – Capítulo 3.....	19
PARTE II.....	20
4. METODOLOGIA E RESULTADOS.....	21
4.1. Indução do modelo de Hiper-homocisteinemia leve crônica.....	21
4.2. Capítulo 1: Chronic mild Hyperhomocysteinemia impairs energy metabolism, promotes DNA damage and induces a Nrf2 response to oxidative stress in rats brain. ...	23
4.3. Capítulo 2: Mild hyperhomocysteinemia causes anxiety-like behavior and brain hyperactivity in rodents: Are ATPase and excitotoxicity by NMDA receptor overstimulation involved in this effect?.....	38
4.4. Capítulo 3: Hyperhomocysteinemia alters cytokine gene expression, cytochrome c oxidase activity and oxidative stress in striatum and cerebellum of rodents.....	81
PARTE III	93
5. DISCUSSÃO GERAL	94
6. CONCLUSÕES.....	105
7. PERSPECTIVAS	107
APOIO FINANCEIRO.....	108
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS.....	128
LISTA DE FIGURAS	129
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS (CEUA/UFRGS).....	130

PARTE I

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Metabolismo de aminoácidos sulfurados

1.1.1. Metabolismo da Homocisteína

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido não proteico gerado no metabolismo da metionina (Met), a qual é um aminoácido sulfurado essencial com grande importância biológica. A Met obtida na dieta ou da degradação endógena de proteínas é convertida a S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima metionina adenosiltransferase (EC 2.5.1.6). A SAM é então convertida a S-adenosil-homocisteína (SAH) por diversas metiltransferases dependentes de SAM, que é hidrolisada a Hcy e adenosina pela enzima S-adenosil homocisteína hidrolase (EC 3.3.1.1) (Williams and Schalinske 2010; Mudd 2011; Skovierová et al. 2016; Martínez et al. 2017).

A Hcy formada tem seus níveis controlados por duas rotas metabólicas:

a) Na *via de remetilação* um grupamento metil é transferido do N⁵-metiltetraidrofolato a Hcy pela ação da enzima metionina sintase (MT, EC 2.1.1.13), a qual tem como cofator a vitamina B12 ou cianocobalamina, ou então, através da ação da enzima betaina homocisteína metiltransferase (EC 2.1.1.5) que transfere um grupamento metil proveniente da betaina à Hcy. Essas vias são amplamente distribuídas nos tecidos e convertem Hcy em Met.

b) Na *via da transulfuração* a Hcy é metabolizada irreversivelmente a cistationina após a condensação com a serina pela ação da enzima cistationina β-sintase (CβS – EC 4.2.1.22), a qual tem como cofator a vitamina B6 ou piridoxal fostato. A cistationina formada é então hidrolisada pela cistationina γ-liase (EC 4.4.1.1) a cisteína e α-cetobutirato, os quais são substratos para outras rotas metabólicas (Williams and Schalinske 2010; Skovierová et al. 2016).

No ciclo da Met-Hcy, a SAM se apresenta como um importante substrato em diversos processos de transmetilação, ao passo que ela doa grupamentos metil a fosfolipídeos, catecolaminas e reações epigenéticas, metilando o ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e histonas (Finkelstein 2007; Zhang and Zheng 2016). A SAM tem grande importância na sinalização celular e na degradação de metabólitos. Quando os níveis de SAM estão aumentados ela inibe alostericamente a metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) reduzindo a conversão de Hcy em Met, pela via da remetilação. Com níveis aumentados de Hcy a SAM ativa alostericamente a C β S aumentando a catabolização da Hcy diminuindo seu nível sérico (Finkelstein 2007; Skovierová et al. 2016; Zhang and Zheng 2016).

A *figura 1* esquematiza as principais rotas de formação e degradação da Hcy.

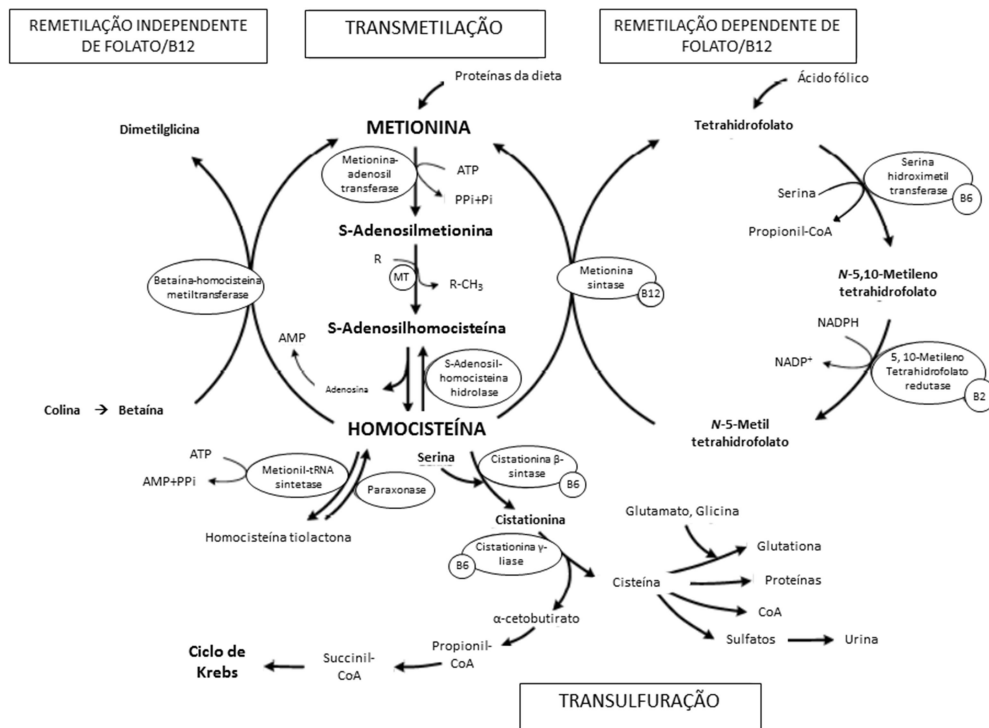


Figura 1 – Rota da Metionina-Homocisteína. MT – metionina transferase, R-qualquer radical a ser metilado, CH₃ – grupamento metila, ATP – adenosina trifosfato, ADP – adenosina difosfato, AMP – adenosina monofosfato, NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado, B₁₂ – vitamina B₁₂, B₆ – vitamina B₆, B₂ – vitamina B₂, PPI – pirofosfato inorgânico, Pi – fosfato inorgânico, CoA – Coenzima A.

Fonte: traduzido de Skovierová et al. (2016).

1.2. Hiper-homocisteinemias e Doenças

São considerados normais níveis plasmáticos de Hcy entre 5 e 12 $\mu\text{mol/L}$ (μM em mulheres) e 5 e 15 μM (em homens). Níveis superiores a 13-16 μM caracterizam uma condição denominada hiper-homocisteinemia (HHcy) que pode ser leve (13/16-30 μM), moderada (31-100 μM) ou grave (superior a 100 μM). Essa condição de HHcy pode ser originada em decorrência de fatores genéticos ou ambientais (Herrmann 2006; Mudd 2011; Veeranki and Tyagi 2013).

O rastreio neonatal das deficiências enzimáticas que levam ao aumento da Hcy demonstra uma prevalência entre 1:200.000 a 1:335.000 nascidos vivos, quando há a deficiência homozigótica da enzima C β S (Skovby et al. 2010; Mudd 2011; Sørensen et al. 2016), e uma prevalência de 1:70 a 1:2.000 nascidos vivos quando há deficiências enzimáticas heterozigóticas (Neves et al. 2004). A HHcy severa é característica da Homocistinúria Clássica que é um erro inato do metabolismo, de herança autossômica recessiva, causada pela deficiência severa da C β S.

As HHcy leve e moderada, por sua vez, podem ser originadas por mutações genéticas heterozigóticas na enzima MTHFR, deficiência das vitaminas do complexo B (principalmente B6, B9 e B12), dieta rica em Met, insuficiência renal crônica e uso de medicamentos como fenitoína, L-DOPA e metotrexato, utilizados no tratamento de convulsões e nas doenças de Parkinson e Alzheimer (Boers 2001; Dos Santos et al. 2009; Zoccolella et al. 2009; Swart et al. 2013; McCully 2015; Ao et al. 2017; Kumar et al. 2017).

A HHcy leve tem sido relatada como um fator de risco para doenças cardiovasculares, neurológicas e psiquiátricas (Williams and Schalinske 2010; McCully 2015; Hannibal and Blom 2016; Bonetti et al. 2016). Trabalhos mostram que esta condição pode estar associada à depressão, demências e alterações de cognição e memória (Sachdev 2005; Minagawa et al. 2010; Permoda-Osip and Dorszewska 2013; Moustafa et al. 2014; Chung et al. 2016). O

polimorfismo da enzima MTHFR tem sido relacionado a alterações nos níveis de serotonina e dopamina, e na sintomatologia depressiva (Folstein et al. 2007; Liew and Gupta 2014; Skovierová et al. 2016).

Trabalhos relatam níveis sanguíneos de Hcy aumentados em animais submetidos ao estresse crônico demonstrando uma associação entre estresse e Hcy (Tagliari et al. 2010). A HHcy leve quimicamente induzida causa estresse oxidativo em plasma e córtex cerebral (Scherer et al. 2011), diminui o conteúdo proteico das subunidades catalíticas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da enzima Na^+ , K^+ -ATPase em córtex e hipocampo e a hidrólise de ATP, ADP e AMP em linfócitos e sinaptossomas de córtex cerebral de ratos (Scherer et al. 2013). Ainda, a HHcy leve crônica aumenta a atividade e o conteúdo proteico da acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral e hipocampo de ratos (Scherer et al. 2014) e altera a ultraestrutura de neurônios corticais, comprometendo mitocôndrias e outros componentes celulares (de S. Moreira et al. 2018).

1.3. Metabolismo energético

As mitocôndrias são organelas celulares com papel metabólico central no funcionamento celular e na regulação do metabolismo energético e produção de ATP, apresentando grande capacidade adaptativa a ambientes adversos. Alteração na função e na integridade mitocondrial tem sido reportada em doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes, obesidade e envelhecimento (Morris and Berk 2015; Grimm and Eckert 2017).

Nas cristas da membrana mitocondrial interna estão localizados os complexos da cadeia respiratória (Complexos I, II, III e IV), que tem por função transferir elétrons ao oxigênio molecular, seu acceptor final, e gerar um gradiente de prótons no espaço intermembranas da mitocôndria. Esse gradiente de prótons é utilizado pela enzima F_0F_1 -

ATPase (ATP Sintetase) para produzir em torno de 95% do ATP no sistema nervoso central (SNC), no processo denominado fosforilação oxidativa (Pereira et al. 2012). A *figura 2* apresenta de forma esquemática a fosforilação oxidativa e a produção de ATP.

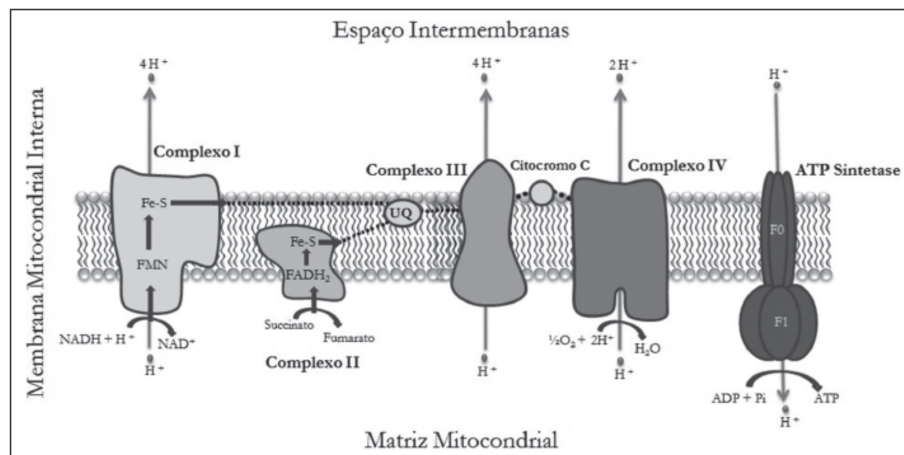


Figura 2 – Fosforilação oxidativa e produção de ATP.
Fonte: (Pereira et al. 2012).

