

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

EFEITO DA HOMOCISTEÍNA SOBRE AS ATIVIDADES DA
BUTIRILCOLINESTERASE E DA Na⁺,K⁺-ATPase
EM SANGUE DE RATOS

FRANCIELI MORO STEFANELLO

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

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

Porto Alegre, 2003

***À minha família, por estar ao meu lado
em mais uma etapa da minha vida.***

Amo vocês.

***“Há caminhos pré-existentes aos caminheiros,
porque antes desses houve os que aliassem
a coragem à tenacidade
para desbravar e empreender,
abrindo espaços,
semeando a esperança...”***

Elair Witczak (Dinha)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Angela, pela amizade, carinho, dedicação, incentivo e sabedoria com que orientou este trabalho.

A Prof^a. Maria Rosa, pelos primeiros ensinamentos e por despertar em mim a paixão pela pesquisa científica.

Ao Prof. Clovis, pela ajuda, disponibilidade e também pelo ótimo senso de humor.

Aos professores Dutra e Moacir, pelos ensinamentos e convívio.

Aos amigos e colegas do laboratório “34A”, Bárbara, Rê, Cuca, Xuxa, Dani, Dé, Si, Fábria, Cris, Caren e Thiago, pelo companheirismo, amizade, apoio, ajuda, ânimo e também por me receber de braços abertos.

Aos colegas dos laboratórios “34C”, 36 e 38, pela amizade e convívio.

À Anita, grande amiga, pela parceria e pelos incontáveis momentos de descontração.

À Déia, minha irmãzinha do coração, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao João Paulo, pela paciência, compreensão e amor.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela formação acadêmica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela possibilidade de realizar este trabalho de pesquisa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, Flademir e Elsi, e aos meus irmãos, Geancarlo e Vandré, por apoiar e incentivar todos os meus passos e pelo amor incondicional.

A Deus, pela graça de lutar para a conquista deste sonho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A homocistinúria é uma desordem metabólica causada pela deficiência da enzima cistationina β -sintase, resultando no acúmulo tecidual de homocisteína e de metionina. Os pacientes afetados por essa doença apresentam principalmente retardo mental, isquemia cerebral, convulsões e aterosclerose. Entretanto, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por essas manifestações são pouco conhecidos.

O sistema colinérgico apresenta papel importante na função cognitiva do qual as colinesterases, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, são constituintes ubíquos. Similarmente à acetilcolinesterase, a butirilcolinesterase hidrolisa a acetilcolina e está presente no soro, coração, endotélio vascular e no sistema nervoso. Estudos têm mostrado que as colinesterases estão inibidas no córtex cerebral de pacientes com a doença de Alzheimer. Adicionalmente, há evidências na literatura mostrando que as colinesterases são inibidas por radicais livres.

A Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima fundamental responsável pela manutenção do gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal e consome de 40 a 60% do ATP formado no cérebro. Recentes estudos têm demonstrado que essa enzima é inibida por radicais livres e também que sua atividade está diminuída na isquemia cerebral, epilepsia e em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Além disso, nosso grupo demonstrou que a homocisteína inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase cerebral.

Considerando que: a) pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis pelas manifestações neurológicas que ocorrem na homocistinúria, b) a administração de homocisteína prejudica a memória, c) as colinesterases são importantes para as funções cognitivas, d) a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está diminuída na isquemia cerebral, e) a homocisteína inibe a atividade dessa enzima *in vitro* e f) as atividades da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase em tecidos periféricos podem ser consideradas marcadores de alterações que ocorram no sistema nervoso central, no presente estudo determinamos o efeito *in vitro* da homocisteína sobre as atividades

da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase em soro e plaquetas de ratos, respectivamente. Também determinamos o efeito da administração aguda e crônica de homocisteína sobre a atividade da butirilcolinesterase sérica e a influência das vitaminas E e C sobre os efeitos inibitórios causados pela homocisteína.

Os resultados mostraram que a homocisteína diminuiu significativamente a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 60 dias *in vitro*. A homocisteína inibiu essa enzima de forma competitiva com a acetilcolina como substrato. Também foi verificado que a homocisteína reduziu significativamente as atividades da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase em soro e plaquetas de ratos de 29 dias, respectivamente.

Nossos resultados também mostraram que a administração aguda de homocisteína diminuiu significativamente a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 29 dias. Adicionalmente, verificou-se que o pré-tratamento com as vitaminas E e C não alterou *per se* a atividade da butirilcolinesterase, mas preveniu a redução da atividade dessa enzima causada pela administração aguda de homocisteína. Por fim, determinou-se que a administração crônica desse aminoácido diminuiu significativamente a atividade da butirilcolinesterase.

Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que a redução das atividades da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase pode estar associada à disfunção neurológica presente em pacientes homocistinúricos, uma vez que a determinação dessas enzimas em sistemas periféricos represente um marcador para a ação neurotóxica da homocisteína.

ABSTRACT

Homocystinuria is a metabolic disorder caused by deficiency of cystathionine β -synthase leading to tissue accumulation of homocysteine and methionine. Affected patients present especially mental retardation, ischemia, seizures and atherosclerosis, whose pathophysiology is not yet fully established.

Cholinergic system plays a crucial role in cognitive function, in which cholinesterases, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, are ubiquitous constituents. Similarly to AChE, BuChE also hydrolyzes acetylcholine and is present in serum, heart, vascular endothelia and nervous system. It has been shown that inhibition of cholinesterases activities is found in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. Additionally, there is some evidence showing that both cholinesterases are inhibited by free radical formation.

Na^+, K^+ -ATPase is a fundamental enzyme responsible for maintaining the ionic gradient necessary for neuronal excitability, which consumes 40-60% of the ATP generated in the brain. Recent studies have shown that Na^+, K^+ -ATPase is inhibited by free radicals and that its activity is decreased in cerebral ischemia, in epilepsy and in various neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease. Besides, we have showed that homocysteine inhibits cerebral Na^+, K^+ -ATPase.

Therefore, considering that a) very little is known about the underlying mechanisms of the neurological symptoms in homocystinuria, b) homocysteine administration impairs memory, c) cholinesterases play a important role in cognitive function, d) Na^+, K^+ -ATPase activity is decreased in cerebral ischemia, e) homocysteine inhibits this enzyme *in vitro* and f) butyrylcholinesterase and Na^+, K^+ -ATPase activities in peripheral systems may be considered markers of alterations in the central nervous system, in the present study we determined the *in vitro* effect of homocysteine on serum butyrylcholinesterase and platelet Na^+, K^+ -ATPase activities of rats. We also investigated the effect of acute and chronic homocysteine administration on serum butyrylcholinesterase and we tested the influence of antioxidants (vitamins E and C) on the effects elicited by homocysteine.

The results showed that butyrylcholinesterase activity in serum of 60-day-old-rats was significantly inhibited by homocysteine *in vitro*. The inhibition was of the competitive type with acetylcholine as substrate. Furthermore, we verified that homocysteine significantly decreased serum butyrylcholinesterase and platelet Na^+, K^+ -ATPase activities in 29-day-old rats.

Our results also showed that acute administration of homocysteine significantly reduced butyrylcholinesterase activity in serum of 29-day-old-rats. Besides, we verified that the pretreatment with vitamins E and C did not alter butyrylcholinesterase activity, but prevented the reduction of this enzyme caused by acute administration of homocysteine. Finally, we demonstrated that chronic administration of homocysteine decreased butyrylcholinesterase activity.

The results obtained in our study suggest that reduction of butyrylcholinesterase and Na^+, K^+ -ATPase activities may be associated with the neurological dysfunction present in homocystinuric patients, since the determination of these enzymes in peripheral systems could be considered a marker for a central action of homocysteine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	15
1.2 Homocisteína	17
1.3 Homocistinúria	21
1.3.1 Conceito e frequência.....	21
1.3.2 Aspectos bioquímicos.....	22
1.3.3 Aspectos clínicos.....	22
1.3.4 Aspectos fisiopatológicos.....	23
1.3.5 Diagnóstico.....	26
1.3.6 Tratamento.....	27
1.4 Butirilcolinesterase	28
1.4.1 Histórico.....	28
1.4.2 Conceito, distribuição e estrutura.....	28
1.4.3 Funções.....	30
1.4.4 Butirilcolinesterase e disfunção cerebral.....	31
1.5 Na⁺,K⁺-ATPase	32
1.5.1 Histórico.....	32
1.5.2 Conceito, função e estrutura.....	33
1.5.3 Mecanismo de reação.....	36
1.5.4 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase e disfunção cerebral.....	37
2. OBJETIVOS	40

3. ARTIGOS.....	41
4. DISCUSSÃO.....	44
5. CONCLUSÕES.....	52
6. PERSPECTIVAS.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo da homocisteína.....	18
Figura 2. Deficiência da enzima cistationina β -sintase (CBS).....	21
Figura 3. Estrutura da Na^+, K^+ -ATPase.....	34
Figura 4. Mecanismo de reação da Na^+, K^+ -ATPase.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo afetada.....	16
-----------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AdoHcy – S-adenosil homocisteína

AdoMet – S-adenosil metionina

ATP – adenosina trifosfato

CBS – cistationina β -sintase

EIM – erros inatos do metabolismo

ERO – espécies reativas de oxigênio

GTP – guanosina trifosfato

ITP – inosina trifosfato

LDL – lipoproteína de baixa densidade

NMDA – N-metil-D-aspartato

SNC – sistema nervoso central

UTP – uridina trifosfato

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros inatos do metabolismo

Em 1908, o inglês Archibald Garrod introduziu na literatura médica o termo erros inatos do metabolismo (EIM), iniciando seus estudos em indivíduos afetados com alcaptonúria, albinismo, pentosúria e cistinúria. Garrod sugeriu um modelo de herança autossômica recessiva para essas doenças, pois elas geralmente ocorriam em irmãos e filhos de pais consangüíneos (Scriver et al., 2001).

Segundo Bickel (1987), os EIM são alterações genéticas que se manifestam pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, ou por uma diminuição ou mesmo ausência de sua síntese. Essas alterações resultam em deficiência na atividade da enzima envolvida, ocasionando bloqueio de rotas metabólicas, como conseqüência, pode ocorrer tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais, ambos com doença subsequente.

Até o momento, já foram descritos mais de 500 EIM (Scriver et al., 2001), a maioria envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas orgânicas (Benson e Fensom, 1985).

Os EIM são divididos de acordo com a área do metabolismo afetada (Tabela 1) (Scriver et al., 2001).

Tabela 1. Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo afetada.

EIM de aminoácidos
EIM de ácidos orgânicos
EIM de glicídios
EIM de lipídios
EIM de glicosaminoglicanos
EIM de glicoproteínas
EIM de purinas e pirimidinas
EIM de enzimas eritrocitárias
EIM de metais
EIM de lipoproteínas
EIM de hormônios
EIM de proteínas plasmáticas

Embora individualmente raros, os EIM são relativamente freqüentes em seu conjunto, estimando-se que possam ocorrer em até 1 em cada 1000 recém-nascidos vivos (Giugliani, 1988).

