



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

TESE DE DOUTORADO

Avaliação dos efeitos da homocisteína em tecidos cardíaco e cerebral (*ex vivo*) e em cultura de astrócitos adultos – possível papel protetor da vitamina D

Aline Longoni dos Santos

Orientadora: Profa Dra Angela Terezinha de Souza Wyse

Co-orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Porto Alegre
2016

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

TESE DE DOUTORADO

Avaliação dos efeitos da homocisteína em tecidos cardíaco e cerebral (*ex vivo*) e em cultura de astrócitos adultos – possível papel protetor da vitamina D

Aline Longoni dos Santos

Orientadora: Profa Dra Angela Terezinha de Souza Wyse

Coorientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica

Porto Alegre, 2016.

*“Um cientista em um laboratório não é um mero técnico:
ele também é uma criança que confronta fenômenos
naturais que o impressionam como se fossem contos de
fada.”*

[Marie Curie – 1867 - 1934]

*Dedico essa tese às pessoas mais importantes da minha vida,
meu pai, Dario, e minha mãe, Ivete, por ser meu porto seguro
sempre, pela doação, incentivo e força.
Meu marido, Adriano.
E ao grande amor, meu filho, Bernardo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa Dra Angela Wyse, pelos ensinamentos, pelo exemplo profissional, pela paciência e por todas as oportunidades que me deste, por ter recebido meu trabalho de forma profissional e materna.

Ao meu co-orientador, André Quicozes, pela dedicação e paciência necessária para me ajudar a transpor os momentos difíceis, pela amizade e carinho sempre, por ficar do meu lado nos momentos difíceis e pelo belo exemplo profissional.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry, por ter me aceitado nesse mundo da pesquisa e me ensinado a amar ela como forma de criação e melhorias para a vida humana.

Ao meu mentor Dr. Adriano Martimbianco de Assis por me guiar por esse mundo da pesquisa e por tudo que tem me ensinado sempre. O meu mais sincero muito obrigado.

Sempre achei esta a pior parte da tese para escrever, talvez porque a vida não se coloca em análise de regressão e não é pelo valor que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 36, agradeço pela convivência, amizade e pela ajuda científica e por tornar nosso ambiente de trabalho agradável.

Aos colegas do laboratório 28, agradeço pelo convívio, ensinamento, happys, pela amizade, pela ajuda nos experimentos e por tornar meu dia a dia mais feliz.

Em especial, não poderia deixar de citar:

Janaina, Tiago, Cassiana, Eduardo e a Carol que conviveram mais de pertinho comigo, que tem toda a minha gratidão e admiração. Vocês fizeram toda a diferença nessa jornada. E foi o presente que ganhei de Deus no meu doutorado. Amo vocês muito.

Aos meus pais Dario e Ivete, por ter sempre me dado o suporte para eu alcançar todas as minhas conquistas, pela paciência, atenção, amor incondicional, sabedoria e exemplo. Vocês são o maior exemplo de vida que eu tenho. Tanto de família, como de amor um com o outro. E exemplo de pessoas batalhadoras e que buscam e conquistam o que quiserem. Vieram do nada e contruíram um império. Se eu for e/ou conseguir passar um pouquinho do que vocês me ensinaram para o Bernardo, já esta muito bom. Amor maior que o mundo.

Ao meu marido Adriano que sempre esteve do meu lado, me dando força, ajuda profissional e pessoal, que é uma pessoa maravilhosa e que me

deu meu maior presente. Uma pessoa com uma paciência incrível, tão amoroso, acreditando que a família é uma unidade repleta de diversidades que se complementam e que, certamente, no cotidiano, é preciso o afeto, o carinho, o diálogo, a compreensão, a amizade. Obrigada pelos auxílios científicos... Acredito no amor e é esse amor que nos impulsiona a continuar rumo aos nossos sonhos! *“Eu quero envelhecer, estando sempre aqui ao lado seu, contigo até o fim, contigo até quando Deus quiser; repleto de filhos e netos, e você sempre aqui ao lado meu, no fim sempre juntos, como uma família!”* Te amo muitão.

Ao meu Filho Bernardo que hoje é a minha razão de viver, o que eu fiz de mais perfeito na vida. Obrigada por me ensinar que não existe amor maior. Uma pessoa alegre e de personalidade marcante, cujas brincadeiras me inspiram nos momentos de maiores dificuldades, olhar seguro e intenso me acolhe, palavras firmes e sinceras demonstram todo o carinho que tem por mim. Através do aprendizado desse exercício de ser mãe, posso afirmar que essa é a melhor experiência que uma mulher pode ter... Você é o meu maior sonho, amo você!!! *“E não há nada que aconteça, nem que possa acontecer... não vou desistir de você”*

À Deus pela proteção divina. Por iluminar minhas decisões e atitudes, por me guiar, por me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Àqueles que de alguma forma ou de outra estiveram ao meu lado durante a realização desse trabalho.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ao pessoal da secretaria do nosso PPG e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A TODOS, obrigada de coração.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Homocisteína	1
1.1.1. Hiperhomocisteinemia	3
1.1.2. Toxicidade da Hiperhomocisteinemia	3
1.2. Ações teciduais e celulares da Hiperhomocisteinemia	4
1.2.1. Sistema Nervoso Central e Cardiovascular	4
1.2.2. Astrócitos	5
1.3. Hiperhomocisteinemia leve e Modelos experimentais	6
1.4. Estresse Oxidativo	7
1.5. Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	9
1.6. Inflamação	10
1.7. Vias de Sinalização	11
1.7.1. NFκB	11
1.7. 2. HO-1	13
1.8. Metabolismo da Vitamina D	14
1.8.1. Ação protetora da vitamina D	17

II. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
III. METODOLOGIA E RESULTADOS	21
Capítulo I: Homocysteine causes changes in the mitochondrial function and redox status in heart slices: Prevention by 1,25-dihydroxyvitamin D3	22
Capítulo II: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts neuroprotective effects in an ex vivo modelo mild hyperhomocysteinemia	53
Capítulo III: Homocysteine induces glial reactivity in adult rat astrocyte cultures	62
IV. DISCUSSÃO	88
V. CONCLUSÕES	102
VI. PERSPECTIVAS	103
VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

RESUMO

As hiperhomocisteinemias (HHcy), leve e moderada são consideradas um fator de risco para doenças cardiovasculares e cerebrais, entretanto os mecanismos e as complicações decorrentes dessa condição ainda não estão bem estabelecidos. Ela ocorre em 5-10% da população geral e em 40% dos pacientes com doenças vascular periférica e doenças cerebrovasculares. Estudos recentes têm demonstrado que a vitamina D (calcitriol) possui efeitos protetores em diversos modelos experimentais que enfatizam suas possíveis ações antioxidantes. O objetivo principal dessa tese de doutorado foi estabelecer um protocolo experimental com diferentes concentrações de homocisteína em fatias de cortex cerebral e coração e em cultura de astrócitos de ratos adultos. Seguindo esses modelos experimentais, investigamos alguns parâmetros bioquímicos em córtex cerebral e coração de ratos. Posteriormente foi analisado o efeito protetor do calcitriol. No primeiro capítulo da presente tese, observamos que a incubação de 30 μ M de Hcy por 30 min e 60 min em fatias de coração, alterou a função e a permeabilidade mitocondrial, o estado redox e a atividade das enzimas da cadeia respiratória; o calcitriol foi capaz de prevenir a maioria dos efeitos da Hcy. No segundo capítulo, vimos que em fatias de córtex cerebral a Hcy prejudica o metabolismo energético, aumentando a morte neuronal e induzindo estresse oxidativo. Todavia, o calcitriol atenuou esses efeitos deletérios induzidos pela Hcy através da ativação do receptor de vitamina D. No último capítulo desta tese, realizamos um estudo em cultura primária de astrócitos corticais de ratos Wistar adultos. Nossos resultados demonstram que a Hcy ativa a via do fator nuclear kappa B (NF κ B), inibindo a expressão de heme oxigenase 1 (HO-1), promovendo alterações morfológicas, aumentando a resposta inflamatória e diminuindo as defesas antioxidantes e a atividade da Na⁺ K⁺ - ATPase. Em resumo, em todos modelos experimentais estudados nesta tese, a Hcy, mesmo em concentrações leves e moderadas causou alterações na homeostasia celular. A vitamina D preveniu parte destes efeitos, tornando-se um possível ferramenta terapêutica no intuito de atenuar os efeitos da Hcy.