Disfunções mitocondriais podem alterar a síntese de ATP o que pode prejudicar a atividade de outras ATPases levando ao desbalanço nas concentrações iônicas dos compartimentos celulares e comprometendo a síntese e recaptação de neurotransmissores, o que pode desencadear o processo apoptótico e levar à morte celular (Emerit et al. 2004; Foo et al. 2012; Quintanilla et al. 2017). A disfunção mitocondrial tem sido relacionada à patogênese da neurodegeneração (Akbar et al. 2016; Grimm e Eckert 2017; Quintanilla et al. 2017), das doenças metabólicas (Morava e Kozicz 2013; Bhatti et al. 2017) e psiquiátricas (Scaglia 2010; Olloquequi et al. 2018) e ao envelhecimento (McCully 2015; Theurey e Pizzo 2018).

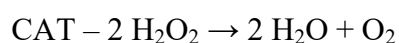
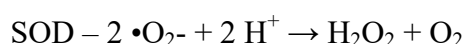
1.4. Estresse oxidativo

Na fosforilação oxidativa, quando o oxigênio molecular não é corretamente reduzido à água, a mitocôndria torna-se uma importante fonte e alvo da produção de espécies reativas de

oxigênio (ERO) (Halliwell e Gutteridge 2007; Halliwell 2012). As principais ERO compreendem o ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio “singlet” ($^1\text{O}_2$) e o radical hidroxil ($\text{OH}\bullet$) (Halliwell 2012, 2014). Há ainda, em alguns processos fisiológicos, a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN), dentre as quais podemos destacar o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) e o peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell e Whiteman 2004). A produção controlada de espécies reativas tem importante papel fisiológico atuando, por exemplo, na regulação da síntese proteica, na sinalização celular e na defesa a invasores (Halliwell e Gutteridge 2007; Halliwell 2012). O controle da produção de ERO/ERN é realizado pelas defesas antioxidantes.

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas e não enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas são representadas, dentre outras, pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). As defesas antioxidantes não enzimáticas são representadas pelas vitaminas E (alfa-tocoferol) e C (ácido ascórbico), glutathione reduzida (GSH) e flavonoides e carotenos, dentre outros (Gutteridge e Halliwell 2010).

As reações envolvendo as enzimas antioxidantes e as ERO que elas detoxificam são:



Em condições normais a produção das espécies reativas e as defesas antioxidantes estão em equilíbrio. Quando o controle na produção de ERO/ERN e as capacidades antioxidantes são perdidos ocorre o estresse oxidativo, que tem efeito deletério ao ambiente celular, e tem sido reportado em diversas doenças (Halliwell 2014). A dificuldade em controlar as ERO/ERN pode causar dano oxidativo grave a lipídios, proteínas e ao DNA (Halliwell e Gutteridge 2007; Gutteridge e Halliwell 2010). Quando o estresse oxidativo é agudo ou moderado as células podem se adaptar a esse ambiente aumentando a síntese de

moléculas antioxidantes para a recuperação da homeostase redox. Com a cronicidade do insulto as células podem não conseguir reparar os danos causados pelo estresse oxidativo e isso pode levar a morte celular por apoptose ou necrose. Nesse contexto o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2) se apresenta como um importante mediador do estresse oxidativo, e tem sido reportado à adaptação e tolerância celular em ambientes hostis (Holmström et al. 2017; Venditti e Di Meo 2020).

Os efeitos do estresse oxidativo estão bem descritos na fisiopatologia de diversas doenças e neurodegeneração em humanos e em modelos animais de doenças (Misra et al. 2009; Marazziti et al. 2012; El Assar et al. 2013; Akbar et al. 2016; Beckhauser et al. 2016; Martínez et al. 2017; Samavarchi Tehrani et al. 2018).

1.5. ATPases

A Na^+ , K^+ -ATPase e Mg^{2+} -ATPase são hidrolases que utilizam a energia da quebra da molécula de ATP, produzida na fosforilação oxidativa, para bombear íons controlando a função cerebral e a homeostase de diversas moléculas, como os neurotransmissores (Kinoshita et al. 2016). Os seus funcionamentos são relacionados a diversas funções metabólicas, aprendizado e memória (Marazziti et al. 2012; Arnaiz e Ordieres 2014). Elas são enzimas transmembrana susceptíveis a alterações citosólicas e estruturais das membranas biológicas (Cornelius et al. 2015).

A Na^+ , K^+ -ATPase (figura 3) é amplamente distribuída nas células do organismo, e tem importante papel na manutenção da excitabilidade neuronal gerando e mantendo o potencial de membrana ao translocar os íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) contra seus gradientes de concentração. Ela regula o volume e pH intracelular e está envolvida na transdução de sinal. Para isso, ela consome cerca de 50-60% do ATP total do SNC (Suhail 2010; Arnaiz e Ordieres 2014; Aperia et al. 2016). A Na^+ , K^+ -ATPase é composta por três

unidades estruturais, sendo uma catalítica (α , peso molecular aproximado: 110 KDa), uma regulatória (β , peso molecular aproximado: 55 KDa) e uma modulatória (γ , peso molecular aproximado: 12 KDa). A subunidade α tem 4 isoformas, a subunidade β tem 2 isoformas e subunidade γ uma. Elas são amplamente distribuídas nos tecidos do organismo e podem se rearranjar de diversas formas (Suhail 2010).

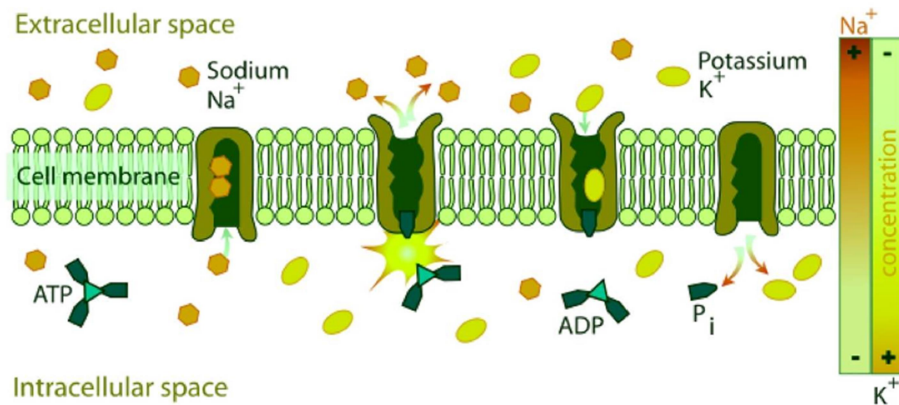


Figura 3 – Transporte de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática com consumo de ATP pela Na^+ , K^+ -ATPase.

Fonte: (Suhail, 2010).

A Mg^{2+} -ATPase tem como função primordial manter altas concentrações intracelulares de Mg^{2+} , tendo importante papel no crescimento celular e no controle da síntese proteica (Sanui e Rubin 1982; Carageorgiou et al. 2008).

Alterações no funcionamento das ATPases são relacionadas a prejuízos celulares, cognitivos e emocionais em diversos tecidos e modelos animais de doenças (Ikeda et al. 2003; Carageorgiou et al. 2008; Sütt et al. 2015; da Silva Fiorin et al. 2016; dos Santos et al. 2017). A HHcy severa inibe a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em hipocampo de ratos (Machado et al. 2011) e a hiper-metioninemia gestacional altera a atividade da Mg^{2+} -ATPase levando a déficits cognitivos na prole de ratas (Schweinberger et al. 2014). A disfunção da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase tem sido relacionada ao comportamento semelhante ao depressivo (De Vasconcellos et al. 2005; Moseley et al. 2007; Crema et al. 2010; dos Santos et al. 2017),

isquemia cerebral (Sanches et al. 2013) e doenças metabólicas (Medvedev et al. 2017) em roedores.

1.6. Sistema glutamatérgico

O glutamato é um aminoácido não essencial com função primordial na neurotransmissão excitatória no SNC, estando envolvido na plasticidade sináptica, desenvolvimento neural, aprendizagem e memória (Lehner et al. 2010; Lamprecht 2016).

O glutamato é estocado em vesículas sinápticas no neurônio pré-sináptico e é liberado na fenda sináptica quando há algum disparo de potencial de ação e necessidade de condução de impulso nervoso. Na fenda sináptica, o glutamato pode se ligar a seus receptores específicos metabotrópicos (mGluRs) ou ionotrópicos (IGluRs) que estão localizados no neurônio pós-sináptico. Os principais IGluRs são o N-metil D-Aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato. Quando o glutamato liga-se a eles leva a abertura de canais iônicos que causam a despolarização neuronal (Izquierdo e Medina 1997; Abg Abd Wahab et al. 2019). Os receptores AMPA e cainato são relacionados à rápida cinética de ativação e desativação, enquanto que, o NMDA tende a permanecer mais tempo aberto que os anteriores permitindo um maior fluxo de íon cálcio (Ca^{2+}) para dentro do neurônio tendo assim importante papel no potencial de longa duração. O NMDA inicia cascatas de sinalização intracelular dependentes de Ca^{2+} que conduzem a alterações na expressão de diversos genes, sendo amplamente relacionado aos processos de aprendizado e memória (Izquierdo e Medina 1997; Do et al. 2004; Foo et al. 2012; Rueda et al. 2016).

Após a sua ação, o glutamato livre na fenda sináptica é captado pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (EEAT) glutamato-aspartato (GLAST/EEAT1, peso molecular aproximado: 64 KDa) e transportador de glutamato (GLT-1/EEAT2, peso molecular aproximado: 67 KDa), transportador de aminoácido excitatório (EAAC/EAAT3) abundantes

no encéfalo (nos astrócitos) e os transportadores de aminoácidos excitatórios EAAT4 e EAAT5, encontrados respectivamente nas células de Purkinje e nos neurônios retinianos (Parkin et al. 2018; Abg Abd Wahab et al. 2019). Os transportadores de glutamato rapidamente o removem do espaço extracelular e tem grande importância na regulação do tempo e na concentração desse aminoácido na fenda sináptica. Quando internalizado nos astrócitos, o glutamato é rapidamente convertido à glutamina pela glutamina sintetase com gasto de ATP. Dessa forma, a glutamina produzida pode ser transportada até o neurônio pré-sináptico onde é novamente convertida à glutamato que pode ser re-envesiculado para futuras sinapses. Esse processo protege as células dos efeitos prejudiciais que o glutamato pode causar, quando livre durante muito tempo no citosol ou espaço extracelular (Foo et al. 2012; Larsen et al. 2016).

Em situações patológicas, o comprometimento do funcionamento dos transportadores pode levar a elevação e/ou aumento do tempo de permanência do glutamato na fenda, o que causa excitotoxicidade glutamatérgica e pode levar a morte celular por apoptose (Olloquequi et al. 2018). A excitotoxicidade do glutamato pode gerar superativação dos receptores NMDA e aumentar drasticamente a entrada de Ca^{2+} nas células. Alterações mitocondriais estão relacionadas ao influxo excessivo e descontrolado de Ca^{2+} nas células, o que pode ultrapassar a capacidade de estocagem do Ca^{2+} e causar a liberação do citocromo c e a ativação da cascata apoptótica. Ainda, o aumento dos níveis de sódio intracelular causado pela excitotoxicidade pode levar a edema e ruptura celular, ocasionando a liberação de glutamato e outros constituintes. A superativação do receptor NMDA pode levar a formação de ERO e prejuízos na síntese de glutathione, assim como, prejuízo no controle do estresse oxidativo (Benz et al. 2004; Marsden 2011).

O processo excitotóxico do glutamato tem sido relacionado a doenças neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica (ELA), doenças de Alzheimer,

Parkinson e Huntington, além de demência e senilidade (Wang e Michaelis 2010; Lewerenz et al. 2015; Kim et al. 2016; Olloquequi et al. 2018; Abg Abd Wahab et al. 2019). Foi reportado que a HHcy severa causa alterações no sistema glutamatérgico, levando a excitotoxicidade (Matté et al. 2010; Machado et al. 2011; Da Cunha et al. 2012).

1.7. Inflamação

O processo inflamatório é caracterizado por uma resposta do organismo a infecções ou danos teciduais. Classicamente, o processo inflamatório é caracterizado por calor, dor, vermelhidão, edema, e perda de função da região afetada. Junto a isso, observa-se o aumento no número de células do sistema imune como leucócitos, macrófagos e componentes humorais como, por exemplo, fatores de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e interleucina(IL)-1 β , IL-6, a anti-inflamatória IL-10, o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e as quimiocinas (Kuprash e Nedospasov 2016; Abdulkhaleq et al. 2018).