Os EIM são, de maneira geral, distúrbios graves que se manifestam na infância cujo diagnóstico pode ser dificultado devido ao grande número de alterações, diversidade de defeitos metabólicos e ausência, na maioria dos casos de sinais e sintomas específicos. A grande maioria dos EIM pode beneficiar-se de um tratamento específico, que será melhor quanto mais precoce for o diagnóstico (Giugliani, 1988).

Dentre os EIM, os mais freqüentes são os EIM de aminoácidos, sendo exemplos a fenilcetonúria, a hiperprolinemia e a homocistinúria, os quais apresentam acúmulo tecidual de fenilalanina, prolina e homocisteína, respectivamente.

1.2 Homocisteína

A homocisteína é um aminoácido sulfurado formado durante o metabolismo da metionina, aminoácido proveniente da dieta ou da degradação de proteínas endógenas (Figura 1). A metionina, em uma reação catalisada pela enzima metionina adenosil transferase, é convertida em S-adenosil metionina (AdoMet) que, ao sofrer reações de transmetilação, origina S-adenosil homocisteína (AdoHcy), a qual é hidrolisada em adenosina e homocisteína através da enzima adenosil homocisteína hidrolase. A homocisteína pode então, ser metabolizada pela via da remetilação ou da transsulfuração (Fowler, 1997; Mudd et al., 2001).

No ciclo da remetilação, a homocisteína é remetilada formando metionina, em uma reação catalisada pela enzima metionina sintase. A vitamina B₁₂ (cobalamina) é um cofator essencial para essa enzima, 5-metil-tetrahidrofolato é o doador de grupamentos metila nessa reação, e a enzima 5,10-metileno-tetrahidrofolato redutase atua como um catalisador no processo de remetilação. A betaína também pode doar um grupo metila à homocisteína, através da enzima betaína homocisteína metiltransferase, formando dimetil glicina (Fowler, 1997; Mudd et al., 2001).

Sob condições nas quais há um excesso de metionina ou quando a síntese de cisteína é requerida, a homocisteína entra na via de transsulfuração. Nessa, a homocisteína primeiramente condensa-se com serina para formar cistationina, uma reação catalisada pela enzima cistationina β -sintase (CBS), que utiliza vitamina B₆ (piridoxal fosfato) como cofator. A cistationina é subseqüentemente hidrolisada pela enzima cistationina γ -liase formando cisteína, que pode participar da formação da

glutationa (importante antioxidante não enzimático) ou ser metabolizada a sulfato e excretada na urina (Fowler, 1997; Mudd et al., 2001).

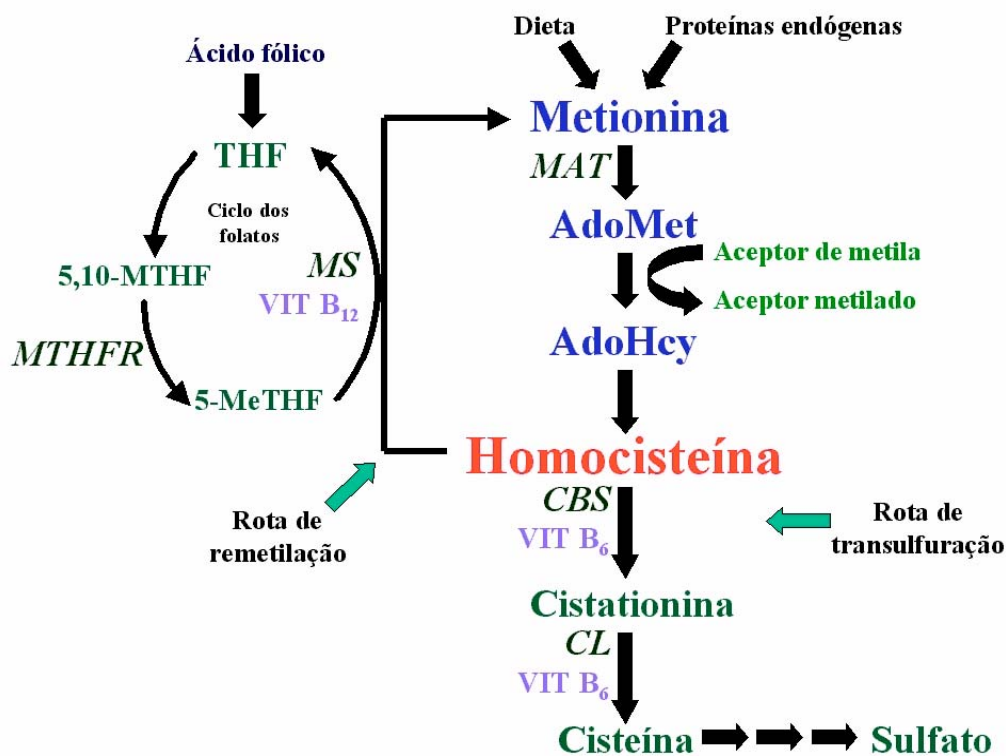


Figura 1. Metabolismo da homocisteína (Adaptado de Mudd et al., 2001).

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

O metabolismo da homocisteína é controlado em três pontos: 1) a competição pela metionina para formar AdoMet ou para síntese de proteínas, 2) a competição da AdoMet para sofrer transmetilação e formar AdoHcy ou sofrer descarboxilação e 3) a disposição da homocisteína para formar metionina, cistationina ou AdoHcy

(Finkelstein, 1998). Além disso, deficiências nutricionais, hormônios e idade podem afetar o metabolismo desse aminoácido (Fowler, 1997).

A concentração plasmática de homocisteína em adultos normais é de 5-15 $\mu\text{mol/L}$ (Mudd et al., 2001), sendo que 70 a 80% desse aminoácido encontra-se ligado a proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, como dissulfetos mistos com resíduos de cisteína das proteínas. Em torno de 5 a 10% encontra-se ligada à cisteína, através de uma ponte dissulfeto e como homocistina (forma oxidada da homocisteína), e de 1 a 2% como homocisteína livre (Welch e Loscalzo, 1998).

A homocisteína tem sido considerada um fator de risco para o aparecimento de algumas doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC), incluindo as doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington e a isquemia cerebral (Kuhn et al., 1998; Mudd et al., 2001; White et al., 2001; Mattson et al., 2002; Seshadri et al., 2002). Neste contexto, estudos realizados em cultura de células e em modelos animais de desordens neurodegenerativas mostram que a deficiência de ácido fólico e os elevados níveis de homocisteína podem aumentar a vulnerabilidade à disfunção e morte neuronal (Kruman et al., 2000; Kruman et al., 2001). Além disso, trabalhos também mostram uma correlação entre os níveis plasmáticos de homocisteína e as alterações vasculares como por exemplo, aterosclerose (Welch e Loscalzo, 1998).

Devido à presença de grupamento sulfidrílica, a homocisteína pode auto-oxidar-se formando homocistina, dissulfetos mistos e homocisteína tiolactona. Além disso, a auto-oxidação da homocisteína pode resultar na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e subsequente o radical hidroxila, as quais parecem estar diretamente

envolvidas na patogênese das alterações vasculares e neurológicas encontradas em pacientes com doenças neurodegenerativas e na homocistinúria (Fridman, 1999; Hogg, 1999).

1.3 Homocistinúria

1.3.1 Conceito e frequência

A homocistinúria é um EIM do metabolismo de aminoácido causado pela deficiência na atividade da enzima CBS, o que resulta em acúmulo tecidual de homocisteína e metionina (Figura 2). A herança é autossômica recessiva, com frequência estimada em 1 caso para 200.000 nascimentos (Mudd et al., 2001). No entanto, outro estudo do mesmo ano mostra que a frequência está em torno de 1 caso para 80.000 nascimentos (Sokolova et al., 2001).

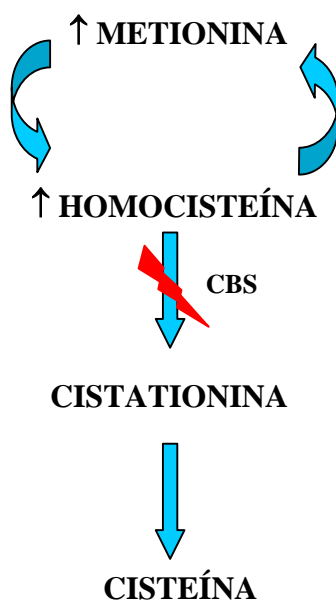


Figura 2. Deficiência da enzima cistationina β -sintase (CBS).

1.3.2 Aspectos bioquímicos

O bloqueio da atividade da CBS tem como conseqüências o acúmulo de homocisteína e metionina, que podem atingir concentrações plasmáticas de até 500 $\mu\text{mol/L}$ e 2.000 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (Mudd et al., 2001). Elevações anormais desses metabólitos ocorrem não apenas no plasma, mas também em outros fluidos, tais como líquido cefalorraquidiano (Tada et al., 1967) e humor aquoso (Curtius et al., 1968)

Os pacientes homocistinúricos também apresentam uma diminuição na produção de cisteína, uma vez que a rota de síntese desse aminoácido está bloqueada o que pode levar conseqüentemente, a uma redução nos níveis de glutatona nesses pacientes (Mudd et al., 1985).

1.3.3 Aspectos clínicos

A homocistinúria é acompanhada de diversas anormalidades clínicas e patológicas que atingem principalmente o sistema nervoso, vascular, ocular e ósseo. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos da homocistinúria ainda são pouco conhecidos (Mudd et al., 2001).

Dentre as alterações que afetam o sistema ocular, a principal é o deslocamento das lentes oculares. Com relação ao sistema ósseo, a osteoporose é a manifestação clínica mais freqüente, sendo observada em mais de 50% dos

pacientes homocistinúricos. A escoliose também pode ocorrer, provavelmente devido à osteoporose precoce (De Franchis et al., 1998; Mudd et al., 2001).

O sistema vascular encontra-se bastante comprometido nos pacientes com homocistinúria, sendo que o tromboembolismo é a maior causa de mortalidade em pacientes portadores dessa doença. Dentre os eventos tromboembólicos mais comuns, pode-se citar a oclusão de veias e artérias periféricas, acidentes vasculares cerebrais e infarto do miocárdio (McCully, 1996; De Franchis et al., 1998; Mudd et al., 2001).

A anormalidade mais freqüente do SNC é o retardo mental, o qual é o primeiro sinal reconhecido na homocistinúria. Alterações como distúrbios psiquiátricos, diminuição da capacidade cognitiva, convulsões e distúrbios extrapiramidais também podem ser observadas em pacientes homocistinúricos (De Franchis et al., 1998; Mudd et al., 2001).

1.3.4 Aspectos fisiopatológicos

A fisiopatologia dos sintomas neurológicos encontrados na homocistinúria permanece incerta, e muitos estudos estão sendo feitos na tentativa de elucidá-la.