ABSTRACT

Hyperhomocysteinemia (HHcy), mild and moderate are a risk factor for cardiovascular and cerebral diseases, but the mechanisms and complications of this condition are not yet well established. It occurs in 5-10% of the general population and 40% of patients with peripheral vascular and cerebrovascular disease. Recent studies have shown that vitamin D (calcitriol) has protective effects in various experimental models which emphasize their potential antioxidant actions. The main objective of this PhD thesis was to establish an experimental with different concentrations of homocysteine in slices of cerebral cortex and heart in adult rat astrocyte cultures. Following this experimental model, we investigated some biochemical parameters in the cerebral cortex and heart of rats. It was subsequently examined the protective effect of calcitriol. In the first chapter of this thesis, we found that incubation of 30 μ M of Hcy for 30 min and 60 min in heart slices change the function and mitochondrial permeability, redox state and activity of the enzymes of the respiratory chain; calcitriol was able to prevent most of the effects of Hcy. In the second chapter, we demonstrated that Hcy in the cerebral cortex slices impairs energy metabolism, increasing neuronal death and inducing oxidative stress. However, calcitriol attenuated these Hcy-induced deleterious by activation of vitamin receptor D. In the last chapter of this thesis, we conducted a study in primary culture of cortical astrocytes. Our results demonstrate that the Hcy active the pathway of nuclear factor kappa B (NF κ B) inhibiting heme oxygenase expression 1 (HO-1), promoting morphological changes, increasing the inflammatory response and decreased antioxidant defenses and activity of the Na⁺, K⁺ - ATPase. In summary, in all experimental models studied in this PhD thesis, Hcy, even in mild and moderate concentrations caused deleterious actions in cellular homeostasis. Vitamin D warned of these effects, becoming a potential therapeutic target in order to attenuate the effects of Hcy.

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS

1,25(OH)₂D₃: 1,25 dihidroxivitamina D₃
1,25 dihidroxicolecalciferol: Calcitriol
24,25(OH)₂D₃: 24,25-desidroxivitamina D₃
25(OH)D: 25-hidroxivitamina D
5-MeTHF: 5-metiltetraidrofolato
O₂: Oxigenio singlet
ATP: Trifosfato de adenosina
BHMT - Betaina homocisteina metiltransferase
CAT: Catalase
CBS: Cistationina β-sintase
CGL: cistationina γ-liase
CO: Monóxido de carbono
DCF: 2'7'diclorofluoresceína
DNA: ácido desoxirribonucleico
EIM: Erro inato do metabolismo
ERN: Espécies reativas de nitrogênio
ERO: Espécies reativas de oxigênio
GPx: Glutaciona peroxidase
GSH: glutaciona (forma reduzida)
GSSG: Dissulfeto de glutaciona
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
Hcy: Homocisteina
HHcy: Hiperhomocisteinemia
HO-1: Heme oxigenase 1
IFN-γ: Interferon gamma
IL-1β: Interleucina 1-β
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
LPS: Lipopolissacarídeo
MAT: metionina adenosiltransferase
MCP-1: Proteína quimiotática de monócito do tipo 1
Met: Metionina

MS: metionina sintase
MTHFR: Metileno tetrahidrofolato reductase
NFκB - Fator Nuclear kappa Beta
NMDA: N-metil-*D*-aspartato
NO: óxido nítrico
Nrf2: Fator Nuclear Eritroide 2
O₂^{•-}: Ânion superóxido
OCI⁻: Ânion hipoclorito
OH[•]: Radical hidroxila
PGE₂: Prostaglandinas
PLP: Piridoxal fosfato
PTH: Paratormônio
SAH: S-adenosil homocisteína
SAHH: S-adenosil homocisteína hidrolase
SAM: S-adenosilmetionina
SNC: Sistema nervoso central
SOD: Superóxido dismutase
TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α : Fator de necrose tumoral alfa
UVB: Raios ultravioleta B
VDR: Receptores de vitamina D
Vitamina D3: colecalciferol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo da homocisteína	2
Figura 2. Metabolismo vitamina D	15

I. INTRODUÇÃO

1.1. Homocisteína

A Homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado não protéico e foi identificado pela primeira vez por De Vigneaud em 1932, ela atua como um intermediário no metabolismo da metionina (Met). A Met é obtida a partir da dieta e da degradação de proteínas endógenas e tem um papel fundamental nos processos de metilação moleculares. Quando é convertida à S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima metionina adenosiltransferase (MAT, EC 2.5.1.6) a Met recebe um grupo adenosil do trifosfato de adenosina (ATP). A SAM é o principal doador de grupos metil presente no meio biológico, ela é convertida à S-adenosil homocisteína (SAH) por diversas metiltransferases, que são específicas para cada substrato. A SAH pode ser hidrolisada a Hcy e adenosina pela S-adenosil homocisteína hidrolase (SAHH, EC 3.3.1.1) (Williams e Schalinske, 2010).

A partir deste ponto, o catabolismo da Hcy pode seguir duas vias: (1) a remetilação à Met, onde a Hcy recebe um grupo metil proveniente do N5-metiltetraidrofolato, através da reação catalisada pela metionina sintase (MS, EC 2.1.1.13), ou da betaína, através da reação catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase (BHMT, EC 2.1.1.15), ou ainda (2) a transulfuração à cisteína, onde a Hcy é condensada com a serina, produzindo cistationina, através da reação catalisada pela enzima cistationina β -sintase (CBS; EC 4.2.1.22), que utiliza como coenzima o piridoxal fosfato (PLP), no passo seguinte, a enzima cistationina γ -liase (CGL, EC, 4.4.1.1) promove uma clivagem formando a cisteína (Figura 1). A rota de remetilação é amplamente distribuída no organismo, enquanto que a via de transulfuração da Hcy tem distribuição

limitada, participando do catabolismo da Hcy principalmente no fígado, rins, intestino delgado, pâncreas e cérebro (Khanal et al., 2011; Stipanuk e Ueki, 2011; Ajith e Ranimenon, 2015).

O fígado é o principal órgão de degradação do excesso de Met e manutenção dos níveis adequados de Hcy. A SAM tem um papel importante na regulação dos níveis de Hcy, pois quando os níveis de SAM estão elevados, existe uma redução na via de remetilação da Hcy à Met através da inibição da atividade da metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR). Por outro lado, quando ocorre o acúmulo de Hcy, a SAM promove o catabolismo desse aminoácido através da transulfuração por ativação da cistationina β-sintase (Paul e Borah, 2015).