De um modo geral o processo inflamatório se instala e é composto por fases bem definidas de início, meio e fim. No entanto, em alguns casos, podem ocorrer alterações nesses processos o que leva à inflamação grave e crônica. A cronicidade da inflamação pode causar morte celular e lesão da região afetada, sendo reportada em doenças neurodegenerativas, psiquiátricas e motoras (Maes et al. 2009; Kuprash e Nedospasov 2016; Meyer et al. 2018).

A Hcy está envolvida com o aumento de estresse oxidativo e, a partir desse, pode ser desencadeada uma cascata de sinalização que pode alterar a liberação/produção das citocinas pró- e anti-inflamatórias (de S. Moreira et al. 2018). A ativação microglial está relacionada ao comprometimento comportamental (Stein et al. 2017).

A HHcy leve crônica aumenta os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , e IL-6, assim como no soro, hipocampo, córtex cerebral total e músculo cardíaco de ratos hiper-homocisteinêmicos (Scherer et al. 2014). O aumento do fator nuclear-kappa beta (NF-

κ B), pela Hcy, foi relacionado ao aumento de níveis de TNF- α e IL-1 β em culturas de astrócitos corticais de ratos adultos (Longoni et al. 2017). Nesse sentido, o TGF- β , o NF- κ B e o Nrf-2 apresentam importantes papéis na regulação da disfunção celular relacionada ao estresse oxidativo e a inflamação (El Assar et al. 2013), regulando a liberação de citocinas e inflamação (NF- κ B) (El Assar et al. 2013) e a proliferação e morte celular (TGF- β), que são essenciais para a sobrevivência celular e estão ligadas à senescência celular, câncer e doenças relacionadas à idade (Tominaga e Suzuki 2019).

1.8. Sistema colinérgico

A acetilcolinesterase (AChE ou acetilcolina hidrolase, E.C. 3.1.1.7) é um enzima com aproximadamente 80 kDa que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ésteres de colina. A ACh tem grande importância nas sinapses excitatórias, que são amplamente relacionadas à transmissão nervosa, aprendizado, memória e contração muscular (Giovannini et al. 2005; Carageorgiou et al. 2008). A AChE hidrolisa a ACh na fenda sináptica (Lecomte et al. 2014) e alteração na sua atividade tem sido relacionada a processos de neuroinflamação e déficit cognitivo em diversos modelos animais (Darvesh et al. 2007; Tagliari et al. 2011; Pohanka 2014; Campanari et al. 2016).

O reflexo colinérgico anti-inflamatório, mediado pela atividade da AChE, tem sido associado a resposta ao processo inflamatório gerado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (Bhandari 2018). Nesse contexto, a HHcy leve crônica foi relacionada ao aumento da atividade da AChE no hipocampo e no córtex total de ratos (Scherer et al. 2014). Ainda, a HHcy leve crônica induziu alterações microscópicas mitocondriais associadas ao estresse oxidativo, inflamação e aumento da AChE no córtex total de ratos que foram, em parte, protegidas pela terapia com ácido acetilsalicílico (de S. Moreira et al. 2018).

1.9. Memória, Emoções e Motoricidade

Alterações em estruturas cerebrais como amígdala, córtex pré-frontal e total, estriado e cerebelo, assim como comprometimento ou alterações das projeções neurais de uma estrutura em outra são relacionados ao desenvolvimento e a progressão de várias doenças do SNC. Da mesma forma, essas alterações foram relacionadas a problemas de cognição e memória, e alterações comportamentais em modelos animais (Setnik et al. 2004; Vianna et al. 2004; Matte et al. 2009; McEwen et al. 2012; Marek et al. 2013; Johnson et al. 2018; Steinberg et al. 2020).

Os processos relacionados à memória, emoções e motricidade são complexos e diversos. Dentre eles, as sinapses químicas, nesse trabalho representado pelo glutamato e acetilcolina, apresentam um importante papel na manutenção da transmissão da informação celular e nos processos de aquisição, consolidação e evocação das memórias que estão relacionadas aos processos emocionais e motores (Eichenbaum 2016; Izquierdo et al. 2016). Além disso, o funcionamento correto de diversas enzimas, como as ATPases, complexos mitocondriais e a acetilcolinesterase apresentam grande importância sobre os processos de memória e comportamento (da Silva Fiorin et al. 2016; Vanzella et al. 2017). A presença do estresse oxidativo e de mediadores inflamatórios são reportados para comprometer a memória e o comportamento emocional de roedores (Patki et al. 2013). Contudo, o SNC apresenta uma grande capacidade adaptativa às alterações na homeostase celular, que está relacionada tanto com resposta a lesões que geram dano celular como com as alterações características dos processos de aprendizagem e memória (Desmedt et al. 2015).

Avaliar o efeito de substâncias em tarefas específicas pode auxiliar a traçar um panorama destas alterações e as suas possíveis relações entre elas e o comportamento

emocional e motor. Diversos testes comportamentais podem ser utilizados para avaliar a presença de comportamento semelhante à ansiedade/depressão e motricidade em roedores.

Dentre os principais testes emocionais para avaliar o comportamento semelhante ao ansioso em roedores temos o teste do labirinto em cruz elevado (Pellow et al. 1985; Walf e Frye 2007; Bailey e Crawley 2009; Arteni et al. 2010)(Walf and Frye 2007)(Walf and Frye 2007), o teste de exploração claro-escuro (Bailey e Crawley 2009) e o teste de exploração do campo aberto (Bailey e Crawley 2009; Arteni et al. 2010), que usam a capacidade inata dos roedores de explorar ambientes para mensurar o comportamento semelhante ao ansioso nos animais por preferência e exploração de determinados locais dos aparatos dos testes.

Dentre os testes para avaliar o comportamento semelhante ao depressivo em roedores, podemos citar o teste da preferência pela sacarose (Nielsen et al. 2000; Grigor'yan e Gulyaeva 2017; Liu et al. 2017) e o da natação forçada (Porsolt et al. 1977; Grigor'yan e Gulyaeva 2017), que são amplamente utilizados para avaliar anedonia em roedores.

A avaliação da motricidade pode ser realizada através de testes como o da caminhada sobre a escada horizontal e trave de equilíbrio que avaliam a coordenação motora fina (Carter et al. 2001; Pazaiti et al. 2008), teste de exploração do campo-aberto que avalia locomoção e exploração (Bailey e Crawley 2009; Arteni et al. 2010), teste da suspensão e deslocamento que avalia força e deslocamento (Bona et al. 1997; Pazaiti et al. 2008) e teste do pole vertical que avalia bradicinesia (Tanriover et al. 2010; Song et al. 2018). Esses testes são baseados na capacidade dos animais desenvolverem e completarem tarefas exploratórias e motoras.

A HHcy severa está diretamente relacionada a problemas vasculares e circulatório e esses problemas podem comprometer a homeostase de estruturas envolvidas na elaboração do movimento, o que pode levar a doenças motoras. Camundongos nocaute para o gene da C β S apresentaram prejuízos bioenergéticos e epigenéticos no músculo esquelético (Veeranki e

Tyagi 2015; Veeranki et al. 2015). Anteriormente, nosso grupo de pesquisa reportou alterações redox em músculo cardíaco e aorta de ratos submetidos à HHcy leve (Scherer 2014). Além disso, existe uma relação entre doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e ELA e o comprometimento da motricidade (Krieger et al. 2016; Gellersen et al. 2017; Abg Abd Wahab et al. 2019).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O aumento nos níveis séricos de Hcy está relacionado a danos cerebrais e vasculares, sendo considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, psiquiátricas e outras. Com isso, a nossa hipótese é que a HHcy leve crônica compromete metabolicamente estruturas cerebrais importantes que estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças que afetam o SNC, o que pode estar associado ao fator de risco para o desenvolvimento de tais doenças na população, como as psiquiátricas e motoras.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da tese foi avaliar as possíveis alterações causadas pela HHcy leve crônica sobre o comportamento emocional semelhante à ansiedade/depressão e a motricidade de ratos Wistar, bem como fazer uma triagem bioquímico-molecular das possíveis alterações causadas na amígdala, no córtex pré-frontal, no estriado e no cerebelo de ratos submetidos ao modelo de HHcy leve crônica quimicamente induzida.

3.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos da tese estão subdivididos em três capítulos e são apresentados na forma de artigos científicos, como segue:

3.1.1. Objetivos específicos 1 – Capítulo 1

Avaliar os efeitos da HHcy leve quimicamente induzida sobre parâmetros bioquímicos em amígdala e córtex pré-frontal de ratos:

- a) Parâmetros de metabolismo energético tais como: atividade das enzimas da cadeia respiratória [succinato desidrogenase (SDH), complexo II e citocromo c oxidase] e níveis de ATP;
- b) Parâmetros de estresse oxidativo tais como: oxidação da 2,7'-diclorofluorisceína (DCFH), níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), níveis de nitritos, conteúdo de tióis totais, níveis de glutathiona reduzida (GSH) e a atividade das enzimas antioxidantes [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx)];
- c) Dano ao DNA;
- d) O conteúdo proteico citosólico e nuclear do Nrf-2;

3.1.2. Objetivos específicos 2 – Capítulo 2

Avaliar os efeitos da HHcy leve quimicamente induzida sobre o comportamento emocional e parâmetros bioquímicos em amígdala e córtex-pré-frontal de ratos:

- a) Comportamento ansioso através dos testes do labirinto em cruz elevada, exploração claro-escuro e exploração no campo aberto;
- b) Comportamento depressivo através dos testes de preferência pela sacarose e nado forçado, além de avaliar o ganho de peso corporal e a relação peso adrenal/peso corpóreo, assim como a relação de outras estruturas/órgãos;
- c) Atividade das ATPases (Na^+ , K^+ -ATPase e Mg^{2+} -ATPase);
- d) Captação de glutamato e atividade da glutamina sintetase;
- e) Conteúdo proteico total de subunidades catalíticas $\alpha 1$ e $\alpha 3$ e regulatória $\beta 1$ da Na^+ , K^+ -ATPase e transportadores de glutamato GLAST e GLT-1;

- f) Efeito *ex vivo* do bloqueio do receptor NMDA sobre as possíveis alterações causadas na atividade das ATPases e em parâmetros de estresse oxidativo em fatias de amígdala e córtex pré-frontal.

3.1.3. Objetivos específicos 3 – Capítulo 3

Avaliar os efeitos da HHcy leve quimicamente induzida sobre motricidade e parâmetros bioquímicos/moleculares em estriado e cerebelo de ratos:

- a) Motricidade pelos testes da escada horizontal, da trave de equilíbrio, da exploração de campo aberto, da suspensão e força e do pole vertical;
- b) Parâmetros de estresse oxidativo tais como: oxidação da DCFH, níveis de TBARS, níveis de nitritos, conteúdo de tióis totais, níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx;
- c) Parâmetros de metabolismo energético tais como: atividade das enzimas da cadeia respiratória [succinato desidrogenase (SDH):complexo II e complexo IV];
- d) A atividade das enzimas AChE;
- e) Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, anti-inflamatória IL-10 e TGF- β ;
- f) Conteúdo proteico total de AChE, Nrf-2, NF-KB, pNF-KB e caspase 3 clivada;

PARTE II

4. METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados são apresentados na forma de 3 capítulos. Os capítulos 1, 2 e 3 são apresentados na forma de artigos científicos, os quais apresentam como base o mesmo modelo experimental de hiper-homocisteinemia leve crônica, previamente desenvolvido por Scherer e colaboradores (2011), abaixo descrito. Os artigos científicos foram publicados e/ou submetidos à publicação em revistas internacionais de fator de impacto A (Qualificadas pelo Qualis CAPES).

4.1. Indução do modelo de Hiper-homocisteinemia leve crônica

Os ratos foram randomizados por peso em dois grupos experimentais aos 29 dias de vida pós-uterina e submetidos ao modelo de HHcy leve crônica a partir dos 30 dias de vida pós-uterina. O tratamento eleva os níveis plasmáticos de Hcy, nos roedores, semelhante aos encontrados em pacientes com HHcy leve crônica (30 μ M) (Scherer et al. 2011). Os ratos foram submetidos a uma administração subcutânea de Hcy (0,03 μ mol/g de peso corporal) ou igual volume de cloreto de sódio 0,9% (controles, 0,5mL/100g de peso corporal), duas vezes ao dia do 30° ao 60° dias de vida. Aos 61 dias de vida, os animais foram submetidos aos testes emocionais/motores ou então à eutanásia para obtenção das estruturas cerebrais de interesse. Cada capítulo da tese apresenta o delineamento utilizado para aqueles experimentos.