Alguns autores têm demonstrado que a homocisteína exerce efeitos tóxicos sobre linhagens celulares de neurônios humanos (Parsons et al., 1998), além de induzir morte celular pela ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) bem como pela produção de radicais livres, em cultura primária de células cerebelares de ratos (Kim e Pae, 1996). Neste contexto, outros pesquisadores demonstraram que a

homocisteína e seus metabólitos, homocisteato e sulfinato de homocisteína, exercem efeitos citotóxicos atuando como agonistas do sítio de ligação do glutamato no receptor NMDA, em culturas de células neuronais de ratos (Lipton et al., 1997; Flott-Rahmel et al., 1998).

Evidências sugerem a participação do óxido nítrico na patogênese da homocistinúria, da isquemia cerebral e de desordens neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer e Huntington (Boutell et al., 1998). Deste modo, estudos têm demonstrado que o óxido nítrico quando produzido em excesso, através da ativação de receptores NMDA pode estar envolvido em inúmeros processos neurotóxicos, provavelmente pela geração de radicais livres como o peroxinitrito (potente agente oxidante) (Zhang e Snyder, 1995; Lipton et al., 1997; Garthwaite et al., 1988).

Tem sido demonstrado também que a administração de homocisteína provoca convulsões em ratos de diferentes idades (Kubová et al., 1995) e reduz concentrações intracerebrais de adenosina, a qual parece ter ação depressora no SNC (McIlwain e Poll, 1985). Todos esses achados parecem contribuir para as disfunções neurológicas características de indivíduos homocistinúricos.

Os mecanismos pelos quais elevadas concentrações de homocisteína causam aterotrombose não estão completamente elucidados. No entanto, evidências experimentais sugerem que os efeitos da homocisteína sobre as plaquetas, endotélio, coagulação e lipoproteínas podem contribuir para a incidência de ateromas em pacientes homocistinúricos (Mudd et al., 2001).

Sabe-se que a homocisteína, durante o processo de auto-oxidação, origina potentes ERO como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila.

Esses podem iniciar a peroxidação lipídica na superfície de células endoteliais e em lipoproteínas plasmáticas, diminuir a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais o que favorece a proliferação de células musculares lisas vasculares (Lubec et al., 1996). Desta forma, o dano oxidativo pode ser o responsável pelo início do processo de disfunção endotelial e da toxicidade vascular provocado pela homocisteína (Harker et al., 1974; Welch et al., 1997; Hogg, 1999).

A homocisteína pode causar disfunção do endotélio vascular não somente via formação de radicais livres, mas também por aumentar a adesão plaquetária (Meleady e Graham, 1995), além de alterar a expressão da enzima antioxidante glutathione peroxidase em células endoteliais (Upchurch et al., 1997). A alteração do fenótipo anti-trombótico endotelial ocorre através da ativação de fatores de coagulação como o fator V (Rodgers e Kane, 1986) e XII (Ratnoff, 1968), do prejuízo na ativação da proteína C (Rodgers e Conn, 1990), da inibição da expressão de trombosmodulina (Lentz e Sadler, 1991) e do fator tecidual (Fryer et al., 1993) o que favorece a formação de trombos e conseqüentemente a aterogênese (Welch e Loscalzo, 1998).

Estudos também mostram que a homocisteína provoca diminuição do metabolismo oxidativo de células musculares lisas, levando à fibrose das mesmas (McCully, 1993). A homocisteína tiolactona, um composto proveniente da auto-oxidação da homocisteína, pode combinar-se com colesterol LDL formando agregados que são fagocitados por macrófagos originando células espumosas desenvolvendo assim, placas ateromatosas (Naruszewicz et al., 1994).

As alterações ósseas, como osteoporose e escoliose, ocorrem provavelmente pela ação da homocisteína no metabolismo do colágeno (Lubec et al., 1996). Quanto à fisiopatologia das lesões oculares, acredita-se que um dos mecanismos envolvidos é a oxidação de resíduos de cisteína presentes na fibrilina (glicoproteína localizada na zona ocular) modificando a sua estrutura e causando conseqüentemente o rompimento de fibras oculares e o deslocamento da lente ocular (Mudd et al., 2001).

1.3.5 Diagnóstico

A presença de um ou mais sinais clínicos característicos permite auxiliar no diagnóstico da homocistinúria, sendo que o retardo mental é, geralmente, o primeiro achado clínico encontrado nos pacientes homocistinúricos (Mudd et al., 2001). Miopia e deslocamento da lente ocular (Cruysberg et al., 1996), além de alterações vasculares e anormalidades esqueléticas são sinais e sintomas importantes para o diagnóstico desses pacientes (Mudd et al., 2001). Entretanto, o diagnóstico definitivo é baseado na presença de alterações bioquímicas características (Mudd et al., 2001).

O achado laboratorial mais consistente é a presença de elevadas concentrações de homocisteína na urina (Isherwood, 1996). No entanto, a dosagem de homocisteína plasmática é de fundamental importância para o diagnóstico, uma vez que há grande probabilidade de obter-se resultados falsos negativos nos exames de detecção desse aminoácido na urina. Também pode ocorrer uma diminuição de

cisteína e um aumento de metionina no plasma dos pacientes homocistinúricos (Mudd et al., 2001).

O ensaio enzimático direto da atividade da CBS confirma o diagnóstico de homocistinúria e pode ser realizado em biópsia de fígado, cultura de fibroblastos e/ou linfócitos (Uhlendorf e Mudd, 1968; Goldstein et al., 1972; Mudd et al., 2001).

1.3.6 Tratamento

O tratamento dos pacientes homocistinúricos tem como objetivos controlar e eliminar as alterações bioquímicas características da doença com a finalidade de prevenir ou amenizar as alterações clínicas e impedir as complicações mais graves. O tratamento será mais eficiente quanto mais precoce for o diagnóstico (Mudd et al., 2001).

A administração de vitamina B₆, vitamina B₁₂, ácido fólico e betaína, além de dietas com restrição de metionina são geralmente efetivos no controle de concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína. Entretanto, os pacientes homocistinúricos podem responder ou não à suplementação com vitamina B₆, o que deve ser confirmado através da administração dessa vitamina e posterior dosagem de homocisteína com o objetivo de melhor alcançar os resultados esperados (Mudd et al., 2001).

1.4 Butirilcolinesterase

1.4.1 Histórico

Na década de 30, quando os primeiros estudos envolvendo hidrólise de ésteres de colina foram realizados, surgiu a idéia da existência da butirilcolinesterase (Stedman et al., 1932). Posteriormente, descobriu-se que havia duas enzimas com atividade colinesterásica sendo que uma dessas era específica para o neurotransmissor acetilcolina, denominada acetilcolinesterase, enquanto a outra catalisava a hidrólise de outros ésteres, denominada butirilcolinesterase (Alles e Hawes, 1940; Mendel e Rudney, 1943).

Por muitos anos, a butirilcolinesterase foi considerada uma enzima não específica e não essencial para a neurotransmissão colinérgica (Darvesh et al., 2003). Entretanto, recentes observações sugerem que a butirilcolinesterase apresenta funções mais específicas do que àquelas previamente descritas, o que tem aumentado o interesse dos pesquisadores na investigação da estrutura, distribuição e função dessa enzima.

1.4.2 Conceito, distribuição e estrutura

As colinesterases, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, são constituintes ubíquos do sistema colinérgico o qual apresenta importante papel nas funções cognitivas (Everitt e Robbins, 1997). Essas enzimas diferenciam-se quanto à

distribuição tecidual, propriedade cinética, especificidade por substratos sintéticos e naturais e por inibidores seletivos (Augustinsson, 1948; Wilson, 1951; Massoulié et al., 1993; Cokugras e Teczan, 1997).

A butirilcolinesterase, também conhecida por colinesterase não específica ou pseudocolinesterase, é uma enzima que está presente no soro, células hematopoiéticas, fígado, coração, endotélio vascular, sinapses colinérgicas e no SNC (Silver, 1974).

Quanto à estrutura, a butirilcolinesterase é similar a acetilcolinesterase apresentando uma folha β central rodeada por α -hélices (Millard e Broomfield, 1992). O sítio ativo da enzima contém uma tríade catalítica com os aminoácidos histidina, ácido glutâmico e serina, sendo este último essencial para a atividade catalítica. Há também um sítio aniônico formado pelo aminoácido triptofano e um sítio de acilação no qual o grupo acil dos ésteres de colina encaixa-se durante a catálise (Lockridge et al., 1987; Vellom et al., 1993). Apesar da hidrólise do substrato ocorrer na tríade catalítica em ambas as colinesterases, algumas diferenças no curso catalítico, como por exemplo o maior volume do sítio ativo da butirilcolinesterase, podem ser importantes na determinação da preferência pelo substrato e da afinidade pelo inibidor (Harel et al., 1993; Ekholm, 2001).

Assim como a acetilcolinesterase, a butirilcolinesterase apresenta diferentes formas moleculares que incluem monômeros e oligômeros com subunidades catalíticas idênticas (Massoulié et al., 1993; Soreq e Seidman, 2001). As formas globulares monoméricas (G_1) e diméricas (G_2) são simétricas, hidrofílicas e solúveis, enquanto as tetraméricas (G_4) podem também ser assimétricas e estar ancoradas à

membrana por proteínas ricas em prolina (Massoulié, 2002). Existem também formas assimétricas da butirilcolinesterase (A_4 , A_8 e A_{12}) constituídas de subunidades catalíticas tetraméricas ligadas à membrana por um filamento colagenoso (Massoulié et al., 1993).

1.4.3 Funções

A butirilcolinesterase catalisa a hidrólise de ésteres de colina incluindo butirilcolina, succinilcolina e acetilcolina além de hidrolisar outros ésteres como a cocaína, ácido acetilsalicílico e heroína (Lockridge, 1988; Massoulié et al., 1993).

Evidências sugerem que a butirilcolinesterase pode atuar como um co-regulador da atividade da acetilcolina no SNC, uma vez que a inibição dessa enzima aumenta de maneira dose dependente os níveis desse neurotransmissor no cérebro (Giacobini, 2000). Na ausência da acetilcolinesterase, a butirilcolinesterase parece substituí-la na manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico (Mesulam et al., 2002).

Sabe-se também que a butirilcolinesterase participa da regulação da proliferação e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento do SNC (Dubovy e Haninec, 1990; Layer, 1991).

1.4.4 Butirilcolinesterase e disfunção cerebral

A butirilcolinesterase, juntamente com a acetilcolinesterase, tem um papel importante na progressiva agregação do peptídeo β -amilóide e na maturação de placas neuríticas características da doença de Alzheimer (Gómez e Morán, 1997). Dados da literatura também mostram que as atividades das colinesterases estão inibidas no córtex cerebral de pacientes portadores dessa doença (Atack et al., 1983; Bowen and Dawson, 1986; Fishman et al., 1986; Giacobini et al., 2002). Além disso, as atividades das colinesterases parecem estar associadas às alterações cognitivas encontradas nesses pacientes (Cummings, 2000; Law et al., 2001).

Considerando que a butirilcolinesterase hidrolisa a acetilcolina no SNC, convém ressaltar a importância dos estudos envolvendo a butirilcolinesterase sérica, uma vez que essa enzima tem sido considerada um marcador periférico do sistema colinérgico central (Fossi et al., 2002).