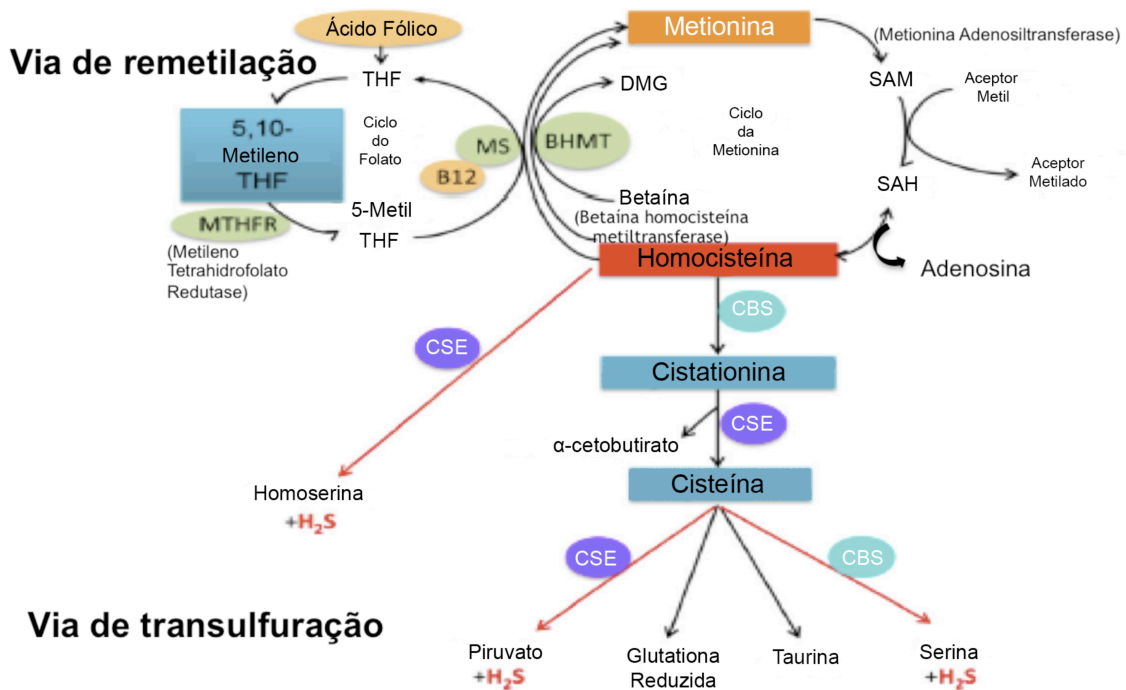


Figura 1: Metabolismo da homocisteína. SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; CBS: cistationina β-sintase; CSE: cistationina γ-liase; MS: metionina sintase; BHMT: betaína homocisteína metiltransferase; MTHFR: metileno tetrahydrofolato redutase; DMG: dimetil glicina; THF: tetrahydrofolato; 5-10-MTHF: 5,10-metilenotetrahydrofolato; 5-Me-THF: 5-metiltetrahydrofolato (Adaptado de Li, 2015).

1.1.1. Hiperhomocisteinemia

Em indivíduos normais, níveis plasmáticos de Hcy variam entre 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$. A HHcy, condição gerada pela elevação dos níveis de Hcy, pode ser causada por fatores genéticos e ambientais e é classificada em três graus conforme a severidade: leve (16-30 $\mu\text{mol/L}$), moderada (31-100 $\mu\text{mol/L}$) e severa ($> 100 \mu\text{mol/L}$) de Hcy (Banecka-Majkutewicz et al., 2012). A HHcy severa é rara e pode ser causada por deficiência genética na atividade da enzima CBS caracterizando a homocistinúria (HCU) (Kolling et al., 2014), ao contrário da HHcy leve e/ou moderada, que são mais prevalentes na população.

A HHcy leve e moderada, que é o foco dessa tese, pode ser causada por deficiências nutricionais do ácido fólico, vitaminas B₆ e B₁₂, ingestão aumentada de Met, insuficiência renal crônica, uso de alguns medicamentos, como por exemplo, metotrexato, L-dopa, fenitoína e carbamazepina, idade e sexo (Scherer et al., 2011; Ajith e Ranimenon, 2015).

1.1.2. Toxicidade da Hiperhomocisteinemia

A toxicidade da Hcy se deve principalmente a sua capacidade de ser captada através de um transportador específico de membrana, entretanto a ausência de vias de eliminação da Hcy no cérebro, também favorece sua toxicidade, uma vez que a enzima betaína homocisteína metiltransferase (BHMT) e parte da via de transulfuração até cisteína não estão presentes no cérebro (Finkelstein, 2007; Obeid, 2013).

Sabe-se que a Hcy aumenta a neurotoxicidade do peptídeo beta-amilóide por indução de estresse oxidativo (Ho et al., 2001). Outros trabalhos mostram que a HHcy leve diminui a captação de glutamato, a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, induz o estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos (Scherer et al.,

2013). Resultados obtidos pelo nosso grupo, mostram também que a HHcy severa promove peroxidação lipídica e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), além de diminuir as defesas antioxidantes enzimáticas e os níveis de nitritos em coração de ratos (Kolling et al., 2011), bem como diminui a captação de glutamato em hipocampo de ratos (Machado et al., 2011).

Já em relação aos danos vasculares, a Hcy aguda reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) aumentando a adesão e agregação plaquetária, estimulando a formação de trombos, além de alterar a morfologia vascular e estimular a inflamação (da Cunha et al., 2011). Ela também pode promover um estado pró-inflamatório, verificado através de estudos *in vitro* que demonstraram que a Hcy é capaz de induzir um aumento na expressão de várias citocinas pró-inflamatórias em tecidos e cultura de células (Stanger et al., 2004; Lee et al., 2005; Julve et al., 2013).

1.2. Ações teciduais e celulares da Hiperhomocisteinemia

1.2.1. Sistema Nervoso Central e Cardiovascular

Estudos têm demonstrado que a HHcy leve é um fator de risco para doenças cerebrais como Parkinson (dos Santos et al., 2009), Alzheimer (Minagawa et al., 2010), depressão e esquizofrenia (Permoda-Osip et al., 2013; Wysokinski e kloszewska, 2013), bem como cardíacas, entre elas aterosclerose e tromboembolismo (Den Heijer et al., 2005; Abbracchio et al., 2006). Uma elevação de cerca de 5 μ mol/L nos níveis plasmáticos de Hcy está associado com o desenvolvimento de doenças cardíacas (Xie et al., 2015). Pacientes com doença de Parkinson apresentam níveis de Hcy 30% maiores no plasma do que indivíduos normais (dos Santos et al., 2009).

Os efeitos tóxicos da Hcy ainda não estão bem elucidados em relação aos mecanismos de ação. A HHcy severa tem sido evidenciada em pacientes acometidos por doenças neuromusculares (Huang et al., 2011; Leishear et al., 2012), neurodegenerativas (Timkova et al., 2016), psiquiátricas (Pana, 2015; Bottiglieri, 2005), vasculares (Faraci e Lentz, 2004), hepáticas (Adinolfi et al., 2005) e pulmonares (Jiang et al., 2005; Hamelet et al., 2007). No SNC, a Hcy está bem associada à morte neuronal via excitotoxicidade, através da ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I (Zieminska et al., 2003) e ionotrópicos N-metil-*D*-aspartato (NMDA) (Timkova et al., 2016). A Hcy também pode danificar células (Perna et al., 2003; Weiss et al., 2003; Zou e Benerjee, 2005) por auto-oxidação do seu grupo tiol, causando prejuízo à homeostase redox. Ela pode também causar prejuízo nos processos de metilação, onde um acúmulo de Hcy leva a um aumento na SAH, que é um potente inibidor da reação de metilação. Estes são vitais para a função neurológica como a metilação de aminas biogênicas, da mielina e síntese de fosfatidilcolina (Troen, 2005).

1.2.2. Astrócitos

Astrócitos são células gliais, abundantes no SNC que representam 50% do número total de células, com características fenotípicas e de citoarquitetura única que, idealmente, os posicionam a sentir e responder a mudanças no seu microambiente. Eles estendem numerosos processos astrocíticos formando domínios anatômicos altamente organizados com poucas sobreposições entre células adjacentes e são interconectados em redes funcionais através de junções gap (Kirchhoff et al., 2001). Alguns destes processos estão em contato

com vasos sanguíneos intraparenquimais através de processos especializados chamados pés terminais (pés astrocíticos), enquanto outros expressam uma ampla gama de receptores e canais iônicos que circundam as sinapses. Desta maneira, os astrócitos apresentam um papel importante no acoplamento neurometabólico e neurovascular (Allaman et al., 2011). Eles apresentam uma morfologia heterogênea sendo dividida em duas subpopulações: astrócitos fibrosos, que são encontrados na substância branca e apresentam menos ramificações e extensões cilíndricas e os astrócitos apresentam uma localização na substância cinzenta e possuem muitos processos ramificados que envolvem as sinapses e os pés terminais que envolvem os vasos sanguíneos (Wang e Bordey, 2008).