O número total de animais utilizado no trabalho foi inferior ao aprovado pelo comitê de Ética da UFRGS. O projeto utilizou um total de 183 animais. O projeto inicial para a realização da tese foi aprovado pelos comitês de Ética em uso de animais do departamento de Bioquímica (COMPESQ) e da UFRGS (CEUA) sob # 33.301/2017. O ANEXO I mostra a carta de aprovação do CEUA/UFRGS.

4.2. Capítulo 1: Chronic mild Hyperhomocysteinemia impairs energy metabolism, promotes DNA damage and induces a Nrf2 response to oxidative stress in rats brain.

Artigo publicado no periódico *Cellular and Molecular Neurobiology*.

Fator de impacto (2019): 3.606, CAPES Qualis A2.

Web site do jornal: <https://www.springer.com/journal/10571>

Autores: Tiago Marcon dos Santos, Cassiana Siebert, Micaela Federizzi de Oliveira, Vanusa Manfredini e Angela T. S. Wyse

4.3. Capítulo 2: Mild hyperhomocysteinemia causes anxiety-like behavior and brain hyperactivity in rodents: Are ATPase and excitotoxicity by NMDA receptor overstimulation involved in this effect?

Artigo em revisão no periódico *Cellular and Molecular Neurobiology*.

Fator de impacto (2019): 3.606, CAPES Qualis A2.

Web site do jornal: <https://www.springer.com/journal/10571>

Autores: Tiago Marcon dos Santos, Cassiana Siebert, Larissa Daniele Bobermin, André Quincozes-Santos e Angela T. S. Wyse

4.4. Capítulo 3: Hyperhomocysteinemia alters cytokine gene expression, cytochrome c oxidase activity and oxidative stress in striatum and cerebellum of rodents

Artigo aceito para publicação no periódico *Life Science*.

Fator de impacto (2019): 3.647, CAPES Qualis A1.

Web site do jornal: <https://www.journals.elsevier.com/life-sciences>

Autores: Tiago Marcon dos Santos, Osmar Vieira Ramirez Junior, Vinicius Santos Alves, Luiz Eduardo Baggio Savio e Angela T. S. Wyse

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 3

PARTE III

5. DISCUSSÃO GERAL

A HHcy tem sido reportada como um fator agravante de diversas doenças, incluindo neurodegeneração e doenças psiquiátricas. Níveis elevados de Hcy estão presentes em muitos pacientes diagnosticados com ansiedade, depressão e distúrbios de humor (Moustafa et al. 2014; Skovierová et al. 2016; Chung et al. 2017; Wan et al. 2018), bem como em doenças neurodegenerativas com comprometimento motor, como ELA, esclerose múltipla e doenças de Parkinson e Alzheimer (Zoccolella et al. 2008, 2009; Petras et al. 2014; Moustafa et al. 2015). Embora muitos estudos tenham sido realizados, ainda não se sabe os exatos mecanismos bioquímico-moleculares pelos quais a Hcy é considerada um fator de risco para essas doenças.

No artigo 1 buscamos avaliar se a HHcy leve crônica poderia estar afetando o metabolismo energético e como isso poderia estar resultando no equilíbrio da homeostase redox tanto na amígdala quanto no córtex pré-frontal de ratos. Uma vez que já foi demonstrado que a administração crônica de Hcy em níveis leves causa dano oxidativo, alterações enzimáticas e comprometimento de estruturas, como hipocampo e córtex total de ratos (Scherer et al. 2013; de S. Moreira et al. 2018).

Nesse contexto, utilizamos a amígdala e o córtex pré-frontal que estão fortemente relacionados e intimamente ligados aos circuitos do medo e as doenças psiquiátricas, onde o comprometimento dos seus funcionamentos tem sido reportado (Mah et al. 2016).

Os resultados mostraram que a amígdala e o córtex pré-frontal foram afetados de forma estrutura-específica pelo aumento dos níveis de Hcy, e que as respostas apresentadas foram específicas para cada estrutura, sendo nessas estruturas observados diferentes graus de comprometimento relacionados à HHcy leve crônica. A amígdala parece ser mais suscetível ao aumento de Hcy e parece apresentar uma resposta mais pronunciada a esse acúmulo, o que

é evidenciado pelo aumento do conteúdo proteico nuclear do Nrf-2 e pelo aumento das atividades das enzimas antioxidantes SOD e GPx, que pode sugerir uma resposta positiva ao aumento das espécies reativas a partir da auto-oxidação da Hcy durante a indução do modelo de HHcy leve crônica. Por outro lado, a avaliação do córtex pré-frontal não apontou tal regulação, contudo, não é possível descartar que tal resposta tenha ocorrido no córtex pré-frontal, uma vez que, nele foi observado o aumento das atividades enzimáticas da CAT e GPx. Apesar destas respostas positivas, que podem indicar uma tentativa para reestabelecer a homeostase redox nas estruturas, não houve uma reversão/reparo/proteção, durante o período de 30 dias de tratamento, evidenciado pelo dano ao DNA tanto na amígdala quanto no córtex pré-frontal. O dano ao DNA pode ser decorrente da inibição da via de metilação, como uma tentativa de diminuir os níveis de Hcy ou então pela presença de danos persistentes causados pela Hcy que não puderam ser reparados pela maquinaria celular de reparo.

No artigo 2 procuramos aprofundar nosso estudo sobre os efeitos da HHcy leve crônica sobre os comportamentos relacionados a ansiedade e depressão em roedores e investigar o envolvimento da amígdala e do córtex pré-frontal nos insultos causados pela Hcy sobre as atividades das ATPases cerebrais (Na^+ , K^+ -ATPase e Mg^{2+} -ATPase), homeostase glutamatérgica e o efeito *ex vivo* da Hcy sobre o receptor NMDA do glutamato.

Foi observado que a administração de Hcy, duas vezes ao dia, durante 30 dias, induziu comportamento semelhante à ansiedade nos roedores, sem, no entanto, alterar o comportamento semelhante à depressão. Os animais do grupo Hcy apresentaram alterações em diversos parâmetros relacionados à ansiedade, como menor tempo e número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevada, maior tempo de permanência no compartimento escuro e menor número de cruzamentos para o compartimento claro no teste de exploração claro-escuro, assim como uma tendência em diminuir o tempo de exploração da área central e a distância percorrida no aparato do teste de exploração no campo aberto.

Nestes testes, foi observado que o tratamento com Hcy aumentou o número de bolos fecais, indicando uma maior atividade parassimpática nos animais. O aumento da ansiedade e do número de bolos fecais pode estar relacionado com o aumento do comportamento de medo, luta e fuga (McEwen et al. 2012; Yilmazer-hanke et al. 2016). Foi sugerido que a ansiedade está ligada ao fortalecimento aberrante dos circuitos do medo e que esse fortalecimento possa bloquear as tentativas das redes neurais para inibir o medo regulando suas respostas ao medo (Belleau et al. 2018). Uma das teorias para a ação do circuito córtex pré-frontal medial(mCPF)-amígdala na extinção do medo em resposta à estímulos condicionados, em condições normais, é a ativação do córtex pré-frontal medial inibindo a produção das respostas amígdalares. Essa sobreposição de ação do mCPF leva a um menor tempo de congelamento. Porém, em situações de estresse a ação inibitória do mCPF sobre a amígdala fica prejudicada/diminuída e a amígdala domina o comportamento levando a uma resposta de congelamento maior, o que demonstra comprometimento do processo de extinção da memória a estímulos condicionados (Akirav e Maroun 2007).

Isso poderia explicar, ao menos em parte, porque os animais submetidos ao modelo de HHcy leve crônica apresentam maior tempo de imobilidade ou maior tempo para iniciar algumas tarefas, em uma primeira exposição a determinados aparatos. A alteração emocional pode ser relatada a alterações no condicionamento clássico ou pavloviano. As respostas não condicionadas e condicionadas ao medo consistem em mudanças nos níveis subjetivo, comportamental e fisiológico e incluem (em humanos) medo subjetivo aumentado e respostas como congelamento, mudanças na frequência cardíaca e condutância da pele, liberação de hormônios do estresse, sensibilidade à dor reduzida e potenciação do reflexo de sobressalto. O medo pode ser visto como uma reação específica a estímulos ameaçadores. Pode se transformar em um transtorno de ansiedade quando se torna desproporcional ao estímulo que o gera ou quando o medo é experimentado em situações inadequadas (Steinberg et al. 2020).

Esse comportamento pode ter sido gerado por mudanças no circuito do medo, gerando um medo incondicionado, que pode contribuir para prejuízos na aprendizagem e na memória. No entanto, essa observação deve ser melhor avaliada.

A avaliação da atividade das ATPases revelou aumento destas de forma estrutural-específica, estando a Na^+ , K^+ -ATPase aumentada na amígdala e a Mg^{2+} -ATPase aumentada no córtex pré-frontal. O aumento da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase tem sido relacionado a hiperexcitabilidade na amígdala, e este aumento foi relatado para ratos submetidos a tarefa de medo condicionado (Diehl et al., 2014). A regulação positiva da atividade da Mg^{2+} -ATPase pode sugerir uma tentativa de o córtex pré-frontal estar controlando os impulsos gerados pela amígdala. Contudo, a função da Mg^{2+} -ATPase nessas condições merece maiores estudos e atenção, uma vez que já foi demonstrado que tais animais podem apresentar prejuízos de memória (Lalonde et al. 2008; Wyse et al. 2020; Yakovleva et al. 2020) e que os níveis de Hcy tem sido relatados para estarem aumentados em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, assim como na demência (Arnaiz e Ordieres 2014; Shirafuji et al. 2018).

Ainda, a fim de traçar um panorama sobre os efeitos da HHcy leve crônica sobre estas duas estruturas e o comportamento observado no artigo 2 avaliamos os efeitos da HHcy leve crônica sobre a captação de glutamato e sobre o imunoconteúdo dos seus receptores, assim como o imunoconteúdo das subunidades catalíticas ($\alpha 1$ e $\alpha 3$) e regulatória ($\beta 1$) da Na^+ , K^+ -ATPase. O sistema glutamatérgico é o mais importante sistema excitatório cerebral e alterações na captação de glutamato podem levar a um maior tempo do glutamato na fenda sináptica, podendo induzir toxicidade glutamatérgica, a qual pode levar a morte neuronal (Olloquequi et al. 2018; Kumagai et al. 2019). Por ser a enzima responsável por reestabelecer o potencial de membrana e assim manter a excitabilidade neuronal normal após a transmissão sináptica, a Na^+ , K^+ -ATPase tem seu funcionamento diretamente relacionado à homeostase

cerebral, e está fortemente ligada a captação do glutamato da fenda sináptica após as sinapses (Kinoshita et al. 2016). No nosso estudo, observamos que somente a atividade da glutamina sintetase estava aumentada na amígdala e no córtex pré-frontal dos ratos. Os transportadores de glutamato e a recaptção de glutamato, assim como as subunidades catalíticas e regulatória da Na^+ , K^+ -ATPase estavam normais, em comparação aos controles. Não configuramos diretamente a excitotoxicidade relatada para a Hcy sobre o sistema glutamatérgico, no entanto, o experimento *ex vivo* mostrou que o antagonismo do receptor NMDA do glutamato parece proteger ao menos em parte dos danos deletérios oxidativos na amígdala, sem, no entanto evitar as alterações observadas nas ATPases na amígdala. Por outro lado, o antagonismo do receptor NMDA no córtex pré-frontal foi capaz de proteger tanto as alterações oxidativas como as alterações causadas nas atividades das ATPases (Na^+ , K^+ -ATPase e Mg^{2+} -ATPase). Com isso, demonstramos que o aumento dos níveis de Hcy causa alterações estrutura-específicas na amígdala e no córtex pré-frontal, que culminam em desbalanço redox e glutamatérgico que podem estar relacionados às alterações nas atividades das ATPases e ao comportamento semelhante a ansiedade observado nos animais. Ainda, essas alterações específicas em cada estrutura sugerem que pode estar ocorrendo o remanejamento e a readequação das estruturas para tentar compensar ou reverter os efeitos sobre o emocional dos animais. Demonstramos anteriormente que, a HHcy leve crônica reduz o número de entradas nos braços e a exploração do labirinto em cruz elevada, sem no entanto, alterar o tempo de permanência nos braços do labirinto 12h após a última injeção de Hcy, quando os níveis plasmáticos de Hcy retornam aos níveis basais (Wyse et al. 2020).