1.5 Na⁺,K⁺-ATPase

1.5.1 Histórico

Em 1941, Robert Dean, com base em experimentos que demonstravam a troca de íons sódio e potássio em tecido muscular, introduziu a idéia da existência de uma bomba capaz de transportar esses íons através da membrana celular (citado por Skou e Esmann, 1992). Posteriormente, em 1953, Schatzman observou que esse transporte era inibido por glicosídeos cardiotônicos e no ano de 1956, através de observações de Glynn, foi sugerida a ligação entre o efluxo ativo de sódio e o influxo ativo de potássio (citado por Skou e Esmann, 1992).

Hoffman (1962) demonstrou experimentalmente que o único substrato energético para o transporte ativo dos íons era o ATP, não podendo ser substituído por outros ésteres trifosfato (ITP, UTP ou GTP) como havia sido proposto por Maizels, em 1954 (citado por Skou e Esmann, 1992).

Após muitos estudos, Skou, em 1957, propôs que a bomba capaz de transportar ativamente os íons sódio e potássio era uma proteína ligada à membrana plasmática com propriedades catalíticas, ou seja, uma ATPase (Skou e Esmann, 1992). Ressalta-se que o cientista Jean Skou, em 1997, recebeu o Prêmio Nobel de Química por essa descoberta.

Considerando a importância da Na⁺,K⁺-ATPase para a maioria das células animais, muitos estudos foram e ainda são realizados com o objetivo de melhor entender a sua estrutura, função e mecanismo de reação.

1.5.2 Conceito, função e estrutura

A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína integral de membrana, encontrada na maioria das células de eucariotos, que transloca íons sódio e potássio contra seus gradientes de concentração através da membrana plasmática, utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP como força motriz.

O fluxo de íons ou seja, o transporte de três íons sódio para o meio extracelular e de dois íons potássio para o meio interno produz um gradiente eletroquímico através da membrana celular (Lingrel e Kuntzweiler, 1994). Esse gradiente é utilizado como fonte energética para a manutenção do potencial de repouso e da excitabilidade das células, regulação do volume celular, pH intracelular e para o transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de sódio, como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (Geering, 1990). Além disso, a Na^+, K^+ -ATPase consome o ATP produzido pelas células, sendo esse consumo de 40 a 60% nas células neuronais (Erecinska e Silver, 1994).

A Na^+, K^+ -ATPase pertence à classe de ATPases do tipo P da qual fazem parte ATPases de membrana plasmática e retículo sarcoplasmático, como a Ca^{2+} -ATPases e a H^+ -ATPase. Essa classe de enzimas caracteriza-se por apresentar um intermediário protéico fosforilado no seu ciclo catalítico, contudo a inibição por glicosídeos cardiotônicos, como ouabaína e digoxina, é exclusiva para a Na^+, K^+ -ATPase (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Blanco e Mercer, 1998; Kaplan, 2002).

Quanto à estrutura, a Na^+, K^+ -ATPase é composta por três subunidades, α , β e γ , incorporadas à bicamada lipídica na membrana plasmática (Glynn, 1993; Blanco e Mercer, 1998; Blanco et al., 2000; Kaplan, 2002) (Figura 3).

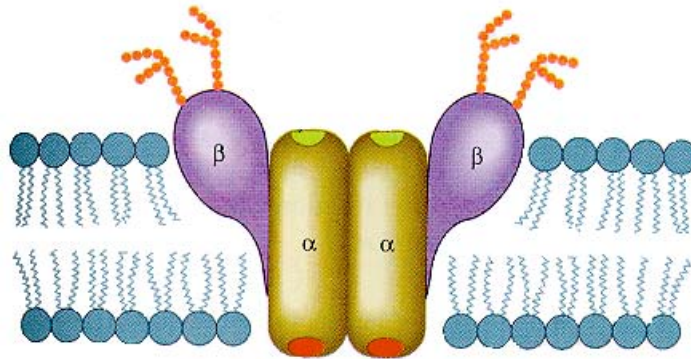


Figura 3. Estrutura da Na^+, K^+ -ATPase (Adaptado de Voet et al., 2000).

A subunidade α é composta por aproximadamente 1020 aminoácidos e tem uma massa molecular de aproximadamente 113 kDa. Nessa localizam-se os sítios de ligação para os íons sódio e potássio, ATP e glicosídeos cardiotônicos, sendo portanto responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima (Gerring, 1990; Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Blanco e Mercer, 1998; Kaplan, 2002). Foram descritas quatro isoformas da subunidade α , chamadas de α_1 , α_2 , α_3 e α_4 , distribuídas em diferentes proporções nas células de diferentes tecidos. A isoforma α_1 ocorre na maioria dos tecidos, a α_2 é encontrada predominantemente em músculo esquelético, cérebro, coração e tecido adiposo, a α_3 ocorre somente no cérebro e no coração, enquanto a α_4 parece ocorrer especificamente em testículo e

epidídimo (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Blanco e Mercer, 1998; Blanco et al., 2000; Kaplan, 2002).

A subunidade β é formada por aproximadamente 300 aminoácidos, tem massa molecular de aproximadamente 55 kDa e três isoformas já foram identificadas em tecido humano. A isoforma $\beta 1$ ocorre em praticamente todos os tecidos, a $\beta 2$ ocorre predominantemente em tecido nervoso e muscular esquelético, enquanto a $\beta 3$ ocorre em testículo, retina, fígado e pulmão (Skou e Esmann, 1992; Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Kaplan, 2002). Apesar de não possuir atividade catalítica, não é possível separá-la da subunidade α sem perder a atividade enzimática (Skou e Esmann, 1992). Acredita-se que a subunidade β seja importante como agente estrutural da Na^+, K^+ -ATPase, na maturação e inserção da subunidade α na membrana e em processos de interação célula-célula (Gerring, 1990; Skou e Esmann, 1992).

. A subunidade γ tem peso molecular de aproximadamente 12 kDa, sendo encontrada somente nos rins. Sua função não está completamente elucidada, mas há evidências sugerindo que essa subunidade modula a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, além de pertencer a uma família de pequenas proteínas de membrana envolvidas na passagem de íons pela membrana (Therien et al., 1997; Blanco e Mercer, 1998; Kaplan, 2002).

1.5.3 Mecanismo de reação

Em condições fisiológicas, a Na^+, K^+ -ATPase transfere três íons sódio para o meio extracelular e dois íons potássio para o meio intracelular contra seus gradientes de concentração, hidrolisando uma molécula de ATP. Entretanto, essa enzima apresenta um mecanismo de reação complexo, dividido em quatro etapas fundamentais que envolvem dois estados conformacionais: um desfosforilado, com alta afinidade por sódio (E1), e outro fosforilado, com alta afinidade por potássio (E2) (Glynn, 1993). O mecanismo pode ser esquematizado conforme demonstra a figura 4.

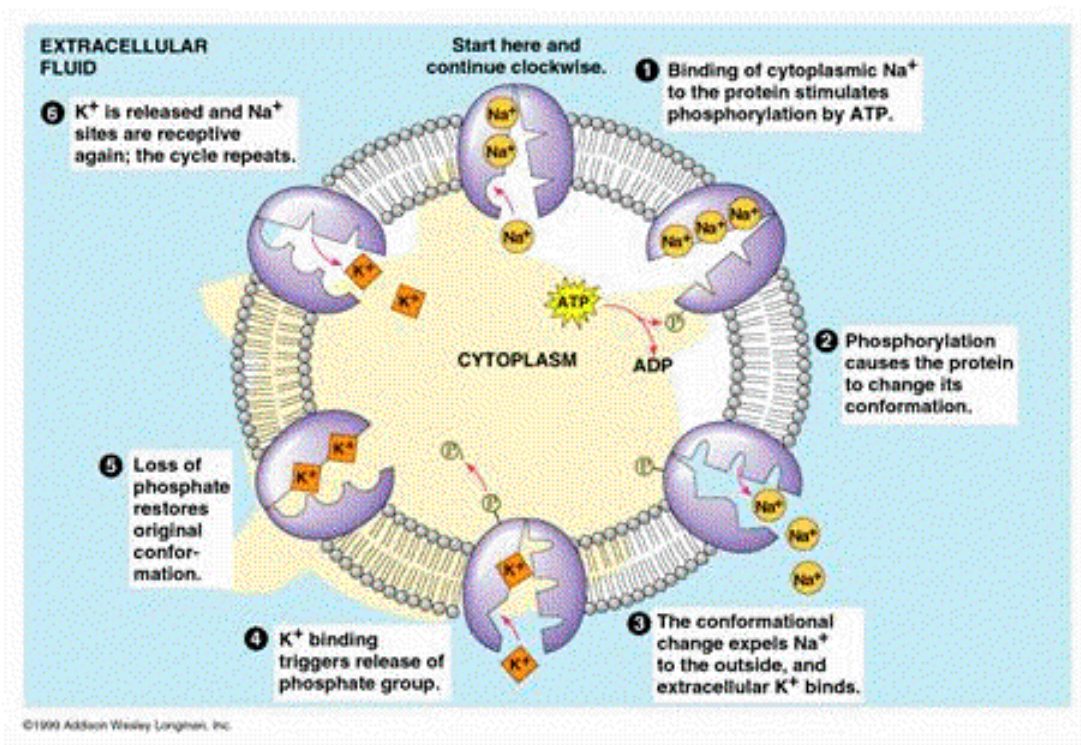


Figura 4. Mecanismo de reação da Na^+, K^+ -ATPase.

Inicialmente, ocorre a ligação de três íons sódio e do ATP à face interna da Na^+, K^+ -ATPase com a transferência de um grupo fosfato do ATP e o aprisionamento dos íons sódio à enzima. Posteriormente, com a mudança conformacional provocada pela fosforilação, os sítios de ligação dos íons sódio são expostos ocorrendo a liberação desses ao meio extracelular. A seguir, dois íons potássio ligam-se em sítios de alta afinidade da Na^+, K^+ -ATPase, e o fosfato inorgânico é liberado. A desfosforilação da enzima causa outra mudança conformacional reduzindo a afinidade pelo potássio e conseqüentemente liberando dois íons ao meio intracelular (Glynn, 1993; Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Blanco e Mercer, 1998; Kaplan, 2002). A ouabaína, inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase, liga-se à enzima fosforilada, impedindo sua desfosforilação (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Kaplan, 2002).

1.5.4 Na^+, K^+ -ATPase e disfunção cerebral

A Na^+, K^+ -ATPase está presente em altas concentrações na membrana celular cerebral, consumindo de 40 a 60% da energia produzida nesse tecido. Essa enzima tem um papel fundamental no transporte ativo de íons sódio e potássio no SNC, mantendo o gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal, além de ser responsável pela regulação do volume celular e do pH intracelular (Horisberger et al., 1991; Erecinska e Silver, 1994; Blanco e Mercer, 1998).

Desta forma, considerando que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase é essencial para as funções celulares e sinápticas, uma redução na sua atividade devido à depleção de ATP ou à ação de inibidores, pode diminuir o funcionamento normal do

cérebro (Lees, 1991). Neste contexto, estudos mostram que a administração intracerebral de ouabaína, inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase, provoca morte neuronal em ratos (Lees et al., 1990).