Existem pouco trabalhos na literatura demonstrando a toxicidade da Hcy em astrócitos. Loureiro et al., (2010) em seu estudo, utilizando um modelo co-cultivo celular neurônio/astrócito, observou que o citoesqueleto de astrócitos corticais e não dos neurônios foi alvo da toxicidade da Hcy, e que este efeito foi mediado por sinalização redox. Foi demonstrado ainda que os astrócitos foram capazes de sobreviver a uma concentração de 100 μ M de Hcy, reorganizando seu citoesqueleto e protegendo os neurônios da toxicidade da Hcy (Loureiro et al., 2010).

1.3. Hiperhomocisteinemia leve e Modelos experimentais

Para indução das HHcy leve e moderada podem ser utilizados animais com deficiência genética heterozigótica na CBS (Dayal et al., 2004) ou na MTHFR (Chen et al., 2001) e principalmente intervenções dietéticas que afetam o metabolismo da Hcy via transulfuração ou remetilação (Blaise et al., 2007).

Uma deficiência de vitamina B₆ limita o fluxo da Hcy via transulfuração, enquanto que a deficiência de vitamina B₁₂ ou ácido fólico prejudica a remetilação da Hcy à Met. Recentemente, nosso grupo desenvolveu um modelo experimental *in vivo* de HHcy leve crônica, onde os ratos são submetidos a 2 injeções subcutâneas diárias de Hcy (0,03 µmol/g de peso corporal) por 30 dias (Scherer et al., 2011). Utilizando este modelo Scherer et al., (2011) mostrou que a HHcy leve induz o estresse oxidativo e a inflamação em córtex cerebral de ratos (Scherer et al., 2012).

1.4. Estresse oxidativo

Os radicais livres são produzidos como uma função fisiológica do metabolismo celular, entretanto quando em excesso, podem reagir com moléculas como lipídios e proteínas, provocando a transferência de um ou mais elétrons da molécula para o radical livre, o que acaba produzindo uma nova molécula instável. Alguns fatores como o tabagismo, poluentes ambientais, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio também ajudam a promover a produção de radicais livres (Lobo et al., 2010; Carochi e Ferreira, 2013). Todo esse processo de oxidação danifica moléculas alterando conformações e funções, criando assim uma reação em cadeia prolongando o dano oxidativo e estas lesões ocasionadas podem levar ao estresse oxidativo (Gutowski et al., 2013).

O estresse oxidativo pode ser causado de duas maneiras: I) através da modificação direta de macromoléculas intra/extracelulares que alteram suas funções, levando a efeitos patológicos, II) e por alterações no estado redox de moléculas, modificando o efeito na tradução de sinais, levando a aumentos ou

diminuições de sinalização e isso leva ao comprometimento do funcionamento celular e/ou morte celular (Lenaz, 2012; Weinreb et al., 2013).

O dano oxidativo ocorre muito rápido devido a meia-vida dos radicais livres ser muito curto e ter uma alta reatividade (Halliwell, 2007). Organismos aeróbicos precisam conviver com espécies reativas de oxigênio produzidos por eles mesmos, e concomitantemente equilibrar suas concentrações de radicais livres abaixo de níveis tóxicos através de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutatona peroxidase - GPx) e antioxidantes não enzimáticos (vitamina C, glutatona, entre outros) (Kalyanaraman et al., 2013).

Para quantificar diretamente os radicais livres e os danos oxidativos associados, usa-se biomarcadores, substâncias que podem ser mensuradas e prever a incidência de um acontecimento ou doença. Esses são relacionados ao estresse oxidativo e são mais estáveis que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN). ERO e ERN podem ser benéficas ou deletérias para estes sistemas vivos. Em baixas concentrações atuam na defesa contra agentes infecciosos e nos processos de sinalização intracelular (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011; Gutowski e Kowalczyk, 2013).

Para avaliar a produção de espécies reativas, de maneira indireta, utilizam-se medidas de reatividade e de atividade de enzimas e sistemas antioxidantes (Birben et al., 2012). Portanto esse equilíbrio entre a produção e a neutralização de espécies reativas por antioxidantes é muito importante, e se esse equilíbrio pender para a superprodução de espécies reativas, as células sofrem consequências a insultos oxidativos (Halliwell, 2011).

As espécies reativas mais importantes são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet), ânion hipoclorito (OCl^-) e o oxigênio “singlet” (O_2), e eles são gerados nos sistemas vivos através do metabolismo energético celular. A redução tetravalente completa do oxigênio molecular (O_2) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é essencial para a formação de adenosina trifosfato (ATP) e aproximadamente 5% do O_2 não é completamente reduzido à água nesse processo, sendo convertido a O_2^- , H_2O_2 e OH^\bullet . O NO^\bullet e o peroxinitrito ($ONOO^-$), formado a partir da reação do NO^\bullet com o O_2^- , constituem as principais ERN. A GPx, localizada nas membranas celulares, decompõe o H_2O_2 através do acoplamento de sua redução a H_2O com a concomitante oxidação da glutatona (GSH) ao dissulfeto de glutatona (GSSG) ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011; Gutowski e Kowalczyk, 2013).

1.5. Na^+ , K^+ -ATPase

A Na^+ , K^+ -ATPase é altamente vulnerável aos insultos oxidativos e pode ser inibida pelos radicais livres (Wang e cols., 2014). Essa enzima é muito importante para funções celulares e sinápticas. Ela é responsável pela manutenção do gradiente iônico neural, através do transporte ativo de três íons de Na^+ para o meio extracelular e dois íons de K^+ para o meio intracelular com concomitante hidrólise de ATP, sendo que a mesma consome em torno de 60% do ATP formado pelo cérebro. Essa enzima oligomérica é composta de duas subunidades α , que contém os sítios de ligação para os íons Na^+ e K^+ , ATP e glicosídios, e duas subunidades β , na forma de glicoproteínas (Scherer et al., 2013).

Estudos realizados no nosso grupo de pesquisa mostraram que a HHcy leve aumenta a produção de espécies reativas (Scherer et al., 2011) e diminui a atividade e o imunoconteúdo da Na⁺, K⁺-ATPase (Scherer et al., 2013). Essas alterações na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase têm sido associadas a diversas patologias que afetam o SNC, tais como enxaqueca (Suhail, 2010), doença de Alzheimer (Vitvitsky et al., 2012), Parkinson e epilepsia (Benarroch, 2011). Além disso, estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que alguns aminoácidos como a Met (Stefanello et al., 2011), prolina (Ferreira et al., 2011) e a Hcy (Machado et al., 2011) inibem a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase cerebral, provavelmente, através da indução de estresse oxidativo.

1.6. Inflamação

A inflamação é um mecanismo homeostático utilizado para proteger a integridade do organismo contra agentes nocivos endógenos ou exógenos. A resposta inflamatória envolve células e fatores solúveis, libera mediadores e recruta leucócitos da circulação, que se ativam no local da inflamação e liberam mais mediadores. Os mediadores são conhecidos como proteínas de fase aguda (proteína C reativa, fibrinogênio, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-1-antitripsina, haptoglobina e ceruloplasmina), interleucinas [interleucina 1-β (IL-1β), interferon gamma (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), quimiocinas (interleucina 8 (IL-8) e proteína quimiotática de monócito do tipo 1 (MCP-1) prostaglandinas (PGE₂) e NO (Saleron et al., 2002; Zhang, 2008; Colton, 2009).

As citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e interleucina 6 (IL-6) desempenham papel crucial na resposta de fase aguda. O TNF-α, secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos (Tourjman et al., 2013), é um potente ativador

de neutrófilos. Além disso, essa citocina estimula as células endoteliais a expressar moléculas de adesão e promove alterações na permeabilidade vascular (Wolf et al., 2013). A IL-6 é produzida em resposta ao TNF- α , e a IL-1 β é produzida por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais em resposta a outras citocinas, como o TNF- α , ou produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS). Ela atua sobre o endotélio aumentando a expressão de moléculas de adesão (Cao et al., 2005; Kondera-Anasz et al., 2005), ativando as fibras aferentes do nervo vago, as quais servem de sensor para a inflamação, transmitindo ao SNC o qual estimula o nervo vago eferente para a produção de ACh, que induz então a inibição da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e outras células produtoras de citocinas (Pavlov e Tracey, 2012).

Já foi demonstrado que a Hcy ativa células endoteliais em cultura, o que resulta no aumento da expressão de quimiocinas e moléculas de adesão (Hohsfield e Humpel, 2010). Poddar et al. (2001) demonstrou que concentrações de baixas de Hcy promovem um estado pró-inflamatório com o aumento da expressão e secreção de IL-8 e MCP-1 em cultura de células endoteliais aórticas humanas. E em altas concentrações, ela aumenta a concentração das citocinas pro-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), em cérebro de ratos (da Cunha et al., 2012; Scherer et al., 2014).

1.7. Vias de Sinalização

1.7.1. Fator nuclear kappa B

O Fator nuclear kappa B (NF κ B) pertence a uma família de fatores de transcrição diméricos responsáveis pela coordenação das respostas

inflamatórias; imunidade inata e adaptativa; e diferenciação, proliferação e sobrevivência celular em quase todos os organismos celulares (Gerondakis et al., 2006; Vallabhapurapu e Karin 2009; Hayden e Ghosh 2012). Em mamíferos, a família do NF κ B consiste de cinco monômeros (subunidades - p65/RelA, RelB, cRel, p50, and p52) que formam homodímeros ou heterodímeros que ligam-se ao DNA diferentemente e são regulados por duas vias: a clássica (via canônica), que está relacionada à expressão de genes associados à inflamação, à resposta imunológica inata, à anti-apoptose e à sobrevivência celular (Xiao, 2004); e a via alternativa (não-canônica) que está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção de órgãos linfóides secundários (Alcamo et al., 2002).

Na via clássica, para que o NF κ B seja ativado, o I κ B é fosforilado no resíduo de serina pelo complexo de proteína quinase IKK. Essa fosforilação é o sinal para a ubiquitinação e posterior degradação do I κ B pelo proteassoma. No citoplasma um conjunto de proteínas adaptadoras e ancoradoras (TRAFs, MyD88 e TIRAP) e quinases (RIP, IRAK) formam um complexo quando há um estímulo, facilitando o recrutamento da IKK. Após a degradação do I κ B os dímeros do NF κ B (p50-p65) são liberados e migram para o núcleo onde atuarão na regulação da transcrição de genes específicos (Kaltschmidt et al., 2005).

O complexo IKK contém duas subunidades catalíticas denominadas IKK α (IKK1) e IKK β (IKK2) e uma subunidade não catalítica denominada NEMO (do inglês NF- κ B essential modulator). Existem diversas combinações entre as subunidades do IKK, podendo ser homo ou heterodímeros de IKK α ou IKK β , associados ou não ao NEMO (Mercurio et al., 1999).

O NF κ B é expresso no SNC e periférico, tanto por neurônios quanto por

células da glia. Diversos dímeros já foram descritos no SNC, porém os mais comuns são p50-p65 e p50-p50 (O'Neill e Kaltschmidt, 1997). Em condições não patológicas a ativação do NFκB pode estar envolvida na plasticidade, desenvolvimento neural e na atividade sináptica.

1.7.2. HO-1

A heme oxigenase (HO) catalisa o primeiro e limitante passo da degradação enzimática do heme, produzindo monóxido de carbono (CO), ferro e biliverdina, que é convertida a bilirrubina através da biliverdina redutase (Ryter et al., 2006; Haines et al., 2012). Atualmente, são conhecidas duas isoenzimas geneticamente distintas de HO, HO-1 e HO-2. A HO-2 representa a isoforma constitutiva não-induzível que é expressa principalmente nas células neurais e podem atuar como antioxidantes (Syapin, 2008). Por outro lado, a forma induzível (HO-1), que apresenta baixos níveis de expressão basal na maioria das células e tecidos, é *super-regulada* por uma grande variedade de estímulos de estresse oxidativo. Onde seu grupamento heme livre pode ser originado de fontes extracelulares, na degradação de hemoglobina, e de fontes intracelulares, a partir do metabolismo de proteínas que contenham o heme em sua estrutura. E assim, em situações de excitotoxicidade, ocorre um aumento da produção de heme em sua forma livre e logo após sua degradação pela HO, por que ele não pode ser degradado. Devido ao seu padrão de regulação, a indução de HO-1 tem sido geralmente considerada como sendo uma resposta celular adaptativa contra a toxicidade do estresse oxidativo (Vile et al., 1994; Doré et al., 1999).

Recentemente, estudos têm relatado que a HO-1 possui funções imunomodulatórias e anti-inflamatórias (Gozzelino et al., 2010). Essa ligação potencial entre HO-1 e inflamação foi inicialmente demonstrada em modelos animais, onde a *super-regulação* de HO-1 atenuou os efeitos pró-inflamatórios (Willis et al., 1996). Além disso, a produção de HO-1 é regulada pelo fator de transcrição Fator Nuclear Eritroide 2 (Nrf2), levando a síntese de enzimas do sistema de defesa antioxidante. A HO-1 pode atuar sequestrando NO, inibindo a síntese da iNOS, contribuindo no controle do estresse oxidativo (Wakabayashi et al., 2010).

1.8. Metabolismo da Vitamina D

A vitamina D é um composto orgânico lipossolúvel, considerado um hormônio esteróide, essencial para o metabolismo dos seres vivos. Seu papel principal está relacionado à manutenção da homeostase do cálcio e fósforo (Kriebitzsch et al., 2011). A descoberta da participação da vitamina D na homeostase do sistema imunológico, na existência de receptores de vitamina D (VDR) em vários tecidos e células e também na capacidade de transformar a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] no metabólito ativo, 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) vem sendo discutida.

A forma ativa da vitamina D pode ser formada principalmente a partir da via endógena (Figura 2) onde o 7-desidrocolesterol localizado na pele é transformado em colecalciferol (vitamina D₃) pela ação de raios ultravioleta B (UVB) através de termo-reação.