O antagonismo de NMDAR mostrou uma resposta estrutura-específica aos insultos causados pela Hcy. O glutamato induz uma redução rápida e dramática dos níveis de ATP nos neurônios, principalmente devido ao consumo elevado mediado pela atividade NMDAR e aumento da atividade Na^+ , K^+ -ATPase, que é sugerida como a principal consumidora de

energia durante a estimulação glutamatérgica (Foo et al. 2012). A estimulação NMDAR por óxido nítrico tem sido reportada para aumentar a atividade de Na^+ , K^+ -ATPase (Lavinsky et al. 2003). Com o artigo 1 mostramos que os níveis de óxido nítrico estão aumentados e os níveis de ATP estão diminuídos na amígdala dos ratos. O glutamato através da sintase de óxido nítrico (NOS), cGMP e PKG, estimula as subunidades Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 2$ e $\alpha 3$ do cérebro, com a cascata NMDAR glutamatérgica capaz de conduzir uma resposta adaptativa neuroprotetora a estímulos inflamatórios e insultos celulares (Kinoshita et al. 2016).

No artigo 3 avaliamos os efeitos da HHcy leve crônica sobre a motricidade e as possíveis alterações bioquímicas e moleculares sobre o metabolismo energético, homeostase redox, atividade e imunocnteúdo da AChE, expressão gênica de citocinas pró- e anti-inflamatórias e o imunocnteúdo de proteínas relacionadas aos processos oxidativos e inflamatórios e caspase 3 clivada em estriado e cerebelo de ratos. A manutenção da homeostase colinérgica é importante para diversas funções tanto cerebrais quanto motoras. A desregulação do sistema colinérgico pode levar a alterações cognitivas, de memória, motoras e neurodegeneração (Campanari et al. 2016; Bhandari 2018). Associado a isso, o aumento de citocinas pode indicar processo inflamatório que pode causar a perturbação da homeostase celular culminando em morte celular (Missiroli et al. 2018). O estriado e o cerebelo são estruturas cerebrais com ampla função, estando envolvidos nos mais diferentes processos, sejam cognitivos ou motores (Whishaw e Kolb 2005; Taylor e Ivry 2014; Saradjian 2015; Haber 2016; Barthas e Kwan 2017) e o seu comprometimento tem sido relacionado à neurodegeneração em pacientes com diagnóstico das doenças de Alzheimer, Parkinson e ELA (Looi e Walterfang 2013; Gellersen et al. 2017; Mormina et al. 2017; Abg Abd Wahab et al. 2019).

Neste estudo, a avaliação motora foi realizada pelos testes da escada horizontal e trave de equilíbrio que avaliam coordenação motora fina, teste de campo aberto que avalia a

locomoção e exploração, teste da suspensão que avalia tração e força, e pelo teste do pole vertical que avalia bradicinesia. O tratamento com Hcy não alterou quaisquer dos testes motores mencionados, no entanto, os animais do grupo Hcy apresentaram maior tempo para completar algumas tarefas, como por exemplo, um maior tempo de travessia no teste da trave de equilíbrio. O aumento do tempo de travessia nesse teste pode estar relacionado ao medo aumentado, uma vez que o teste é realizado em aparato com uma distância considerável do chão e pode indicar perigo ao animal (Carter et al. 2001; Tung et al. 2014).

Com relação aos parâmetros bioquímicos e moleculares avaliados em estriado e cerebelo, observamos que semelhante à amígdala e ao córtex pré-frontal, os animais apresentaram alterações e variações específicas em cada estrutura que podem estar relacionadas à manutenção da motricidade, e ao não comprometimento da coordenação motora fina e ou a qualquer dos parâmetros avaliados, como tração, força e bradicinesia. É importante salientar que o tempo de tratamento dos animais nesse modelo de HHcy leve crônica é de 30 dias. É possível que um período maior de tratamento possa causar alterações irreversíveis que comprometam a função motora dos animais. Com tudo, isso deve ser mais bem avaliado em estudos futuros. Nosso estudo demonstrou que a HHcy leve crônica, no estriado, aumentou os níveis de ERO, alterou a atividade das enzimas antioxidantes GPx e CAT, comprometeu a atividade da citocromo c oxidase da cadeia transportadora de elétrons, aumentou a atividade da AChE e diminuiu o seu imunocontéudo, assim como reduziu a expressão gênica do TNF- α e aumentou a expressão gênica da IL-1 β . No cerebelo, por sua vez, a HHcy leve crônica aumentou as ERO, aumentou a peroxidação lipídica, alterou o conteúdo de GSH e a relação das enzimas antioxidantes SOD/CAT, assim como reduziu as atividades do citocromo c oxidase e da AChE, além de reduzir o imunocontéudo da AChE e aumentar a expressão gênica TNF- α , IL-1 β , IL-10 e TGF- β . Contudo não foram observadas

alterações significativas nos imunoconteúdos do Nrf-2, NF- κ B, fosfo-NF- κ B e da caspase 3 clivada.

O aumento da produção de ERO (avaliado pelo aumento do DCF), e as alterações enzimáticas antioxidantes podem estar relacionados ao comprometimento da citocromo c oxidase (complexo IV da cadeia respiratória) e a expressão gênica das citocinas inflamatórias aumentadas observadas em cada estrutura. Essas alterações podem estar relacionadas ao aumento de danos celulares, mensurados pelo TBARS e pela redução do conteúdo de GSH nas estruturas. As alterações nas enzimas antioxidantes podem mensurar adaptações às produções de ERO/ERN, e as alterações no perfil redox podem conduzir a dano lipídico e proteico, comprometendo essas funções (Halliwell 2012; Schweinberger et al. 2014; Cobley et al. 2018).

A diminuição da expressão genica do TNF- α e o aumento da expressão gênica da IL-1 β no estriado e o aumento da expressão gênica do TNF- α , IL-1 β , IL-10 e TGF- β no cerebelo corroboram com as alterações de citocinas pela Hcy previamente descritas no soro, hipocampo e córtex total (Scherer et al. 2014). Nesse sentido, a regulação do Nrf-2 poderia estar ajudando no controle da resposta inflamatória (Holmström et al. 2017), pois foi demonstrado que a deficiência do Nrf-2 leva a um perfil inflamatório aumentado marcado por aumento de marcadores de ativação microglial clássicos, como COX-2, iNOS, IL-6, TNF- α , assim como a diminuição de Fizz-1, YM-1 e arginase-4 em áreas importantes relacionadas ao metabolismo da dopamina no estriado e no mesencéfalo ventral (Rojo et al. 2010). É relatado que o Nrf-2 e o NF- κ B apresentam um mecanismo de cross-talk no citosol. A proteína Keap 1, que é liberada do Nrf-2 no citosol, é um regulador negativo do NF- κ B (Tonelli et al. 2017). Sendo assim, o sistema Nrf-2 funcional é importante para regular a resposta inflamatória. Curiosamente, as abundâncias da proteína Nrf-2 total, p-NF- κ B total, p65 NF- κ B total e caspase-3 clivada não foram significativamente alteradas pela

HHcy nem no estriado e nem no cerebelo dos ratos, embora, tenha ocorrido um aumento das expressões gênicas de citocinas inflamatórias. O impacto negativo da superprodução de mediadores pró-inflamatórios pode gerar dano celular, levando a perda de função celular e contribuindo para o surgimento de distúrbios cerebrais (Stein et al. 2017).

O processo inflamatório é composto por diferentes etapas, uma fase aguda transitória, uma subfase aguda retardada – relacionada à infiltração celular, e uma fase proliferativa crônica – marcada por destruição tecidual e fibrose. A fase crônica está relacionada a liberação de citocinas que medeiam tanto a resposta humoral quanto a celular, como aumento das expressões de IL-10, TGF- β e TNF- α e - β (Feghali e Wright 1997; Urao and Koh 2016; Abdulkhaleq et al. 2018). No nosso estudo, o estriado e o cerebelo apresentaram diferentes estágios de liberação de citocinas, o que pode indicar que elas estão passando por estágios inflamatórios diferentes. O aumento da Hcy foi relacionado ao aumento dos níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β 1 e a expressão de mRNA de TGF- β 1 na fibrose intestinal em ratos (Ding et al. 2015). A rápida dinâmica entre o TGF- α e TGF- β 1 foi relatado como sendo sustentado por níveis elevados de TNF- α e HHcy no processo cirrótico em ratos (Tian et al. 2016). Além disso, a dieta hiper-metionineimica foi reportada para aumentar os níveis plasmáticos de Hcy e aumentar os níveis de IL-16, IL-17A, reduzindo os níveis de IL-10 e TGF- β no sangue e cérebro de ratos espontaneamente hipertensos (Zhang et al. 2019). Outro estudo demonstrou que o tratamento com hidrogenossulfito atenuou os efeitos do TGF- β 1 e do NF- κ B ativado na obstrução uretral induzida, mostrando a importância da via de transulfuração da Hcy na fibrose renal (Jung et al. 2013). A avaliação de outros mediadores inflamatórios celulares e humorais, frações nucleares e citosólicas dessas abundâncias proteicas e/ou iNOS, COX-2, GSK-3B e arginase-1 pode fornecer um melhor cenário dos efeitos da HHcy no processo inflamatório e na fibrose por ele originada. O aumento dos níveis de TNF- α e TGF- β no líquido

cefalorraquidiano foi reportado para agravar o processo degenerativo na demência vascular. Além disso, na demência vascular foi observada a diminuição da AChE no líquido cefalorraquidiano demonstrando prejuízos colinérgicos (Román 2004).

A ACh liberada nas fibras pré-ganglionares dos sistemas nervoso simpático e parassimpático (Quick et al. 2014) é fundamental para o funcionamento cognitivo, armazenamento de memória e recuperação (Darvesh et al. 2007; Saldanha 2017). A doença de Alzheimer está relacionada a anormalidades nos sistemas neurotransmissores colinérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e glutamatérgicos (Crow et al. 1984; Pohanka 2014; Abd Wahab et al. 2019). Pacientes com doença de Alzheimer perdem neurônios que secretam ACh, prejudicando o sistema colinérgico. No nosso estudo, observamos que a atividade da AChE foi aumentada no estriado e diminuída no cerebelo dos ratos pelo tratamento com Hcy. Além disso, o imunoconteúdo da AChE foi reduzido em ambas as estruturas. O aumento da atividade da AChE pode prejudicar a neurotransmissão colinérgica, reduzindo o tempo de ação da ACh na fenda sináptica. Por outro lado, a diminuição da atividade da AChE pode prejudicar a neurotransmissão colinérgica por aumentar a estimulação sináptica pela ACh, que pode levar a dessensibilização neuronal e ao comprometimento da neurotransmissão (Rasool et al. 1983; Campanari et al. 2016). A ACh tem um importante papel na modulação da resposta inflamatória relacionada à via anti-inflamatória colinérgica, que pode restaurar a homeostase celular (Pohanka 2014). Essas alterações podem estar associadas a uma resposta compensatória que poderia proteger as deficiências motoras. No entanto, com o tempo, se eles não forem normalizados, a função motora pode ser prejudicada.

O aumento do número de bolos fecais, também observado em alguns testes ansiosos, pode estar relacionado a alterações no sistema colinérgico. Os efeitos colinérgicos gastrointestinais estão relacionados aos efeitos da ACh em receptores colinérgicos, isso conduz ao peristaltismo e facilita a movimentação das fezes por meio do aumento do tônus

gastrointestinal e da contratilidade do músculo liso, relaxamento dos esfíncteres e liberando secreções gastrointestinais (Pohanka 2014).

Embora algumas alterações bioquímicas tenham sido observadas no estriado e cerebelo de ratos hiper-homocisteinêmicos não houve comprometimento da motricidade, contudo, os animais se mostraram temerosos para explorar os aparatos, podendo essas alterações ser tarefa-específica. A coordenação motora fina, a atividade locomotora e a força muscular dos membros anteriores e posteriores não foram alteradas pelo tratamento de 30 dias com Hcy. Esses achados devem ser mais bem estudados para compreender os reais efeitos do tratamento prolongado com Hcy na função motora. A HHcy pré-natal foi relatada para induzir estresse oxidativo e acelera o 'envelhecimento' das sinapses neuromusculares de mamíferos (Khuzakhmetova et al. 2019), prejudicando o comportamento semelhante à ansiedade, motricidade e cognição em ratos. Além disso, foi reportado que as respostas à HHcy variam com base em como ela foi alcançada e por quanto tempo ela durou. Uma meta-análise relatou que os efeitos neurotóxicos dos níveis de Hcy contribuem para o desequilíbrio da neurotransmissão nos circuitos motores e estão relacionados ao risco aumentado de lesões vasculares e disfunções cognitivas (Zoccolella et al. 2006). Os níveis elevados de Hcy (0,3-0,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal, Hcy superior a 100 μM) foram reportados para prejudicar a homeostase cerebelar e comprometer o desempenho de ratos no teste do rotarod (Koohepeyma et al. 2019), além de ter sido relatado a comprometimento da homeostase do músculo esquelético de ratos (Kolling et al. 2013, 2014). A infusão de Hcy na substancia nigra na dose de 1,0 μmol , em ratos, foi relatada por inibir a atividade do complexo I, diminuir os níveis de dopamina no estriado e causar perda dopaminérgica no mesencéfalo, causando anormalidades motoras semelhantes às observadas em modelo experimental da doença de Parkinson (Bhattacharjee e Borah 2016).