Estudos demonstram que a Na^+, K^+ -ATPase é inibida por radicais livres (Lees, 1993) e também que a inibição dessa enzima está associada à liberação de neurotransmissores (Jacobson et al., 1986). Além disso, tem sido mostrado que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está diminuída na epilepsia (Grisar, 1984), em crises convulsivas (Renkawek et al., 1992), na doença de Alzheimer (Liguri et al., 1990; Hattori et al., 1998) e em modelos animais experimentais de isquemia cerebral (Matejovicoca et al., 1996; Wyse et al., 2000).

Trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que metabólitos acumulados em alguns EIM também inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. A fenilalanina, metabólito acumulado na fenilcetonúria, inibe a atividade dessa enzima em córtex cerebral de ratos *in vivo* e *in vitro* (Wyse et al., 1995a; Wyse et al., 1995b). Silva e colaboradores (1999) verificaram que alguns compostos guanidínicos acumulados na hiperargininemia também inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Adicionalmente, estudos realizados recentemente mostram que a homocisteína, metabólito acumulado na homocistinúria, diminui a atividade dessa enzima em hipocampo de ratos *in vivo* e *in vitro* (Streck et al., 2002a; Streck et al., 2002b). Por outro lado, também demonstramos que a administração de vitaminas E e C previne a inibição da Na^+, K^+ -ATPase causada pela homocisteína (Streck et al., 2001; Wyse et al., 2002)

Devido à complexidade do tecido cerebral e a inacessibilidade para dosagens bioquímicas diretas, diversos parâmetros de neurotransmissão têm sido identificados em componentes sanguíneos, nos quais características farmacológicas e bioquímicas parecem similares às daquelas do SNC. Desta forma, muitos estudos têm sido realizados com a Na^+, K^+ -ATPase de tecidos periféricos como eritrócitos e plaquetas, na tentativa de identificar marcadores periféricos que possam refletir alterações neurológicas de modo não invasivo.

Neste contexto, a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em plaquetas de pacientes com distúrbio bipolar têm sido considerada uma evidência de que uma disfunção primária ou secundária dessa enzima pode predispor ou ter papel direto na etiologia dessa doença (El-Mallakh e Wyatt, 1995). Adicionalmente, uma redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi encontrada no cérebro de ratos urêmicos com disfunção neurológica (Fraser et al., 1985), bem como em eritrócitos de pacientes com uremia (Vásárhelyi et al., 1996). Além disso, em nosso laboratório, foi demonstrado que a Na^+, K^+ -ATPase em plaquetas e eritrócitos de humanos parece ser um marcador periférico para os efeitos neurotóxicos da fenilalanina na fenilcetonúria (Bedin et al., 2000; Bedin et al., 2001).

2. OBJETIVOS

Considerando que: a) pacientes com homocistinúria apresentam alterações neurológicas e também são mais suscetíveis à isquemia, b) a administração de homocisteína prejudica a memória, c) as colinesterases são importantes para as funções cognitivas, d) a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está diminuída na isquemia cerebral, e) a homocisteína inibe a atividade dessa enzima *in vitro* f) as atividades da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase em tecidos periféricos podem ser consideradas marcadores de alterações que ocorram no SNC, este trabalho teve como objetivos:

1. Verificar o efeito da administração aguda e crônica de homocisteína sobre a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos;
2. Avaliar o efeito da administração de antioxidantes (ácido ascórbico e/ou tocoferol) sobre a inibição da butirilcolinesterase em soro de ratos submetidos à administração aguda de homocisteína;
3. Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de homocisteína sobre a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos;
4. Estudar a cinética de inibição da atividade da butirilcolinesterase causada pela homocisteína *in vitro*;
5. Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de homocisteína sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em plaquetas de ratos.

3. ARTIGOS

Homocysteine inhibits butyrylcholinesterase activity in rat serum.

Francieli M. Stefanello, Alexandra I. Zugno, Clovis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse.

Metabolic Brain Disease, 18: 187-194 (2003).

Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocysteinemia.

Francieli M. Stefanello, Renata Franzon, Bárbara Tagliari, Clovis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse.

Clinical Biochemistry (submetido).

***In vitro* homocysteine inhibits platelet Na⁺,K⁺-ATPase and serum butyrylcholinesterase activities of young rats.**

Francieli M. Stefanello, Renata Franzon, Clovis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse.

Metabolic Brain Disease, 18: 273-280 (2003).

4. DISCUSSÃO

A homocistinúria é um EIM causado pela deficiência severa na atividade da enzima CBS e caracteriza-se bioquimicamente pelo acúmulo tecidual de homocisteína e metionina. Os pacientes afetados por essa doença apresentam alterações neurológicas como retardo mental, convulsões, distúrbios psíquicos e alterações vasculares como aterosclerose e isquemia cerebral (De Franchis et al., 1998; Kraus, 1998; Mudd et al., 2001).

Embora não esteja bem definida a exata etiopatogenia da disfunção neurológica encontrada na homocistinúria, acredita-se que os altos níveis teciduais de homocisteína possam, pelo menos em parte, contribuir para o dano cerebral presente nos pacientes homocistinúricos (Allen et al., 1986; Mudd et al., 2001). Neste contexto, Parsons e colaboradores (1998) mostraram que a homocisteína tem ação excitotóxica sobre linhagens celulares de neurônios humanos. Por outro lado, tem sido demonstrado que a homocisteína provoca morte neuronal em cultura de células de ratos pela ativação de receptores NMDA e pela produção de radicais livres (Kim e Pae, 1996) e também que a administração desse aminoácido causa convulsões em ratos e reduz concentrações intracerebrais de adenosina (Kubová et al., 1995; McIlwain e Poll, 1985). Além disso, prévios trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que a homocisteína diminui o metabolismo energético (Streck et al., 2003a) e induz o estresse oxidativo em cérebro de ratos (Streck et al., 2003b). Também foi demonstrado que esse aminoácido causa prejuízo na memória/aprendizagem em ratos (Reis et al., 2002; Streck et al., 2003c).

As colinesterases, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, são constituintes ubíquos do sistema colinérgico o qual desempenha importante papel para as funções cognitivas (Everitt e Robbins, 1997). Neste contexto, recentes estudos têm demonstrado que um prejuízo à neurotransmissão colinérgica contribui para o déficit cognitivo e para as alterações comportamentais encontrados em pacientes com a doença de Alzheimer (Cummings, 2000; Law et al., 2001). Em adição, estudos mostram que as colinesterases podem participar de processos patológicos como a formação e deposição β -amilóide que ocorrem nessa doença (Benzi e Moretti, 1998; Giacobini, 2001).

Dados da literatura mostram que a inibição das colinesterases leva ao acúmulo de acetilcolina, hiperatividade colinérgica e convulsões (Olney et al., 1986; Giacobini et al., 2002). Adicionalmente, alguns autores mostram que a atividade dessas enzimas encontra-se diminuída no córtex cerebral de pacientes com a doença de Alzheimer (Atack et al., 1983; Bowen e Dawson, 1986; Fishman et al., 1986; Giacobini et al., 2002). Por outro lado, evidências têm demonstrado que níveis elevados de homocisteína causam déficit na memória em ratos (Reis et al., 2002).

A Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima importante para o funcionamento cerebral normal sendo responsável pelo transporte ativo de íons sódio e potássio no SNC necessário para a manutenção da excitabilidade neuronal (Erecinska e Silver, 1994). Estudos realizados mostram que a inibição dessa enzima está associada com várias desordens neurodegenerativas (Lees, 1993). Por outro lado, nosso grupo mostrou uma redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase em ratos submetidos ao modelo experimental de isquemia cerebral (Wyse et al., 2000). Outros trabalhos mostraram

que a homocisteína inibe a atividade dessa enzima em hipocampo de ratos (Streck et al., 2001). Mais recentemente, Wyse e colaboradores (2002) demonstraram que o pré-tratamento com vitaminas E e C previne a inibição da Na^+, K^+ -ATPase causada pela administração de homocisteína.

Devido à inacessibilidade ao tecido nervoso, muitos trabalhos estão sendo realizados com o objetivo de identificar marcadores periféricos de neurotoxicidade facilitando assim, o estudo de desordens neurológicas e o acompanhamento de pacientes com essas doenças. Neste contexto, as plaquetas humanas têm sido utilizadas como modelos periféricos para o estudo de receptores de neurotransmissores, da captação de glutamato, da proteína precursora amilóide e além disso, o receptor serotoninérgico 5-HT₂ de plaquetas pode ser considerado um marcador relevante para a depressão e infarto (Sthal, 1985; Biegon et al., 1987; Ferrarese et al., 2000; Di Luca et al., 2000; Rasmussen et al., 2003).

Considerando que a isoforma $\alpha 1$ da Na^+, K^+ -ATPase é predominante no cérebro e nas plaquetas (Sweadner, 1992), que a redução da Na^+, K^+ -ATPase em plaquetas de pacientes portadores de distúrbio bipolar e de fenilcetonúria pode servir como um marcador periférico dessas patologias (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Bedin et al., 2000), e por outro lado, que a atividade da butirilcolinesterase sérica também tem sido utilizada como um marcador do sistema colinérgico central (Fossi et al., 1992), no presente trabalho avaliamos o efeito da homocisteína sobre as atividades da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase em soro e em plaquetas de ratos, respectivamente.

Inicialmente, avaliamos o efeito *in vitro* da homocisteína e da metionina, metabólitos acumulados na homocistinúria, sobre a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 60 dias. Os resultados obtidos mostraram que a homocisteína, na concentração de 500 μM , diminui significativamente a atividade da butirilcolinesterase em aproximadamente 37%. Em contraste, a metionina não alterou a atividade dessa enzima em nenhuma das concentrações testadas, indicando assim um efeito inibitório específico da homocisteína.

Posteriormente, realizamos estudos cinéticos da inibição da butirilcolinesterase causada pela homocisteína. A análise dos dados mostrou que a homocisteína inibe a enzima de forma competitiva com a acetilcolina, uma vez que os valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) mudaram significativamente e que a V_{max} (velocidade máxima) não foi alterada, sugerindo um sítio de ligação comum para essas substâncias.

Sabe-se que os modelos animais de EIM, embora incapazes de mimetizar completamente uma doença humana, dão uma idéia do quadro clínico apresentado durante na instalação e desenvolvimento da mesma. Em nosso laboratório desenvolvemos modelos animais experimentais de vários EIM, como a fenilcetonúria (Wyse et al., 1995a), a hiperprolinemia tipo II (Moreira et al., 1989), a homocistinúria (Streck et al., 2002a) e as acidemias metilmalônica (Dutra et al., 1991) e propiônica (Brusque et al., 1999), com o objetivo de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos dessas doenças.