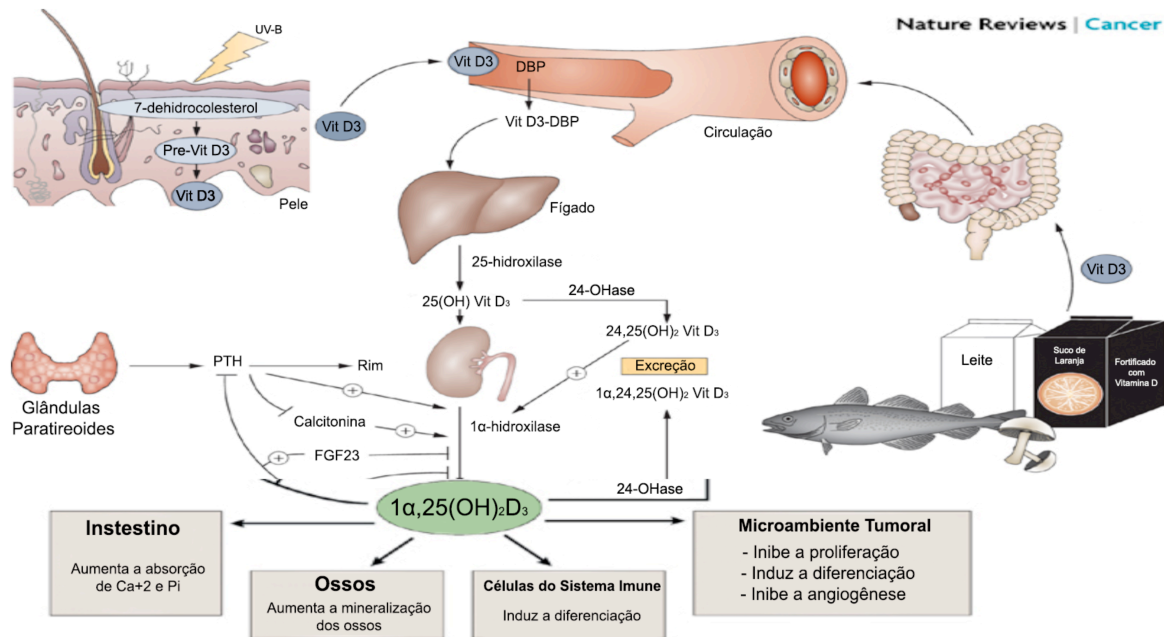


Figura 2: Metabolismo da vitamina D: A vitamina D₃ é formada a partir de 7-desidrocolesterol na pele sob a influência da radiação UVB ou é obtido a partir de fontes dietéticas por absorção através do intestino. A vitamina D₃ circulante é transportado por uma proteína ligante de vitamina D. No fígado, a vitamina D₃ é convertido para 25(OH)D pela 25-hidroxilase. A 25(OH)D é então convertido para o metabolito ativo da vitamina D, 1,25(OH)₂D₃ no rim pela enzima 1α-hidroxilase. 1α-hidroxilase é regulada por vários mecanismos, incluindo PTH, calcitonina, e FGF23. Vitamina D ativa pode ser desativada por adição de outro grupo hidroxil (OH) na posição 24, após o que o produto final é excretado. (Adaptado de Kristin et al., 2015).

A exposição excessiva a radiação UVB não causa intoxicação por vitamina D, pois ela mesma leva a degradação do 7-desidrocolesterol e do colecalciferol (Latimer et al., 2014; Lin, 2016). E a outra via para produção de vitamina D é a via exógena (Figura 2) que ocorre pela ingestão de precursores encontrados em certos alimentos, como peixe de mares profundos, de origem animal (vitamina D₃), alguns grãos e plantas, de origem vegetal (vitamina D₂) e a gema de ovo (Vitamina D₂ e D₃), onde são absorvidos via intestinal e incorporado aos quilomicrons para serem transportados pelo sistema linfático até a circulação venosa (Latimer et al., 2014; Goldmith, 2015; Wintermeyer et al., 2016). Aproximadamente 80% da vitamina D ativa vem da via endógena, que é dependente da exposição solar e dos níveis cutâneos de pigmentação

melanocítica, e apenas, 20% das necessidades corporais diárias são supridas pela alimentação e assim, diferenciam a vitamina D das demais vitaminas, cuja principal fonte é a dieta (Huotari e Herzig, 2008).

O colecalciferol e o ergocalciferol são absorvidos pelo intestino delgado e também são transpostos para o fígado por uma proteína ligante de vitamina D e em menor quantidade pela albumina (Ritterhouse, 2011), onde sofre hidroxilação para 25(OH)D, o fígado é seu principal reservatório e ela é o principal metabolito circulante (Wintermeyer et al., 2016). Nos rins, a 25(OH)D é hidroxilada, novamente, pela enzima 1α -hidroxilase a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, também conhecida como calcitriol, que é o produto mais ativo, uma vez sintetizado, é transportado na circulação até os órgãos e tecidos onde irá exercer suas funções. Essa produção é regulada pelo paratormônio (PTH) e pelos níveis séricos de cálcio e fósforo (Querales et al., 2010; Dougherty, 2016). E uma pequena parcela é hidroxilada a 24,25-desidroxivitamina D [$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$], pela enzima α -hidroxilase, que é um metabolito hidrossolúvel inativo, também conhecido como ácido calcitróico, excretado na bile (Querales et al., 2010; Wintermeyer et al., 2016).

O aumento dos precursores de vitamina D resulta no acúmulo de 25(OH)D no fígado, aumentando a produção de 24,24-diidroxicolecalciferol pela ação da 24-hidroxilase, e dessa forma, aumentando a absorção de cálcio no intestino. Já nos períodos de menor produção de vitamina D, a 25(OH)D é mobilizada e transformada em $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Karras et al., 2016; Wintermeyer et al., 2016). Diante disso, a 1α -hidroxilase é descrita em vários tecidos (próstata, pulmão, células do sistema imune), tornando possível a produção de vitamina D ativa (Vuolo et al., 2012). E assim, a presença do VDR em células do trato

reprodutivo, sistema endocrinológico, musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro e fígado sugere a participação da vitamina D em outras funções regulatórias (Eliades e Spyrou, 2015).

A 25-hidroxivitamina D e a 1α -hidroxilase estão presentes em muitos tecidos, onde encontra-se também o VDR ao qual se liga a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Após ela exercer seus efeitos nos tecidos, é degradada pelo estímulo da expressão do gene CYP24 de forma a não entrar na corrente sanguínea e interferir no metabolismo do cálcio (Gezen-AK et al., 2013; Wintermeyer et al., 2016; Lin, 2016).

1.8.1. Ação protetora da vitamina D

Dentre as várias funções da vitamina D, podemos relatar que o calcitriol, já liberado, que liga-se aos VDR, amplamente distribuídos no organismo, podendo então estimular a síntese de algumas proteínas relacionadas à regulação do metabolismo de cálcio e fósforo, modular a atividade do sistema imune, síntese e secreção de insulina, proliferação e diferenciação celular, apoptose e angiogênese (Sen e Chakraborty, 2011). Desta forma, ela é capaz de diminuir a proliferação celular tanto nas células cancerosas, como nas células normais, e induzir a diferenciação celular. Estas ações da vitamina D poderiam ser uma explicação plausível para a diminuição do risco de morte nos pacientes com câncer que apresentam níveis altos de $25(\text{OH})\text{D}$ (Kimmie, 2014).

Podemos destacar também as ações da vitamina D no SNC, onde ela pode ser chamada de “*neuro-esteróide*” (Kocovska et al., 2012), pois estruturas encefálicas como o córtex cerebral e hipocampo, expressam o VDR e a enzima 1α -hidroxilase e assim sintetizam a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Lardner, 2015). Já foi descrito

na literatura que a vitamina D é capaz de proteger neurônios contra a toxicidade da proteína beta-amilóide e prevenir danos oxidativos (Banerjee et al., 2015). Podemos ressaltar também que a adequada exposição solar está bem associada a menor ocorrência de doenças cardiovasculares (Mandarino et al., 2015).

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Considerando que há uma estreita relação entre a HHcy leve e moderada e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrais e que a fisiopatologia dessas doenças está ligada fortemente com as perturbações bioenergéticas, oxidativas e inflamatórias, o presente trabalho teve como objetivo avaliar: parâmetros de metabolismo energético, incluindo a análise da função mitocondrial; parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios em fatias de córtex cerebral e coração de ratos, bem como investigar parâmetros como viabilidade celular, atividade da Na^+, K^+ -ATPase, defesas antioxidantes e resposta inflamatória em cultura cortical de astrócitos de ratos adultos submetidos a diferentes concentrações de Hcy. Também investigamos o possível papel protetor da vitamina D sobre as alterações bioquímicas observadas no modelo experimental utilizado.

2.2. Objetivos específicos:

Os objetivos específicos estão subdivididos em três capítulos, que serão apresentados na forma de artigos científicos, como segue:

Capítulo I

- Avaliar a atividade dos complexos da cadeia respiratória, bem como a função mitocondrial através da massa e potencial;
- Determinar os parâmetros de estresse oxidativo, bem como o imunoconteúdo do receptor de vitamina D em fatias de coração de animais submetidos a um modelo experimental de HHcy leve.