6. CONCLUSÕES

Os resultados da presente tese mostrou que a indução de HHcy leve crônica quimicamente induzida em roedores causou as seguintes alterações:

- Comprometeu a homeostase redox da amígdala, córtex pré-frontal, estriado e cerebelo.
- Aumentou o imunoconteúdo nuclear do Nrf-2 em amígdala, mas não alterou em córtex pré-frontal.
- Aumentou a atividade da SDH e complexo II em amígdala, mas não alterou em córtex pré-frontal, estriado e cerebelo.
- Diminuiu a atividade da citocromo c oxidase em amígdala, estriado e cerebelo, mas não alterou em córtex pré-frontal.
- Diminuiu os níveis de ATP em amígdala, mas não alterou em corte pré-frontal.
- Aumentou o dano ao DNA em amígdala e córtex pré-frontal.
- Aumentou a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase na amígdala, mas não alterou em córtex pré-frontal.
- Não alterou o imunoconteúdo das subunidades catalíticas $\alpha 1$ e $\alpha 3$ e regulatória $\beta 1$ da Na^+ , K^+ -ATPase em amígdala e córtex pré-frontal.
- Aumentou a atividade da Mg^{2+} -ATPase e glutamina sintetase no córtex pré-frontal, mas não alterou em amígdala.
- Aumentou a atividade total das ATPases em amígdala e córtex pré-frontal.
- Não alterou a captação de glutamato e o imunoconteúdo dos receptores do glutamato GLAST e GLT-1 em amígdala e córtex pré-frontal.

- O antagonismo do receptor NMDA do glutamato protegeu as alterações na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase e ATPases totais no córtex pré-frontal, mas não na amígdala.
- O antagonismo do receptor NMDA do glutamato protegeu parcialmente as alterações na homeostase redox em amígdala e córtex pré-frontal.
- Aumentou a atividade da AChE em estriado e diminuiu a atividade da AChE no cerebelo.
- Diminuiu o imunoconteúdo da AChE no estriado e no cerebelo.
- Não alterou o imunoconteúdo das proteínas Nrf-2, NF-κB, fosfo-NF-κB e da caspase 3 clivada em estriado e cerebelo.
- Diminuiu a expressão gênica de TNF-α e aumentou a expressão gênica de IL-1β no estriado, mas não alterou a expressão gênica de IL-6, IL-10 e TGF-β.
- Aumentou a expressão gênica de TNF-α, IL-1β, IL-10 e TGF-β em cerebelo, mas não alterou a expressão gênica de IL-6.
- Induziu comportamento semelhante à ansiedade, mas não alterou a motricidade.

Tomados em conjunto esses achados mostram que a HHcy leve crônica está comprometendo o comportamento emocional, desregulando a homeostase redox, energética, glutamatérgica, colinérgica, e a atividade das ATPases e a expressão gênica de citocinas inflamatórias em estruturas cerebrais de maneira estrutura-específica, que podem estar favorecendo o desenvolvimento do comportamento semelhante à ansiedade nos roedores. Não foram observados danos motores para esse período de tratamento, o que indica que mais estudos são necessários para entender os reais efeitos do aumento leve dos níveis de Hcy, com relação a tempo-efeito da dose nos roedores sobre o comportamento motor. Essas alterações bioquímico-moleculares apontam para um rearranjo na função das estruturas que mantêm as células funcionais, protegendo algumas funções cerebrais.

PERSPECTIVAS

Avaliar os efeitos da HHCY leve crônica em ratos sobre:

- Dano muscular;
- Níveis de HCY e dos demais aminoácidos em encéfalo e tecido muscular;
- A integridade e a viabilidade celular em encéfalo e tecido muscular;
- A função mitocondrial (massa e o potencial) em encéfalo e tecido muscular;
- Outros parâmetros de metabolismo energético tais como: glicólise, ciclo de Krebs, dentre outros, em tecido muscular;
- Morfologia do encéfalo e do tecido muscular;
- Avaliar os efeitos da HHCY crônica leve em ratos.

APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi financiado pelo Edital Universal/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), INCT (EN 465671/2014-4)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil, e PRONEX(16/2551-0000465-0)/Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) – Brasil.

REFERÊNCIAS

- Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, et al (2018) The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet world* 11:627–635. doi: 10.14202/vetworld.2018.627-635
- Abg Abd Wahab DY, Gau CH, Zakaria R, et al (2019) Review on Cross Talk between Neurotransmitters and Neuroinflammation in Striatum and Cerebellum in the Mediation of Motor Behaviour. *Biomed Res Int* 2019:.. doi: 10.1155/2019/1767203
- Akbar M, Essa MM, Daradkeh G, et al (2016) Mitochondrial Dysfunction and Cell Death in Neurodegenerative Diseases through Nitroxidative Stress. *Brain Res* 34–55. doi: 10.1016/j.brainres.2016.02.016
- Akirav I, Maroun M (2007) The Role of the Medial Prefrontal Cortex-Amygdala Circuit in Stress Effects on the Extinction of Fear. *Neural Plast* 2007:.. doi: 10.1155/2007/30873
- Ao M, Tsuji H, Shide K, et al (2017) High prevalence of vitamin B-12 insufficiency in patients with Crohn's disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 26:1076–1081. doi: 10.6133/apjcn.022017.13
- Aperia A, Akkuratov EE, Fontana JM, Brismar H (2016) Na⁺, K⁺-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 310:491–5. doi: 10.1152/ajpcell.00359.2015
- Arnaiz GR de L, Ordieres MGL (2014) Brain Na⁺, K⁺-ATPase activity in aging and disease. *Int J Biomed Sci* 10:85–102
- Arteni NS, Pereira LO, Rodrigues AL, et al (2010) Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res* 210:92–8. doi: 10.1016/j.bbr.2010.02.015
- Bailey KR, Crawley JN (2009) Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ (ed)

- Methods of Behavior Analysis in Neuroscience., 2nd editio. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL)
- Barthas F, Kwan AC (2017) Secondary Motor Cortex: Where ‘Sensory’ Meets ‘Motor’ in the Rodent Frontal Cortex. *Trends Neurosci* 40:181–193. doi: 10.1016/j.tins.2016.11.006
- Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R (2016) Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity. *J Exp Neurosci* 2016:23–48. doi: 10.4137/JEN.S39887
- Belleau EL, Pedersen WS, Miskovich TA, et al (2018) Cortico-limbic connectivity changes following fear extinction and relationships with trait anxiety. *Soc Cogn Affect Neurosci* 13:1037–1046. doi: 10.1093/scan/nsy073
- Benz B, Grima G, Do KQ (2004) Glutamate-induced homocysteic acid release from astrocytes: possible implication in glia-neuron signaling. *Neuroscience* 124:377–386. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.067>
- Bhandari P (2018) CHAPTER 6 Cholinergic and Anticholinergic System
- Bhattacharjee N, Borah A (2016) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are the underlying events of dopaminergic neurodegeneration in homocysteine rat model of Parkinson’s disease. *Neurochem Int* 101:48–55. doi: 10.1016/j.neuint.2016.10.001
- Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH (2017) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A Step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 1863:1066–1077. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.010.Mitochondrial
- Boers GH (2001) [From gene to disease; from homocysteine to hyperhomocysteinemia]. *Ned Tijdschr Geneesk* 145:956–958
- Bona E, Johansson BB, Hagberg H (1997) Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr Res* 42:678–683. doi: 10.1203/00006450-199711000-00021

- Bonetti F, Brombo G, Zuliani G (2016) The relationship between hyperhomocysteinemia and neurodegeneration. *Neurodegener Dis Manag* 6:133–145. doi: 10.2217/nmt-2015-0008
- Campanari M-L, García-Ayllón M-S, Ciura S, et al (2016) Neuromuscular Junction Impairment in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Reassessing the Role of Acetylcholinesterase. *Front Mol Neurosci* 9:1–8. doi: 10.3389/fnmol.2016.00160
- Carageorgiou H, Sideris AC, Messari I, et al (2008) The effects of rivastigmine plus selegiline on brain acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-, Mg²⁺- ATPase activities, antioxidant status, and learning performance of aged rats. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4:687–699
- Carter RJ, Morton J, Dunnett SB (2001) Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit 8.12*. doi: 10.1002/0471142301.ns0812s15
- Chung K, Chiou H, Chen Y (2017) Associations between serum homocysteine levels and anxiety and depression among children and adolescents in Taiwan. *Sci Rep* 1–7. doi: 10.1038/s41598-017-08568-9
- Chung YC, Kruyer A, Yao Y, et al (2016) Hyperhomocysteinemia exacerbates Alzheimer's disease pathology by way of the β -amyloid fibrinogen interaction. *J Thromb Haemost* 14:1442–1452. doi: 10.1111/jth.13340
- Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM (2018) Redox Biology 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol* 15:490–503. doi: 10.1016/j.redox.2018.01.008
- Cornelius F, Habeck M, Kanai R, et al (2015) General and specific lipid-protein interactions in Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1848:1729–1743. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.03.012
- Crema L, Schlabitz M, Tagliari B, et al (2010) Na⁺, K⁺-ATPase activity is reduced in Amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. *Neurochem Res* 35:1787–95. doi: 10.1007/s11064-010-0245-9

- Crow TJ, Cross AJ, Cooper SJ, et al (1984) Neurotransmitter receptors and monoamine metabolites in the brains of patients with Alzheimer-type dementia and depression, and suicides. *Neuropharmacology* 23:. doi: 10.1016/0028-3908(84)90100-X
- Da Cunha MJ, Da Cunha AA, Ferreira AGK, et al (2012) Physical exercise reverses glutamate uptake and oxidative stress effects of chronic homocysteine administration in the rat. *Int J Dev Neurosci* 30:69–74. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2012.01.001
- da Silva Fiorin F, Ferreira AP de O, Ribeiro LR, et al (2016) The Impact of Previous Physical Training on Redox Signaling after Traumatic Brain Injury in Rats: A Behavioral and Neurochemical Approach. *J Neurotrauma* 33:1317–30. doi: 10.1089/neu.2015.4068
- Darvesh S, Walsh R, Martin E (2007) Homocysteine thiolactone and human cholinesterases. *Cell Mol Neurobiol* 27:33–48. doi: 10.1007/s10571-006-9114-0
- de Rezende MM, D’Almeida V (2014) Central and systemic responses to methionine-induced hyperhomocysteinemia in mice. *PLoS One* 9:e105704. doi: 10.1371/journal.pone.0105704
- de S. Moreira D, Figueiró PW, Siebert C, et al (2018) Chronic Mild Hyperhomocysteinemia Alters Inflammatory and Oxidative/Nitrative Status and Causes Protein/DNA Damage, as well as Ultrastructural Changes in Cerebral Cortex: Is Acetylsalicylic Acid Neuroprotective? *Neurotox Res* 33:580–592. doi: 10.1007/s12640-017-9847-1
- De Vasconcellos APS, Zugno AI, Dos Santos AHDP, et al (2005) Na⁺,K⁺-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: Effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. *Neurobiol Learn Mem* 84:102–110. doi: 10.1016/j.nlm.2005.05.002
- Desmedt A, Marighetto A, Richter-Levin G, Calandreau L (2015) Adaptive emotional memory: the key hippocampal-amygdalar interaction. *Stress* 18:297–308
- Ding H, Gan H-Z, Fan W-J, et al (2015) Homocysteine promotes intestinal fibrosis in rats