Neste trabalho utilizamos o modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia desenvolvido por Streck e colaboradores (2002a), no qual

atinge-se em ratos, níveis séricos de homocisteína similares àqueles encontrados em pacientes homocistinúricos (de 0,4 a 0,5 mM). No modelo agudo, ratos de 29 dias receberam, por via subcutânea, uma dose única de homocisteína (0,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal) ou igual volume de solução salina 0,9%. Os animais foram sacrificados 1 hora após a injeção. No modelo crônico, os ratos foram tratados do 6° ao 28°, sendo a homocisteína administrada por via subcutânea, duas vezes ao dia em intervalos de 8 horas entre as injeções. Os ratos foram sacrificados 12 horas após a última injeção. As doses de homocisteína variavam de acordo com o peso e a idade dos ratos e foram determinadas conforme os parâmetros farmacocinéticos desse aminoácido (de 0,3 a 0,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal). Os animais controles receberam igual volume de solução salina.

Os modelos químicos experimentais pós-natais, desenvolvidos em nosso laboratório, a partir dos parâmetros farmacocinéticos da fenilalanina, homocisteína, prolina, ácidos metilmalônico e propiônico (Wyse et al., 1995a; Moreira et al., 1989; Dutra et al., 1991; Streck et al., 2002a) demonstraram que ratos tratados com esses aminoácidos ou ácidos orgânicos apresentaram diminuição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Wyse et al., 1995a; Wyse et al., 1998; Pontes et al., 1999; Wyse et al., 2000; Streck et al., 2002a). Também foi mostrado que animais submetidos à administração de homocisteína ou de ácido metilmalônico apresentam déficit no metabolismo energético cerebral (Dutra et al., 1991; Streck et al., 2003a).

Outros estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a administração crônica de homocisteína, prolina, ácido metilmalônico e propiônico

causaram alterações comportamentais em ratos (Moreira et al., 1989; Dutra et al., 1991; Brusque et al., 1999; Streck et al., 2003c).

Utilizando os modelos agudo e crônico de hiperhomocisteinemia acima citados, neste trabalho verificamos a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 29 dias submetidos à administração aguda e crônica de homocisteína. Os resultados obtidos mostraram que a administração aguda de homocisteína reduziu significativamente a atividade da butirilcolinesterase em aproximadamente 28%.

Baseado em outros trabalhos da literatura mostrando que a atividade da acetilcolinesterase, a qual apresenta similaridade estrutural com a butirilcolinesterase, é diminuída pela ação de radicais livres (Tsakiris et al., 2000), que a redução das atividades da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase causada pela arginina é prevenida por antioxidantes (vitaminas E e C) (Wyse et al., 2003), e por outro lado, que a vitamina C melhora a disfunção endotelial em pacientes com homocistinúria (Pullin et al., 2002), neste trabalho avaliamos também a influência das vitaminas E e C na redução da atividade da butirilcolinesterase causada pela administração aguda de homocisteína. Os resultados mostraram que as vitaminas *per se* não alteraram a atividade da enzima, mas preveniram completamente a ação inibitória da homocisteína sobre a enzima, sugerindo a participação do estresse oxidativo nessa inibição.

Posteriormente, avaliamos o efeito da administração crônica de homocisteína sobre a butirilcolinesterase. Nossos resultados mostraram que os animais tratados cronicamente com homocisteína apresentaram diminuição significativa (24%) na atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos. Os mecanismos responsáveis por

essa inibição não foram investigados. Entretanto, a homocisteína poderia indiretamente diminuir a síntese, aumentar a degradação da enzima ou alterar a estrutura da molécula protéica através da ação de radicais livres.

Considerando que no tratamento crônico com homocisteína, os animais foram decapitados aos 29 dias para determinação da butirilcolinesterase, também investigamos o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de homocisteína sobre a atividade dessa enzima em soro de ratos de 29 dias. Nossos resultados mostraram uma redução significativa na atividade da butirilcolinesterase nas concentrações similares às aquelas encontradas na hiperhomocisteinemia leve (100 μM) e severa (500 μM). Ressalta-se que a homocisteína inibiu a enzima de forma dose dependente, com máxima inibição (25%) em 500 μM .

Neste trabalho, também determinamos o efeito da homocisteína sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em plaquetas de ratos de 29 dias. Os resultados obtidos mostraram que a homocisteína diminuiu significativamente, de forma dose dependente, a atividade dessa enzima em todas as concentrações testadas (10, 100 e 500 μM), com inibição máxima de 80% em 500 μM . Esses resultados corroboram com estudos prévios realizados em nosso laboratório mostrando que a homocisteína inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase cerebral (Streck et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais a homocisteína inibe as atividades da Na^+, K^+ -ATPase e da butirilcolinesterase *in vitro* não foram investigados. Entretanto, considerando que a homocisteína induz a formação de radicais livres (Kim e Pae, 1996), o estresse oxidativo em cérebro de ratos (Streck et al., 2003b) e em plaquetas de humanos (Signorello et al., 2002), que a Na^+, K^+ -ATPase e a butirilcolinesterase

são inibidas por radicais livres (Lees, 1993; Tsakiris et al., 2000; Streck et al., 2001) e também, como demonstrado neste trabalho, que o pré-tratamento com as vitaminas E e C previne a inibição da atividade da butirilcolinesterase causada pela administração aguda de homocisteína, é provável que os radicais gerados pela homocisteína sejam os responsáveis pela inibição dessas enzimas não excluindo entretanto, um efeito direto da homocisteína sobre as mesmas.

Nossos resultados em conjunto mostram que a homocisteína inibe as atividades da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase, em soro e plaquetas de ratos. Desta forma, considerando que efeitos similares também ocorrem no SNC, sugere-se que a determinação das atividades dessas enzimas em tecido periférico de pacientes homocistinúricos possa representar um marcador periférico para a ação central da homocisteína e, portanto, que uma redução nas atividades das mesmas possa estar associada aos sintomas neurológicos presentes nesses pacientes.

5. CONCLUSÕES

1- Os animais submetidos à administração aguda de homocisteína apresentaram uma redução significativa na atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 29 dias.

2- O pré-tratamento com as vitaminas E e C previniu a inibição da atividade da butirilcolinesterase causada pela administração aguda de homocisteína.

3- A administração crônica de homocisteína diminuiu significativamente a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 29 dias.

4- A homocisteína *in vitro*, nas concentrações de 100 e 500 μM , reduziu significativamente a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 29 dias.

5- A homocisteína *in vitro*, nas concentrações de 10, 100 e 500 μM , diminuiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em plaquetas de ratos de 29 dias.

6- A homocisteína *in vitro*, na concentração de 500 μM , inibiu de forma competitiva (o K_m variou e a V_{max} permaneceu constante) a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 60 dias.

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram que a inibição das atividades da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase em tecidos periféricos pode estar envolvida na etiopatogenia da homocistinúria, uma vez que essas enzimas representam marcadores úteis e de fácil acesso para estudar os efeitos deletérios da homocisteína sobre o SNC de pacientes homocistinúricos.

6. PERSPECTIVAS

1- Verificar a atividade da butirilcolinesterase em cérebro e coração de ratos submetidos ao modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia.

2- Verificar o efeito *in vivo* e *in vitro* da homocisteína sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro e coração de ratos.

3- Verificar a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em plaquetas e coração de ratos submetidos ao modelo químico experimental de hiperhomocisteinemia.

4- Avaliar o efeito *in vitro* da homocisteína sobre as atividades da butirilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase em sangue de indivíduos normais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, I.C., GRIEVE, A., GRIFFITHS, R. (1986): Differential changes in the content of amino acid neurotransmitters in discrete regions of the rat brain prior to the onset and during the course of homocysteine-induced seizures. **J. Neurochem.** 46: 1582-1592.
- ALLES, G.A., HAWES, R.C. (1940): Cholinesterases in the blood of man. **J. Biol. Chem.** 133: 375-390.
- ATAK, J.R., PERRY, E.K., BONHAM, J.R., PERRY, R.H., TOMLINSON, B.E., BLESSED, C., FAIRBAIRN, A. (1983): Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: Selective loss of the intermediate (10S) form. **Neurosci. Lett.** 40: 199-204.
- AUGUSTINSSON, K.B. (1948): Cholinesterase: a study in comparative enzymology. **Acta Physiol. Scand.** 15: 1-182.
- BEDIN, M., ESTRELLA, C.H.G., DUARTE, D.V., PONZI, D., DUTRA-FILHO, C.S., WYSE, A.T.S., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. (2000): Platelet Na⁺,K⁺-ATPase activity as a possible marker for the neurotoxic effects of phenylalanine in phenylketonuria. **Met. Brain. Dis.** 15: 115-121.
- BEDIN, M., ESTRELLA, C.H.G., PONZI, D., DUARTE, D.V., DUTRA-FILHO, C.S., WYSE, A.T.S., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. (2001): Reduced Na⁺,K⁺-ATPase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. **Pediatr. Res.** 50: 56-60.

- BENZI, G., MORETTI, A. (1998): Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? **Eur. J. Pharmacol.** 346: 1-13.
- BENSON, P.F., FENSON, A.H. (1985): **Genetic Biochemical Disorders** Oxford: Oxford University Press, pp. 692.
- BICKEL, H. (1987): Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. **Enzyme** 38: 14-26.
- BIEGON, A., WEIZMAN, A., KARP, L., RAM, A., TIANO, S., WOLFF, M. (1987): Serotonin 5-HT₂ receptor binding on blood platelets – a peripheral marker for depression? **Life Sci.** 41: 2485-2492.
- BLANCO, G., MERCER, R.W. (1998): Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity and function. **Am. J. Physiol.** 275: F633-F650.
- BLANCO, G., SÁNCHEZ, G., MELTON, R.J., TOURTELLOTTE, W.G., MERCER, R.W. (2000): The α 4 isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. **J. Histochem. Cytochem.** 48: 1023-1032.
- BOUTELL, J.M., WOOD, J.D., HARPER, P.S., JONES, A.L. (1998): Huntingtin interacts with cystathionine beta-synthase. **Hum. Mol. Genet.** 7: 371-378.
- BOWEN, D.M., DAWISON, A.N. (1986): Biochemical studies of nerve cells and energy metabolism in Alzheimer's disease. **Br. Med. Bull.** 42: 75-80.
- BRUSQUE, A.M., MELLO, C.F., BUCHANAN, D.N., TERRACCIANO, S.T., ROCHA, M.P., VARGAS, C.R., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M. (1999): Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 64: 529-534.