- Investigar o possível papel protetor do pré tratamento de vitamina D sobre as alterações bioquímicas encontradas.

Capítulo II

- Medir os parâmetros de estresse oxidativo, bem como o imunoconteúdo do receptor de vitamina D em fatias de córtex cerebral de animais submetidos ao modelo experimental de HHcy leve;
- Verificar a atividade dos complexos da cadeia respiratória, bem como a função mitocondrial através da massa e potencial;
- Investigar o possível papel protetor do pré tratamento de vitamina D sobre as alterações bioquímicas encontradas.

Capítulo III

- Examinar o efeito da Hcy sobre a viabilidade mitocondrial, e observar alterações no citoesqueleto e na expressão de marcadores gliais em cultura primária de astrócitos de ratos adultos;
- Investigar o efeito da Hcy sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase;
- Analisar alterações causadas pelo tratamento com Hcy, em cultura primária de astrócitos corticais; altera as defesas antioxidantes e na resposta inflamatória;
- Determinar o possível mecanismo de ação da Hcy em astrócitos.

III. METODOLOGIA E RESULTADOS

Os capítulos I, II e III serão apresentados na forma de artigos científicos, sendo que os artigos I e II apresentam o mesmo desenho experimental de HHcy leve aguda com um pré tratamento de vitamina D. E no artigo III foi realizado um modelo experimental de cultura primária de astrócitos de ratos adultos com diferentes concentrações de homocisteína.

Capítulos I e II - Modelo experimental de hiperhomocisteinemia leve aguda com pré tratamento de vitamina D - Fatias

Ratos Wistar machos com 90 dias foram eutanasiados por decapitação, o cérebro foi dissecado e as estruturas desejadas foram removidas e utilizadas para a incubação. Primeiramente as fatias foram incubadas com diferentes doses de vitamina D por 30 min, e após, a Hcy na concentração de 30 μ M, foi adicionada na incubação por mais 1 h.

Capítulo III - Modelo experimental de hiperhomocisteinemia leve aguda em cultura primária de astrócitos corticais de ratos adultos

Ratos Wistar machos com 90 dias foram eutanasiados por decapitação e, o córtex cerebral foi retirado assepticamente. Essa estrutura foi dissociada mecanicamente em soluções específicas, centrifugada e após esses procedimentos as células foram ressuspendidas em meio específico para cultivo celular, em seguida colocadas em placas e cultivadas em incubadora. Quando atingida a confluência, a Hcy foi adicionada em diferentes concentrações por 24 h.

Capítulo I

Homocysteine causes changes in the mitochondrial function and redox status in heart slices: Prevention by 1,25-dihydroxyvitamin D3

Aline Longoni ^{1,2}, Janaina Kolling ^{1,2}, Cassiana Siebert ^{1,2}, João Paulo dos Santos ¹, Jussemara Souza da Silva ¹, Letícia F. Pettenuzzo ¹, Leo Anderson Meira-Martins ¹, Carlos-Alberto Gonçalves ¹, Adriano M de Assis ¹, Angela TS Wyse ^{1,2*}

¹ Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, ICBS, Universidade Federal of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

² Laboratory of Neuroprotection and Neurometabolic Diseases, Department of Biochemistry, Universidade Federal of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

* Corresponding author:

Angela TS Wyse, Ph.D.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICBS
2600 - St Ramiro Barcelos 2600, Annex Building
Department of Biochemistry, 90035-003,
Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel.: +55 51 3308 5574
E-mail: wyse@ufrgs.br

Periódico:

Status:

Submetido



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijdevneu



1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts neuroprotective effects in an *ex vivo* model of mild hyperhomocysteinemia



Aline Longoni^a, Janaina Kolling^a, Tiago M. dos Santos^a, João Paulo dos Santos^a, Jussemara Souza da Silva^a, Leticia Pettenuzzo^a, Carlos-Alberto Gonçalves^a, Adriano M. de Assis^a, André Quincozes-Santos^{a,b}, Angela T.S. Wyse^{a,b,*}

^a Postgraduate Program in Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2015

Received in revised form 3 November 2015

Accepted 19 November 2015

Available online 2 December 2015

Keywords:

1,25-Dihydroxyvitamin D3

Vitamin D receptor

Mild hyperhomocysteinemia

Calcitriol

Neuroprotection

ABSTRACT

Elevated plasma homocysteine (Hcy) levels have been detected in patients with various neurodegenerative conditions. Studies of brain tissue have revealed that hyperhomocysteinemia may impair energy metabolism, resulting in neuronal damage. In addition, new evidence has indicated that vitamin D plays crucial roles in brain development, brain metabolism and neuroprotection. The aim of this study was to investigate the neuroprotective effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) in cerebral cortex slices that were incubated with a mild concentration of Hcy. Cerebral cortex slices from adult rats were first pre-treated for 30 min with one of three different concentrations of calcitriol (50 nM, 100 nM and 250 nM), followed by Hcy for 1 h to promote cellular dysfunction. Hcy caused changes in bioenergetics parameters (e.g., respiratory chain enzymes) and mitochondrial functions by inducing changes in mitochondrial mass and swelling. Here, we used flow cytometry to analyze neurons that were double-labelled with Propidium Iodide (PI) and found that Hcy induced an increase in NeuN⁺/PI cells but did not affect GFAP⁺/PI cells. Hcy also induced oxidative stress by increasing reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and protein damage and reducing the activity of antioxidant enzymes (e.g., SOD, CAT and GPx). Calcitriol (50 nM) prevented these alterations by increasing the level of the vitamin D receptor. Our findings suggest that using calcitriol may be a therapeutic strategy for treating the cerebral complications caused by Hcy.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Homocysteine (Hcy) is a sulfur amino acid that is formed during the metabolism of dietary methionine (Stipanuk, 2004). The elevation of Hcy levels in the blood plays an important role in the aetiology of various neurological diseases, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease (Baydas et al., 2003; Cankurtaran et al., 2013; Smeyne and Smeyne, 2013), epilepsy (Herrmann and Obeid, 2011; Sachdev, 2004), stroke (Obeid and Herrmann, 2006), neu-

ropsychiatric disorders (Bottiglieri, 2005; Diaz-Arrastia, 2000), and inborn errors of metabolism (Mudd et al., 2001). High levels of Hcy cause oxidative stress in neurons (Cankurtaran et al., 2013; Tjiattas et al., 2004), alter energy metabolism (Streck et al., 2003a), reduce Ca²⁺ influx, and induce apoptosis by activating cation channels (Ovey and Naziroglu, 2015; Tjiattas et al., 2004). The neurotoxicity of Hcy has been known for decades, and several studies have demonstrated the cytotoxicity of Hcy in both *in vitro* (Kim and Pae, 1996; Parsons et al., 1998) and *in vivo* experimental models (Scherer et al., 2013). Reports indicate that Hcy is considered an important risk factor for cognitive dysfunction (Miller, 2003) and some diseases that affect the central nervous system (CNS) (Kuhn et al., 1998; White et al., 2001).

The pathological pathway relating Hcy to cellular dysfunction has not been fully defined, but oxidative stress seems to be an important contributing factor. In previous studies, our group showed that Hcy increases the levels of reactive oxygen species (ROS) (Scherer et al., 2011b) and that self-Hcy oxidation generates reactive species, significantly impair-

Abbreviations: Hcy, homocysteine; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; DCFH-DA, 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; TCA, trichloroacetic acid; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; NeuN, neuronal nuclei; GFAP, glial fibrillary acidic protein.