- with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Dig Dis Sci* 60:375–381. doi: 10.1007/s10620-014-3379-9
- Do KQ, Benz B, Binns KE, et al (2004) Release of homocysteic acid from rat thalamus following stimulation of somatosensory afferents in vivo: Feasibility of glial participation in synaptic transmission. *Neuroscience* 124:387–393. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.08.068
- Dos Santos EF, Busanello ENB, Miglioranza A, et al (2009) Evidence that folic acid deficiency is a major determinant of hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *Metab Brain Dis* 24:257–269. doi: 10.1007/s11011-009-9139-4
- dos Santos TMTM, Kolling J, Siebert C, et al (2017) Effects of previous physical exercise to chronic stress on long-term aversive memory and oxidative stress in amygdala and hippocampus of rats. *Int J Dev Neurosci* 56:58–67. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2016.12.003
- Eichenbaum H (2016) Memory: Organization and Control. *Annu Rev Psychol* 1–27. doi: 10.1146/annurev-psych-010416-044131
- El Assar M, Angulo J, Rodríguez-Mañas L (2013) Free Radical Biology and Medicine Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med* 65:380–401. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.003
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58:39–46. doi: 10.1016/j.biopha.2003.11.004
- Feghali CA, Wright TM (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2:d12-26. doi: 10.2741/a171
- Finkelstein JD (2007) Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 45:1694–1699. doi: 10.1515/CCLM.2007.341
- Folstein M, Liu T, Peter I, et al (2007) The homocysteine hypothesis of depression. *Am J*

- Psychiatry 164:861–867. doi: 10.1176/ajp.2007.164.6.861
- Foo K, Blumenthal L, Man HY (2012) Regulation of neuronal bioenergy homeostasis by glutamate. *Neurochem Int* 61:389–396. doi: 10.1016/j.neuint.2012.06.003
- Gellersen HM, Guo CC, O’callaghan C, et al (2017) Cerebellar atrophy in neurodegeneration - a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:780–788. doi: 10.1136/jnnp-2017-315607
- Giovannini MG, Pazzagli M, Malmberg-Aiello P, et al (2005) Inhibition of acetylcholine-induced activation of extracellular regulated protein kinase prevents the encoding of an inhibitory avoidance response in the rat. *Neuroscience* 136:15–32. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.046
- Grigor’yan GA, Gulyaeva N V (2017) Modeling Depression in Animals : Behavior as the Basis for the Methodology , Assessment Criteria , and Classification. *Neurosci Behav Physiol* 47:204–216. doi: 10.1007/s11055-016-0386-7
- Grimm A, Eckert A (2017) Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J Neurochem* 143:418–431. doi: 10.1111/jnc.14037
- Gutteridge JMC, Halliwell B (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 393:561–564. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.071
- Haber SN (2016) Corticostriatal circuitry. *Dialogues Clin Neurosci* 18:7–21. doi: 10.31887/DCNS.2016.18.1/shaber
- Halliwell B (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 70:257–265. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x
- Halliwell B (2014) Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J* 37:99–105. doi: 10.4103/2319-4170.128725
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford

- 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. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776
- Hannibal L, Blom HJ (2016) Homocysteine and disease: Causal associations or epiphenomenons? *Mol Aspects Med* 53:36–42. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.003
- Herrmann W (2006) Significance of hyperhomocysteinemia. *Clin Lab* 52:367–374
- Holmström KM, Kostov R V., Dinkova-Kostova AT (2017) The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol* 2:80–91. doi: 10.1016/j.cotox.2016.10.002
- Ikeda K, Onaka T, Yamakado M, et al (2003) Degeneration of the amygdala/piriform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice. *J Neurosci* 23:4667–76. doi: 23/11/4667 [pii]
- Izquierdo I, Furini CRG, Myskiw JC (2016) Fear Memory. *Physiol Rev* 96:695–750. doi: 10.1152/physrev.00018.2015
- Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68:285–316. doi: 10.1006/nlme.1997.3799
- Jung K-J, Jang H-S, Kim JI, et al (2013) Involvement of hydrogen sulfide and homocysteine transsulfuration pathway in the progression of kidney fibrosis after ureteral obstruction. *Biochim Biophys Acta* 1832:1989–1997. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.06.015
- Khuzakhmetova V, Yakovleva O, Dmitrieva S, et al (2019) Prenatal hyperhomocysteinemia induces oxidative stress and accelerates “aging” of mammalian neuromuscular synapses. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci* 75:1–12. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.03.004
- Kim HK, Nunes PV, Oliveira KC, et al (2016) Neuropathological relationship between major depression and dementia: A hypothetical model and review. *Prog Neuro-*

- Psychopharmacology Biol Psychiatry 67:51–7. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.01.008
- Kinoshita PF, Leite JA, Orellana AMM, et al (2016) The influence of Na⁺, K⁺-ATPase on glutamate signaling in neurodegenerative diseases and senescence. *Front Physiol* 7:1–19. doi: 10.3389/fphys.2016.00195
- Kolling J, Scherer EBS, Siebert C, et al (2014) Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats. *Gene* 545:. doi: 10.1016/j.gene.2014.05.005
- Kolling J, Scherer EBS, Siebert C, et al (2013) Homocysteine induces energy imbalance in rat skeletal muscle: is creatine a protector? *Cell Biochem Funct* 31:575–584. doi: 10.1002/cbf.2938
- Koohpeyma H, Goudarzi I, Elahdadi Salmani M, et al (2019) Postnatal Administration of Homocysteine Induces Cerebellar Damage in Rats: Protective Effect of Folic Acid. *Neurotox Res* 35:724–738. doi: 10.1007/s12640-018-9979-y
- Kumagai A, Sasaki T, Matsuoka K, et al (2019) Monitoring of Glutamate-Induced Excitotoxicity by Mitochondrial Oxygen Consumption. *Synapse* 73:e22067. doi: 10.1002/syn.22067
- Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, et al (2017) The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab* 14:1–12. doi: 10.1186/s12986-017-0233-z
- Kuprash D, Nedospasov S (2016) Molecular and Cellular Mechanisms of Neuroinflammation. *Biochem* 81:1477–1480. doi: 10.1155/2017/8417183
- Lalonde R, Barraud H, Ravey J, et al (2008) Effects of a B-vitamin-deficient diet on exploratory activity, motor coordination, and spatial learning in young adult Balb/c mice. *Brain Res* 1188:122–131. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.068
- Lamprecht R (2016) The Role of Actin Cytoskeleton in Memory Formation in Amygdala.

9:1–7. doi: 10.3389/fnmol.2016.00023

Larsen BR, Stoica A, Macaulay N (2016) Managing Brain Extracellular K⁺ during Neuronal Activity : The Physiological Role of the Na⁺ / K⁺ -ATPase Subunit Isoforms. 7:1–10. doi: 10.3389/fphys.2016.00141

Lavinsky D, Arteni NS, Netto CA (2003) Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. *Behav Brain Res* 141:19–24. doi: 10.1016/s0166-4328(02)00326-1

Lecomte M, Bertolus C, Santamaria J, et al (2014) Selective disruption of acetylcholine synthesis in subsets of motor neurons : A new model of late-onset motor neuron disease. *Neurobiol Dis* 65:102–111. doi: 10.1016/j.nbd.2014.01.014

Lehner M, Wisłowska-stanek A, Taracha E, et al (2010) Neurobiology of Learning and Memory The effects of midazolam and D -cycloserine on the release of glutamate and GABA in the basolateral amygdala of low and high anxiety rats during extinction trial of a conditioned fear test. 94:468–480. doi: 10.1016/j.nlm.2010.08.014

Lewerenz J, Maher P, Maher P (2015) Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases — What is the Evidence ? 9:1–20. doi: 10.3389/fnins.2015.00469

Liew S, Gupta E Das (2014) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism : Epidemiology , metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet* 58:1–10. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.10.004

Liu YY, Zhou XY, Yang LN, et al (2017) Social defeat stress causes depression-like behavior with metabolite changes in the prefrontal cortex of rats. *PLoS One* 12:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0176725

Longoni A, Bellaver B, Bobermin LD, et al (2017) Homocysteine Induces Glial Reactivity in Adult Rat Astrocyte Cultures. *Mol Neurobiol* 55:1966–1976. doi: 10.1007/s12035-017-0463-0

- Looi JCL, Walterfang M (2013) Striatal morphology as a biomarker in neurodegenerative disease. *Mol Psychiatry* 18:417–424. doi: 10.1038/mp.2012.54
- Machado FR, Ferreira AGK, Da Cunha AA, et al (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. doi: 10.1007/s11011-011-9232-3
- Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, et al (2009) The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: Leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis* 24:27–53. doi: 10.1007/s11011-008-9118-1
- Mah L, Szabuniewicz C, Fiocco AJ (2016) Can anxiety damage the brain? *Curr Opin Psychiatry* 29:56–63. doi: 10.1097/YCO.0000000000000223
- Marazziti D, Baroni S, Picchetti M, et al (2012) Psychiatric disorders and mitochondrial dysfunctions. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:270–275
- Marsden WN (2011) Stressor-induced NMDAR dysfunction as a unifying hypothesis for the aetiology, pathogenesis and comorbidity of clinical depression. *Med Hypotheses* 77:508–528. doi: 10.1016/j.mehy.2011.06.021
- Martínez Y, Li X, Liu G, et al (2017) The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids* 49:2091–2098. doi: 10.1007/s00726-017-2494-2
- Matté C, Mussulini BHMBHM, dos Santos TMTM, et al (2010) Hyperhomocysteinemia reduces glutamate uptake in parietal cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 28:183–187. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.11.004
- McCully KS (2015) Homocysteine Metabolism, Atherosclerosis, and Diseases of Aging. *Compr Physiol* 6:471–505. doi: 10.1002/cphy.c150021
- McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM (2012) Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62:3–12. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.014

- Medvedev DV, Zvyagina VI, Uryasev OM, et al (2017) Metabolic changes in pulmonary mitochondria of rats with experimental hyperhomocysteinemia. *Biomeditsinskaya Khimiya* 63:248–254. doi: 10.18097/pbmc20176303248
- Meyer A, Laverny G, Bernardi L, et al (2018) Mitochondria: An organelle of bacterial origin controlling inflammation. *Front Immunol* 9:1–8. doi: 10.3389/fimmu.2018.00536
- Minagawa H, Watanabe A, Akatsu H, et al (2010) Homocysteine , Another Risk Factor for Alzheimer Disease , Impairs Apolipoprotein E3 Function * □. *J Biol Chem* 285:38382–38388. doi: 10.1074/jbc.M110.146258
- Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, et al (2009) Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 15:RA209-219. doi: 878204 [pii]
- Missiroli S, Patergnani S, Caroccia N, et al (2018) Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death Dis* 9:. doi: 10.1038/s41419-017-0027-2
- Morava É, Kozicz T (2013) Mitochondria and the economy of stress (mal)adaptation. *Neurosci Biobehav Rev* 37:668–80. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.02.005
- Mormina E, Petracca M, Bommarito G, et al (2017) Cerebellum and neurodegenerative diseases: Beyond conventional magnetic resonance imaging. *World J Radiol* 9:371–388. doi: 10.4329/wjr.v9.i10.371
- Morris G, Berk M (2015) The many roads to mitochondrial dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. *BMC Med* 13:1–24. doi: 10.1186/s12916-015-0310-y
- Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, et al (2007) Deficiency in Na⁺,K⁺-ATPase Alpha Isoform Genes Alters Spatial Learning, Motor Activity, and Anxiety in Mice. *J Neurosci* 27:616–26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4464-06.2007
- Moustafa A, Hewedi D, Eissa A, et al (2015) Homocysteine levels in neurological disorders. In: Farooqui T, Farooqui AA (eds) *Diet and exercise in cognitive function and neurological diseases*, First Edit. John Wiley & Sons, Inc., pp 73–81

- Moustafa AA, Hewedi DH, Eissa AM, et al (2014) Homocysteine levels in schizophrenia and affective disorders — focus on cognition. *Front Behav Neurosci* 8:1–10. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00343
- Mudd SH (2011) Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 157:3–32. doi: 10.1002/ajmg.c.30293
- Neves LB, Macedo DM, Lopes AC (2004) Homocisteína. *J Bras Patol e Med Lab* 40:311–320. doi: 10.1590/S1676-24442004000500006
- Nielsen CK, Arnt J, Sa C (2000) Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress : interstrain and interindividual differences. *107:21–33*
- Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, et al (2018) Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. *J Psychopharmacol* 32:265–275. doi: 10.1177/0269881118754680
- Parkin GM, Udawela M, Gibbons A, Dean B (2018) Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders. *World J Psychiatry* 8:51–63. doi: 10.5498/wjp.v8.i2.51
- Patki G, Solanki N, Atrooz F, et al (2013) Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res* 1539:73–86. doi: 10.1016/j.brainres.2013.09.033
- Pazaiti A, Soubasi V, Spandou E, et al (2008) Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: The neuroprotective role of MgSO₄. *Neonatology* 95:33–40. doi: 10.1159/000151753
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149–167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7