- COKUGRAS, A.N., TECZAN, F. (1997): Amitriptyline: a potent inhibitor of butyrylcholinesterase from human serum. **Gen. Pharmacol.** 29: 835-838.
- CRUYSBERG, J.R., BOERS, G.H., TRIJBELS, J.M., DEUTMAN, A.F. (1996): Delay in diagnosis of homocystinuria: retrospective study of consecutive patients. **BMJ** 313: 1037-1040.
- CUMMINGS, J.L. (2000): The role of cholinergic agents in the management of behavioral disturbances in Alzheimer's disease. **Int. J. Neuropsychopharmacol.** 3: 21-29.
- CURTIUS, H.C., MARTENET, A.C., ANDERS, P.W. (1968): Determination of free amino acids in aqueous humor of homocystinuria patients and in control subjects. **Clin. Chim. Acta** 19: 469-476.
- DARVESH, S., HOPKINS, D.A., GEULA, C. (2003): Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Rev. Neurosci.** 4: 131-134.
- DE FRANCHIS, R., SPERANDEO, M.G., SEBASTIO, G., ANDRIA, G. (1998): Clinical aspects of cystathionine β -synthase: how wide is the spectrum? **Eur. J. Pediatr.** 157: S67-S70.
- DI LUCA, M., COLCIAGHI, F., PASTORINO, L., BORRONI, B., PADOVANI, A., CATTABENI, F. (2000): Platelets as a peripheral district where to study pathogenetic mechanisms of alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. **Eur. J. Pharmacol.** 405: 277-283.
- DUBOVY, P., HANINEC, P. (1990): Non-specific cholinesterase activity of the developing peripheral nerves and its possible function in cells in intimate contact with growing axons of chick embryo. **Ont. J. Dev. Neurosci.** 8: 589-602.

- DUTRA, J.C., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D., WANNMACHER, L.E., PIRES, R.F., ROSA-JUNIOR, A. (1991): Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 24: 595-605.
- EKHOLM, M. (2001): Predicting relative binding free energies of substrate and inhibitors of acetylcholin- and butyrylcholinesterases. **J. Mol. Struct.** 572: 25-34.
- EL-MALLAKH, R.S., WYATT, R.J. (1995): The Na⁺,K⁺-ATPase hypothesis for bipolar illness. **Biol. Psychiatry.** 37: 235-244.
- ERECINSKA, M., SILVER, I.A. (1994): Silver, ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** 16: 37-71.
- EVERITT, B.J., ROBBINS, T.W. (1997): Central cholinergic systems and cognition. **Annu. Rev. Psychol.** 48: 649-684.
- FERRARESE, C., BEGNI, B., CANEVARI, C., ZOIA, C., PIOLTI, R., FRIGO, M., APPOLLONIO, I., FRATTOLA, L. (2000): Glutamate uptake is decreased in platelets from Alzheimer's disease patients. **Ann. Neurol.** 47: 641-643.
- FINKELSTEIN, J.D. (1998): The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **Eur. J. Pediatr.** 157: S40-S44.
- FISHMAN, E.B., SIEK, G.C., MCCALLUM, R.D., BIRD, E.D., VOLICER, L., MARQUIS, J.K. (1986): Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: Alterations in dementia of the Alzheimer type. **Ann. Neurol.** 19: 246-252.
- FLOTT-RAHMEL, B., SCHURMANN, M., SCHLUFF, P., FINGERHUT, R., MUSSHOF, U., FOWLER, B., ULLRICH, K. (1998): Homocysteic and

- homocysteine sulphinic acid exhibit excitotoxicity in organotypic cultures from rat brain. **Eur. J. Pediatr.** 157: S112-S117.
- FOSSI, M.C., LEONZIO, C., MASSI, A., LARI, L., CASINI, S. (1992): Serum esterase inhibition in birds: a nondestructive biomarker to assess organophosphorus and carbamate contamination. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 23: 99-104.
- FOWLER, B. (1997): Disorders of homocysteine metabolism. **J. Inherit. Metab. Dis.** 20: 270-285.
- FRASER, C.L., SARNACKI, P., ARIEFF, A.I. (1985): Abnormal sodium transport in synaptosomes from brain uremic rats. **J. Clin. Invest.** 75: 2014-2023.
- FRIDMAN, O. (1999): Hiperhomocist(e)inemia: Aterotrombosis y Neurotoxicidad. **APPTLA** 49: 21-30.
- FRYER, R.H., WILSON, B.D., GUBLER, D.B., FITZGERALD, L.A., RODGERS, G.M. (1993): Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. **Arterioscler. Thromb.** 13: 1327-1333.
- GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L., CHESS-WILLIAMS, R. (1988): Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature** 336: 385-388.
- GEERING, K. (1990): Subunit Assembly and Functional Maturation of Na,K-ATPase. **J. Membr. Biol.** 115: 109-121.
- GIACOBINI, E. (2000): In: Giacobini, E (ed.), **Cholinesterases and cholinesterase inhibitors.** pp. 181-226.

- GIACOBINI, E. (2001): Selective inhibitors of butyrylcholinesterase, a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? **Drugs Aging** 18: 891-898.
- GIACOBINI, E., SPIEGEL, R., ENZ, A., VEROFF, A.E., CUTLER, N.R. (2002): Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. **J. Neural. Transm.** 109: 1053-1065.
- GIUGLIANI, R. (1988): Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna** 23: 29-40.
- GLYNN, I.M. (1993): All hands on the sodium pump. **J. Physiol.** 462: 1-30.
- GOLDSTEIN, J.L., CAMPBELL, B.K., GARTLER, S.M. (1972): Cystathionine synthase activity in human lymphocytes: induction by phytohemagglutinin. **J. Clin. Invest.** 51: 1034-1037.
- GÓMEZ-RAMOS, P., MORÁN, M.A. (1997): Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in senile plaques in the brains of aged and Alzheimer's disease patients. **Mol. Chem. Neuropathol.** 30: 161-173.
- GRISAR, T. (1984): Glial and neuronal Na⁺-K⁺ pump in epilepsy. **Ann. Neurol.** 16: S128-S134.
- HAREL, M., SCHALK, I., EHRET-SABATIER, L., BOUET, F., GOELDNER, M., HIRTH, C., AXELSEN, P., SILMAN, I., SUSSMAN, J.L. (1993): Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 90: 9031-9035.
- HARKER, L.A., SLICHTER, S.J., SCOTT, C.R., ROSS, R. (1974): Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. **N. Engl. J. Med.** 291: 537-543.

- HATTORI, N., KITAGAWA, K., HIGASHIDA, T., YAGYU, K., SHIMOHAMA, S., WATAYA, T., PERRY, G., SMITH, M.A., INAGAKI, C. (1998): Cl⁻-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. **Neurosci. Lett.** 254: 141-144.
- HOGG, N. (1999): The effect of cyst(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine. **Free Rad. Biol. Med.** 27: 28-33.
- HORISBERGER, J.D., LEMAS, V., KRAEHENBÜHL, J.P., ROSSIER, B.C. (1991): Structure-function relationship of Na⁺,K⁺-ATPase. **Ann. Rev. Physiol.** 5: 565-584.
- ISHERWOOD, D.M. (1996): Homocystinuria. **BMJ** 313: 1025-1026.
- JACOBSON, I.R., HAGBEG, H., SANDBERG, M., HAMBERGER, A. (1986): Ouabain-induced changes in extracellular aspartate, glutamate and GABA levels in the rabbit olfactory bulb in vivo. **Neurosci. Lett.** 64: 211-215.
- KALE, M., RATHORE, N., JOHN, S., BHATNAGAR, D. (1999): Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. **Toxicol. Lett.** 105: 197-205.
- KAPLAN, J.H. (2002): Biochemistry of Na,K-ATPase. **Ann. Rev. Biochem.** 71: 511-535.
- KIM, W.K., PAE, Y.S. (1996): Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. **Neurosci. Lett.** 216, 117-120.
- KRAUS, J.P., OLIVERIUSOVA, J., SOKOLOVA, J., KRAUS, E., VLCEK, C., DE FRANCHIS, R., MACLEAN, K.N., BAO, L., BUKOVSKA, G., PATTERSON, D.,

- PACES, V., ANSORGE, W., KOZICH, V. (1998): The human cystathionine beta-synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms. **Genomics** 52: 312-324.
- KRUMAN, I.I., CULMSEE, C., CHAN, S.L., KRUMAN, Y., GUO, Z., PENIX, L., MATTSON, M.P. (2000): Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. **J. Neurosci.** 20: 6920-6926.
- KRUMAN, I.I., KUMARAVEL, T.S., TOHANI, A., CUTLER, R.G., KRUMAN, Y., HAUGHEY, N., PEDERSEN, N.A., EVANS, M.K., MATTSON, M.P. (2001): Folate deficiency and homocysteine enhance amyloid toxicity by impairing DNA repair. **Soc. Neurosci. Abstr.** 31: 962-969.
- KUBOVÁ, H., FOLBERGROVÁ, J., MARES, P. (1995): Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. **Epilepsia** 36: 750-756.
- KUHN, W., ROEBROEK, R., BLOM, H., VAN OPPENRAAIJ, D., PRZUNTEK, H., KRETSCHMER, A., BUTTNER, T., WOITALLA, D., MULLER, T. (1998): Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. **Eur. Neurol.** 40: 225-227.
- LAW, A., GAUTHIER, S., QUIRION, R. (2001): Say NO Alzheimer's disease: The putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. **Brain Res. Rev.** 35: 73-96.
- LAYER, P.G. (1991): Cholinesterases during development of the avian nervous system. **Cell. Mol. Neurobiol.** 11: 7-33.

- LEES, G.J., LEHMANN, A., SANDBERG, M., HAMBERGER, A. (1990): The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neurosci. Lett.** 120: 159-162.
- LEES, G.J. (1991): Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res. Brain Res. Rev.** 16: 283-300.
- LEES, G.J. (1993): Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. **Neuroscience** 54: 287-322.
- LENTZ, S.R., SADLER, J.E. (1991): Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. **J. Clin. Invest.** 88: 1906-1914.
- LIGURI, G., TADDEI, N., NASSI, P., LATORRACA, S., NEDIANI, C., SORBI, S. (1990): Changes in Na⁺,K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** 112: 338-342.
- LINGREL, J.B., KUNTZWEILER, T. (1994): Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.** 269: 19659-19662.
- LIPTON, S.A., KIM, W.K., CHOI, Y.B., KUMAR, S., D'EMILIA, D.M., RAYUDU, P.V., ARNELLE, D.R., STAMLER, J.S. (1997): Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 5923-5928.

- LOCKRIDGE, O., BARTELS, C.F., VAUGHAN, T.A., WONG, C.K., NORTON, S.E., JOHNSON, L.L. (1987): Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.** 262: 549-557
- LOCKRIDGE, O. (1988): Structure of human serum cholinesterase. **BioEssays** 9: 125-128.
- LUBEC, B., FANG-KIRCHER, S., LUBEC, T., BLOM, H.J., BOERS, G.H. (1996): Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. **Biochim. Biophys. Acta** 1315: 159-162.
- MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E., VALLETE, F.-M. (1993): Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Prog. Neurobiol.** 41: 31-91.
- MASSOULIÉ, J. (2002): The original of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. **Neurosignals** 11: 130-143.
- MATEJOVICOVA, M., MACHAC, S., LEHOTSKY, J., JAKUS, J., MEZESOVA, V. (1996): Synaptosomal Na,K-ATPase during forebrain ischemia in Mongolian gerbils. **Mol. Chem. Neuropathol.** 29: 67-78.
- MATTSON, M.P., KRUMAN, I.I., DUAN, W. (2002): Folic acid and homocysteine in age-related disease. **Ageing Res. Rev.** 1: 95-111.
- McCULLY, K.S. (1993): Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. **Ann. Clin. Lab. Sci.** 23: 477-493.
- McCULLY, K.S. (1996): Homocysteine and vascular disease. **Nature Med.** 2: 386-389.