- Pereira LC, Souza AO, Pazin M, Dorta DJ (2012) Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. *Rev Bras Toxicol* 25:1–14
- Permoda-Osip A, Dorszewska J (2013) Hyperhomocysteinemia in Bipolar Depression : Clinical and Biochemical Correlates. 193–196. doi: 10.1159/000355292
- Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, et al (2014) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J Physiol Pharmacol* 65:15–23
- Pohanka M (2014) Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. doi: 10.3390/ijms15069809
- Porsolt RD, Pichon M Le, Jalfre M (1977) Depression : a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730–732
- Quick M, Zhang D, Perez XA, Bordia T (2014) Role for the nicotinic cholinergic system in movement disorders; therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 144:50–59. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.05.004
- Quintanilla RA, Tapia C, Pérez MJ (2017) Possible role of mitochondrial permeability transition pore in the pathogenesis of Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun* 483:1078–1083. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.054>
- Rasool CG, Chad D, Bradley WG, et al (1983) Acetylcholinesterase and ATPases in motor neuron degenerative diseases. 430–435
- Rojo AI, Innamorato NG, Martín-Moreno AM, et al (2010) Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Glia* 58:588–598. doi: 10.1002/glia.20947
- Román GC (2004) Vascular dementia. Advances in nosology, diagnosis, treatment and prevention. *Panminerva Med* 46:207–215
- Rueda CB, Llorente-Folch I, Traba J, et al (2016) Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters

- (CaMCs). *BBA - Bioenerg* 1857:1158–1166. doi: 10.1016/j.bbabbio.2016.04.003
- Sachdev PS (2005) Homocysteine and brain atrophy. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 29:1152–1161. doi: 10.1016/J.PNPBP.2005.06.026
- Saldanha C (2017) Human erythrocyte acetylcholinesterase in health and disease. *Molecules* 22:. doi: 10.3390/molecules22091499
- Samavarchi Tehrani S, Mahmoodzadeh Hosseini H, Yousefi T, et al (2018) The crosstalk between trace elements with DNA damage response, repair, and oxidative stress in cancer. *J Cell Biochem* 1–26. doi: 10.1002/jcb.27617
- Sanches EF, Arteni NS, Scherer EB, et al (2013) Are the consequences of neonatal hypoxia-ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization? *Brain Res* 1507:105–114. doi: 10.1016/j.brainres.2013.02.040
- Sanui H, Rubin H (1982) Changes of intracellular and externally bound cations accompanying serum stimulation of mouse BALB/c 3T3 cells. *Exp Cell Res* 15–25
- Saradjian AH (2015) Sensory modulation of movement, posture and locomotion. *Neurophysiol Clin* 45:255–267. doi: 10.1016/j.neucli.2015.09.004
- Scaglia F (2010) The role of mitochondrial dysfunction in psychiatric disease. *Dev Disabil Res Rev* 16:136–143. doi: 10.1002/ddrr.115
- Scherer EBS, da Cunha AA, Kolling J, et al (2011) Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *Int J Dev Neurosci* 29:693–699. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.06.004
- Scherer EBS, Loureiro SO, Vuaden FC, et al (2013) Mild hyperhomocysteinemia reduces the activity and immunocontent, but does not alter the gene expression, of catalytic α subunits of cerebral Na⁺,K⁺-ATPase. *Mol Cell Biochem* 378:91–97. doi: 10.1007/s11010-013-1598-6
- Scherer EBS, Loureiro SO, Vuaden FC, et al (2014) Mild Hyperhomocysteinemia Increases

- Brain Acetylcholinesterase and Proinflammatory Cytokine Levels in Different Tissues. *Mol Neurobiol* 50:589–596. doi: 10.1007/s12035-014-8660-6
- Schweinberger BM, Schwieder L, Scherer E, et al (2014) Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain Na⁺,K⁺-ATPase/Mg²⁺-ATPase activity and oxidative status of the offspring. *Metab Brain Dis* 29:153–60. doi: 10.1007/s11011-013-9451-x
- Shirafuji N, Hamano T, Yen SH, et al (2018) Homocysteine increases tau phosphorylation, truncation and oligomerization. *Int J Mol Sci* 19:. doi: 10.3390/ijms19030891
- Skovby F, Gaustadnes M, Mudd SH (2010) A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine β-synthase deficiency. *Mol Genet Metab* 2010 99:1–7. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.09.009.A
- Skovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, et al (2016) The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *Int J Mol Sci* 17:1–18. doi: 10.3390/ijms17101733
- Song S-H, Jee Y-S, Ko I-G, et al (2018) Treadmill exercise and wheel exercise improve motor function by suppressing apoptotic neuronal cell death in brain inflammation rats. *J Exerc Rehabil* 14:911–919. doi: 10.12965/jer.1836508.254
- Sørensen JT, Gaustadnes M, Stabler SP, et al (2016) Molecular and biochemical investigations of patients with intermediate or severe hyperhomocysteinemia. *Mol Genet Metab* 117:344–350. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.12.010
- Stein DJ, Vasconcelos MF, Albrechet-Souza L, et al (2017) Microglial Over-Activation by Social Defeat Stress Contributes to Anxiety- and Depressive-Like Behaviors. *Front Behav Neurosci* 11:207. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00207
- Steinberg EE, Gore F, Heifets BD, et al (2020) Amygdala-Midbrain Connections Modulate Appetitive and Aversive Learning. *Neuron* 106:1026-1043.e9. doi:

10.1016/j.neuron.2020.03.016

Suhail M (2010) Na, K-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res* 2:1–17. doi:

10.4021/jocmr2010.02.263w

Sütt S, Altperer a., Reimets R, et al (2015) Wfs1-deficient animals have brain-region-specific

changes of Na⁺, K⁺-ATPase activity and mRNA expression of α 1 and β 1 subunits. *J Neurosci Res* 93:530–537. doi: 10.1002/jnr.23508

Neurosci Res 93:530–537. doi: 10.1002/jnr.23508

Swart KMA, Enneman AW, Wijngaarden JP Van, et al (2013) Homocysteine and the

methylenetetrahydrofolate reductase 677C - T polymorphism in relation to muscle mass and strength, physical performance and postural sway. *Eur J Clin Nutr* 67:743–748. doi:

10.1038/ejcn.2013.97

Tagliari B, Dos Santos TM, Cunha AA, et al (2010) Chronic variable stress induces oxidative stress and decreases butyrylcholinesterase activity in blood of rats. *J Neural Transm*

1067–76. doi: 10.1007/s00702-010-0445-0

Tagliari B, Tagliari AP, Schmitz F, et al (2011) Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochem Res* 36:487–93. doi:

10.1007/s11064-010-0367-0

Tanriover G, Seval-Celik Y, Ozsoy O, et al (2010) The effects of docosahexaenoic acid on glial derived neurotrophic factor and neurturin in bilateral rat model of parkinson's

disease. *Folia Histochem Cytobiol* 48:434–441. doi: 10.2478/v10042-010-0047-6

Taylor JA, Ivry RB (2014) Cerebellar and Prefrontal Cortex Contributions to Adaptation, Strategies, and Reinforcement Learning. *Prog Brain Res* 210:217–253. doi:

10.1016/B978-0-444-63356-9.00009-1

Theurey P, Pizzo P (2018) The aging mitochondria. *Genes (Basel)* 9:. doi:

10.3390/genes9010022

- Tian X, Zhang H, Wang L, et al (2016) [Dynamic changes of TGF- α and TGF- β 1 in rats with liver cirrhosis induced by multiple pathogenic factors]. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese J Appl Physiol* 32:65–68
- Tominaga K, Suzuki HI (2019) TGF- β Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology. *Int J Mol Sci* 20:. doi: 10.3390/ijms20205002
- Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA (2017) Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 29:1727–45. doi: 10.1089/ars.2017.7342
- Tung VWK, Burton TJ, Dababneh E, et al (2014) Behavioral Assessment of the Aging Mouse Vestibular System. *J Vis Exp* 1–11. doi: 10.3791/51605
- Urao N, Koh TJ (2016) 5 - Manipulating inflammation to improve healing. In: Ågren MSBT-WHB (ed). Woodhead Publishing, pp 117–150
- Vanzella C, Sanches EF, Odorczyk FK, et al (2017) Forced Treadmill Exercise Prevents Spatial Memory Deficits in Aged Rats Probably Through the Activation of Na⁺, K⁺-ATPase in the Hippocampus. *Neurochem Res* 42:. doi: 10.1007/s11064-017-2196-x
- Veeranki S, Tyagi SC (2013) Defective homocysteine metabolism: Potential implications for skeletal muscle malfunction. *Int J Mol Sci* 14:15074–15091. doi: 10.3390/ijms140715074
- Venditti P, Di Meo S (2020) The Role of Reactive Oxygen Species in the Life Cycle of the Mitochondrion. *Int J Mol Sci* 21:2173. doi: 10.3390/ijms21062173
- Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. doi: 10.1038/nprot.2007.44
- Wan L, Li Y, Zhang Z, et al (2018) Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Transl Psychiatry* 8:242. doi: 10.1038/s41398-018-0276-6
- Wang X, Michaelis EK (2010) Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the

- brain. *Front Aging Neurosci* 2:1–13. doi: 10.3389/fnagi.2010.00012
- Whishaw IQ, Kolb B (2005) *The behavior of the laboratory rat : a handbook with tests*.
Oxford University Press
- Williams KT, Schalinske KL (2010) Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. *BioFactors* 36:19–24. doi: 10.1002/biof.71
- Wyse ATS, Sanches EF, Dos Santos TM, et al (2020) Chronic mild hyperhomocysteinemia induces anxiety-like symptoms, aversive memory deficits and hippocampus atrophy in adult rats: New insights into physiopathological mechanisms. *Brain Res* 1728:146592
- Yakovleva O, Bogatova K, Mukhtarova R, et al (2020) Hydrogen Sulfide Alleviates Anxiety, Motor, and Cognitive Dysfunctions in Rats with Maternal Hyperhomocysteinemia via Mitigation of Oxidative Stress. *Biomolecules* 10:. doi: 10.3390/biom10070995
- Yilmazer-hanke D, Loughlin EO, Mcdermott K (2016) Review Contribution of Amygdala Pathology to Comorbid Emotional Disturbances in Temporal Lobe Epilepsy. 503:486–503. doi: 10.1002/jnr.23689
- Zhang J, Zheng YG (2016) SAM/SAH Analogs as Versatile Tools for SAM-Dependent Methyltransferases. *ACS Chem Biol* 11:583–597. doi: 10.1021/acscchembio.5b00812
- Zhang Y, Wang L, Zhou X, et al (2019) The immunomodulatory mechanism of brain injury induced by hyperhomocysteinemia in spontaneously hypertensive rats. *J Cell Biochem* 120:9421–9429. doi: 10.1002/jcb.28217
- Zoccolella S, dell’Aquila C, Abruzzese G, et al (2009) Hyperhomocysteinemia in levodopa-treated patients with Parkinson’s disease Dementia. *Mov Disord* 24:1028–1033. doi: 10.1002/mds.22511
- Zoccolella S, Martino D, Defazio G, et al (2006) Hyperhomocysteinemia in movement disorders: Current evidence and hypotheses. *Curr Vasc Pharmacol* 4:237–243. doi: 10.2174/157016106777698414

Zoccolella S, Simone IL, Lamberti P (2008) Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70:222–225. doi: 10.1212/01.wnl.0000297193.53986.6f

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Rota da Metionina-Homocisteína. MT – metionina transferase, R-qualquer radical a ser metilado, CH₃ – grupamento metila, ATP – adenosina trifosfato, ADP – adenosina difosfato, AMP – adenosina monofosfato, NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado, B₁₂ – vitamina B₁₂, B₆ – vitamina B₆, B₂ – vitamina B₂, PPi – pirofosfato inorgânico, Pi – fosfato inorgânico, CoA – Coenzima A. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2 – Fosforilação oxidativa e produção de ATP..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3 – Transporte de Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática com consumo de ATP pela Na⁺, K⁺-ATPase. **Erro! Indicador não definido.**

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS (CEUA/UFRGS)



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33301

Título: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS EM MODELO ANIMAL DE HIPERHOMOCISTEINEMIA LEVE CRÔNICA QUÍMICAMENTE INDUZIDA.

Vigência: 01/08/2017 à 31/07/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANGELA TEREZINHA DE SOUZA WYSE - coordenador desde 01/09/2017
TIAGO MARCON DOS SANTOS - Aluno de Doutorado desde 01/08/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 19/06/2017 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO - UFRGS-PAULO DA GAMA, 110 BAIRRO FARROUPILHA - em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 348 ratos machos e/ou fêmeas de 30 dias de vida obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 29 de Junho de 2017

MARCIEL MELLER ALIEV
Coordenador da comissão de ética