- McILWAIN, H., POLL, J.D. (1985): Interaction between adenosine generated endogenously in neocortical tissues, and homocysteine and its thiolactone. **Neurochem. Int.** 7: 103-110.
- MELEADY, R.A., GRAHAM, I.M. (1995): Homocysteine as a risk factor for coronary artery disease. **J. Cardiovasc. Risk** 2: 216-221.
- MENDEL, B., RUDNEY, H. (1943): On the type of cholinesterase present in the brain tissue. **Science** 98: 201-202.
- MESULAM, M.-M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSSEN, E.G., LOCKRIDGE, O. (2001): Preservation of cholinergic systems in AChE knockouts and the role of BChE in acetylcholine hydrolysis. **Soc. Neurosci. Abstr.** 27: 2565.
- MESULAM, M.-M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSSEN, E.G., LOCKRIDGE, O. (2002): Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience** 110: 627-639.
- MILLARD, C.B., BROOMFIELD, C.A. (1992): A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 189: 1280-1286.
- MOREIRA, J.C.F., WANNMACHER, C.M.D., COSTA, S.M., WAJNER, M. (1989): Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 32: 885-890.
- MUDD, S.H., LEVY, H.L., SKOVBY, F. (2001): Disorders of Transulfuration. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLED, D. eds. **The Metabolic Basis of Inherited Disease.** 8th ed., New York, McGraw-Hill, 1279-1327.

- MUDD, S.H., SKOVBY, F., LEVY, H.L., PETTIGREW, K.D., WILCKEN, B., PYERITZ, R.E., ANDRIA, G., BOERS, G.H., BROMBERG, I.L., CERONE, R., FOWLER, B., GRÖBE, H., SCHMIDT, H., SCHWEITZER, L. (1985): The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. **Am. J. Hum. Gen.** 37: 1-31.
- NARUSZEWICZ, M., MIRKIEWICZ, E., OLSZEWSKI, A.J. (1994): Thiolation of low-density lipoprotein by homocysteine thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** 4: 70-77.
- OLNEY, J.W., COLLINS, R.C., SLOVITER, R.S. (1986): Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. **Adv. Neurol.** 44: 857- 877.
- PARSONS, R.B., WARING, R.H., RAMSDEN, D.B., WILLIAMS, A.C. (1998): In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. **Neurotoxicology** 19: 599-603.
- PONTES, Z.L., OLIVEIRA, L.S., BAVARESCO, C.S., STRECK, E.L., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D., WYSE, A.T.S. (1999): Proline administration decreases Na^+, K^+ -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. **Metab. Brain Dis.** 14: 265-272.
- PULLIN, C.H., BONHAM, J.R., MCDOWELL, I.F., LEE, P.J., POWERS, H.J., WILSON, J.F., LEWIS, M.J., MOAT, S.J. (2002): Vitamins C therapy ameliorates vascular endothelial dysfunction in treated patients with homocystinuria. **J. Inherit. Metab. Dis.** 25: 107-118.

- RASMUSSEN, A., CHRISTENSEN, J., CLEMMENSEN, P.M., DALSGAARD, N.J., DAM, H., HINDBERG, I., LUNDE, M., PLENGE, P., MELLERUP, E. (2003): Platelet serotonin transporter in stroke patients. **Acta Neurol. Scand.** 107: 150-153.
- RATNOFF, O.D. (1968): Activation of Hageman factor by L-homocystine. **Science** 162: 1007-1009.
- REIS, E.A., ZUGNO, A.I., FRANZON, R., TAGLIARI, B., MATTÉ, C., LAMERS, M.L., NETTO, C.A., WYSE, A.T.S. (2002): Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. **Metab. Brain Dis.** 17: 211-217.
- RENKAWEK, K., RENIER, W.O., DE PONT, J.J., VOGELS, O.J., GABREELS, F.J. (1992): Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy, and low activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the brain. **Epilepsia** 33: 58-64.
- RODGERS, G.M., CONN, M.T. (1990): Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. **Blood** 75: 895-901.
- RODGERS, G.M., KANE, W.H. (1986): Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. **J. Clin. Invest.** 77: 1909-1916.
- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. eds. (2001): **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.** 8th ed., New York, McGraw-Hill.
- SESHADRI, S., BEISER, A., SELHUB, J., JACQUES, P.F., ROSENBERG, I.H., D'AGOSTINO, R.B., WILSON, P.W., WOLF, P.A. (2002): Plasma homocysteine

- as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.** 346: 476-483.
- SIGNORELLO, M.G., PASCALE, R., LEONCINI, G. (2002): Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. **Eur. J. Clin. Invest.** 32: 279-284.
- SILVA, C.G., PAROLO, E., STRECK, E.L., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D., WYSE, A.T.S. (1999): In vitro inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. **Brain Res.** 838: 78-84.
- SILVER, A. (1974): **The biology of cholinesterases**, Elsevier, Amsterdam.
- SKOU, J.C., ESMANN, M. (1992): The Na,K-ATPase. **J. Bioenerg. Biomembr.** 24: 249-261.
- SOKOLOVA, J., JANOSIKOVA, B., TERWILLIGER, J.D., FREIBERGER, T., KRAUS, J.P., KOZICH, V. (2001): Cystathionine beta-synthase deficiency in Central Europe: discrepancy between biochemical and molecular genetic screening for homocystinuric alleles. **Hum. Mutat.** 18: 548-549.
- SOREQ, H., SEIDMAN, S. (2001): Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. **Nature Rev. Neurosci.** 2: 294-302.
- STAHL, S.M. (1985): Peripheral models for the study of neurotransmitter receptors in man. **Psychopharmacol. Bull.** 21: 663-671.
- STEDMAN, E., STEDMAN, E., EASSON, L.H. (1932): Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse. **Biochem. J.** 26: 2056-2066.
- STRECK, E.L., ZUGNO, A.I., TAGLIARI, B., FRANZON, R., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. (2001): Inhibition of rat brain Na⁺,K⁺-ATPase

activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress.

Neurochem. Res. 26: 1195-1200.

STRECK, E.L., MATTÉ, C., VIEIRA, P.S., ROMBALDI, F., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. (2002a): Reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia.

Neurochem. Res. 27: 1593-1598.

STRECK, E.L., ZUGNO, A.I., TAGLIARI, B., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. (2002b): Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. **Metab. Brain Dis.** 17: 83-91.

STRECK, E.L., DELWING, D., TAGLIARI, B., MATTÉ, C., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. (2003a): Brain energy metabolism is compromised by metabolites accumulating in homocystinuria. **Neurochem. Int.** 43: 567-602.

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

STRECK, E.L., BAVARESCO, C.S., NETTO, C.A., WYSE, A.T.S. (2003c): Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. **Behav. Brain Res.**, in press.

SWEADNER, K.J. (1992): Overlapping and diverse distribution of Na⁺,K⁺-ATPase isozymes in neurons and glia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 70: S255-S259.

TADA, K., YOSHIDA, T., HIRONO, H., ARAKAWA, T. (1967): Homocystinuria: amino acid pattern of the liver. **Tohoku J. Exp. Med.** 92: 325-332.

- THERIEN, A.G., GOLDSHLEGER, R., KARLISH, S.J., BLOSTEIN, R. (1997): Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit of the Na,K-ATPase. **J. Biol. Chem.** 272: 32628-32634.
- TOGHI, H., ABE, T., KIMURA, M., SAHEKI, M., TAKAHASHI, S. (1996): Cerebrospinal fluid acetylcholine and choline in vascular dementia of Binswanger and multiple small infarct types as compared with Alzheimer-type dementia. **J. Neural Transm.** 103: 1211-1220.
- TSAKIRIS, S., ANGELOGIANNI, P., SCHULPIS, K.H., STAVRIDIS, J.C. (2000): Protective effect of L-phenylalanine on rat brain acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals. **Clin. Biochem.** 33: 103-106.
- UHLENDORF, B.W., MUDD, S.H. (1968): Cystathionine synthase in tissue culture derived from human skin: enzyme defect in homocystinuria. **Science** 160: 1007-1009.
- UPCHURCH, G.R. JR., WELCH, G.N., FABIAN, A.J., FREEDMAN, J.E., JOHNSON, J.L., KEANEY, J.F. JR., LOSCALZO, J. (1997): Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. **J. Biol. Chem.** 272: 17012-17017.
- VÁSÁRHELYI, B., SALLAY, P., BALOG, E., REUSZ, G., TULASSAY, T. (1996): Altered Na⁺,K⁺-ATPase activity in uraemic adolescents. **Acta Paediatr.** 85: 919-922.
- VELLOM, D.C., RADIC, Z., LI, Y., PICKERING, N.A., CAMP, S., TAYLOR, P. (1993): Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. **Biochemistry** 32: 12-17.

- VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. (2000): Aminoácidos. In: **Fundamentos de Bioquímica**, Porto Alegre, Artes Médicas Sul, 3 ed.
- WELCH, G.N., LOSCALZO, J. (1998): Homocysteine and atherothrombosis. **N. Eng. J. Med.** 338: 1042-1050.
- WELCH, G.N., UPCHURCH, G.R. JR., LOSCALZO, J. (1997): Hyperhomocyst(e)inemia and atherothrombosis. **Ann. NY Acad. Sci.** 811: 48-58.
- WHITE, A.R., HUANG, X., JOBLING, M.F., BARROW, C.J., BEYREUTHER, K., MASTERS, C.L., BUSH, A.I., CAPPAL, R. (2001): Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. **J. Neurochem.** 76: 1509-1520.
- WILSON, I.B. (1951): Specificity in cholinesterase reactions. In: PAULING, L., ITANO, H. (Eds.), **Acetylcholinesterase: Molecular Structure and Biological Specificity**. American Institute of Biological Sciences pp. 175-185.
- WYSE, A.T.S., BOLOGNESI, G., BRUSQUE, A.M., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. (1995a): Na⁺,K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. **Med. Sci. Res.** 23: 261-262.
- WYSE, A.T.S., WAJNER, M., BRUSQUE, A.M., WANNMACHER, C.M.D. (1995b): Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on Na⁺,K⁺-ATPase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. **Biochem. Soc. Trans.** 23: 227S.

- WYSE, A.T.S., BRUSQUE, A.M., SILVA, C.G., STRECK, E.L., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. (1998): Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport** 9: 1719-1721.
- WYSE, A.T.S., STRECK, E.L., WORM, P., WAJNER, A., RITTER, F., NETTO, C.A. (2000): Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. **Neurochem. Res.** 25: 971-975.
- WYSE, A.T.S., ZUGNO, A.I., STRECK, E.L., MATTÉ, C., CALCAGNOTTO, T., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M. (2002): Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. **Neurochem. Res.** 27: 1685-1689.
- WYSE, A.T.S., STEFANELLO, F.M., CHIARANI, F., DELWING, D., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M. (2003): Arginine administration decreases cerebral cortex acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase probably by oxidative stress induction. **Neurochem. Res.**, in press.
- ZHANG, J., SNYDER, S.H. (1995): Nitric oxide in the nervous system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 35: 213-233.