* Corresponding author at: Laboratório de Neuroproteção e Doenças Metabólicas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.11.005>
0736-5748/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

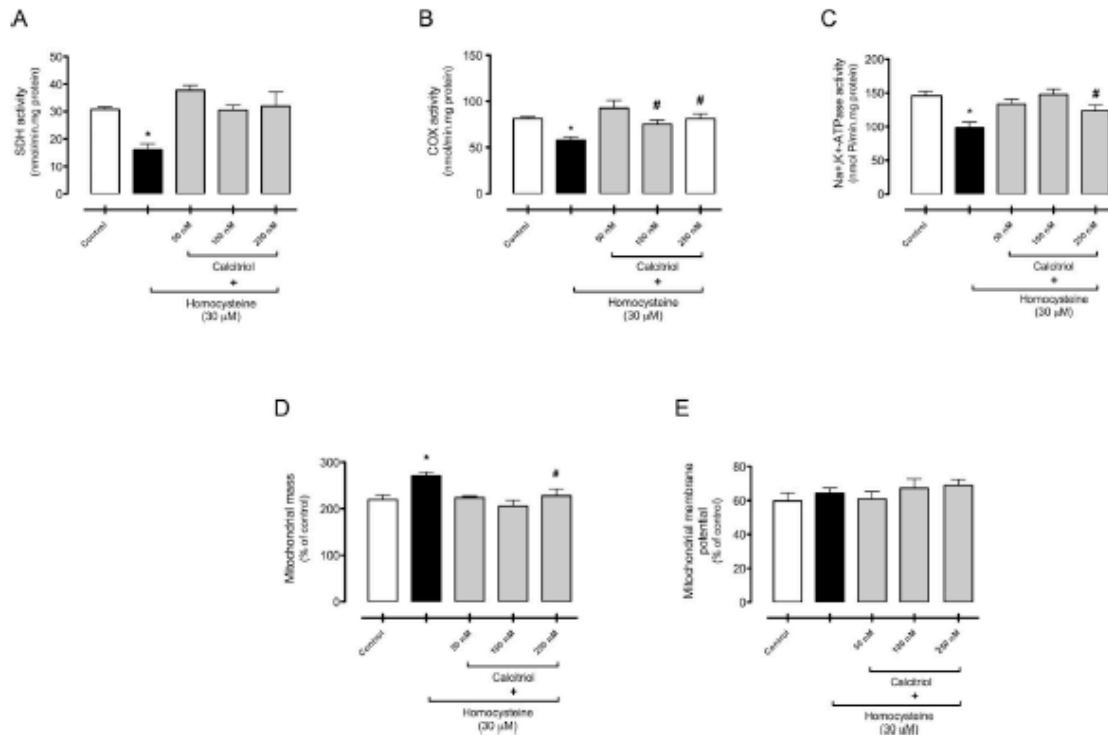


Fig. 1. The effect of pre-treatment with calcitriol on Hcy-induced changes in brain energy metabolism in rat cerebral cortex slices: SDH (A), COX (B), Na⁺, K⁺-ATPase (C), mitochondrial mass (D) and mitochondrial membrane potential (E). The results are expressed in nmol/min/mg of protein (A, B and C), as a% of the control (D and E), and as the mean ± S.E.M. (n = 6 per group). *P < 0.05 compared to the groups without the symbol and # P > 0.05 similar to all groups, as evaluated using two-way ANOVA followed Tukey's post-hoc test.

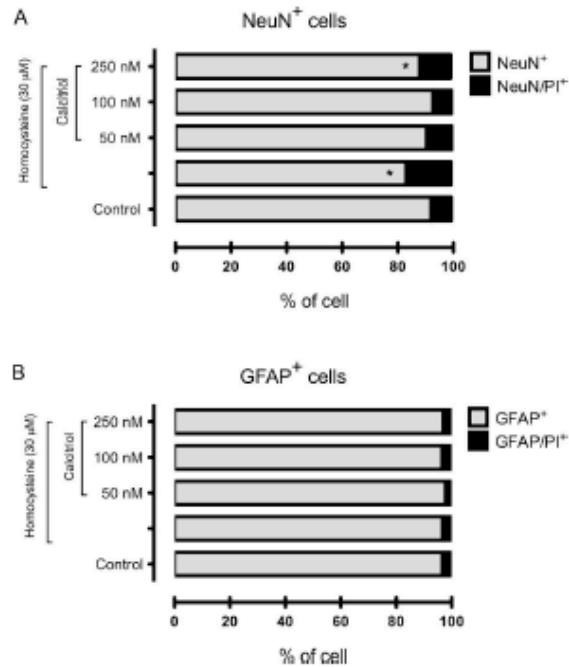


Fig. 2. The effect of pre-treatment with calcitriol before incubation with Hcy in rat cerebral cortex slices on neuronal (A) and astrocytic cell death (B). * indicates differences between NeuN⁺/NeuN PI⁺ compared to the other groups (P < 0.05), evaluated using two-way ANOVA followed Tukey's post-hoc test.

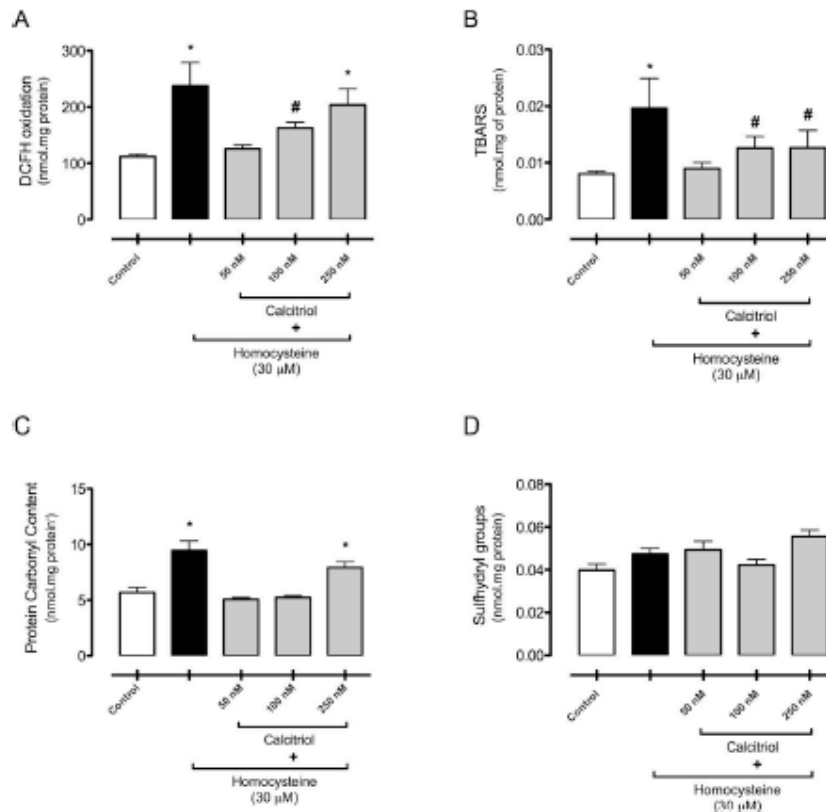


Fig. 3. The effect of pre-treatment with calcitriol against incubation with Hcy in rat cerebral cortex slices on oxidative damage. The effects on TBARS (A), DCFH (B), protein carbonyl content (C), and SH (D) are shown. Results are expressed in nmol/mg of protein and as the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ per group). * indicates $P < 0.05$ compared to the groups without the symbol and # indicates $P > 0.05$ similarity to all groups, as evaluated using two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

ing cellular components (Nishio and Watanabe, 1997; Tyagi, 1998; Welch et al., 1998).

Interactions between neurons is fundamental to brain energy metabolism. Na^+ , K^+ -ATPase activity is highly related to pathological conditions that affect the CNS because the ionic control of neuronal activity and neurotransmitters (Jorgensen et al., 2003) consumes approximately 40–50% of the ATP generated in the brain (Erecinska and Silver, 1994). On the other hand, the brain is vulnerable to elevated plasma levels of Hcy because this amino acid is transported through the membrane, leading to its intracellular accumulation (Grieve et al., 1992). It has been demonstrated that hyperhomocysteinemia significantly reduces the activity and immunocent of Na^+ , K^+ -ATPase and impairs energy metabolism in adult rat brains (Scherer et al., 2013; Streck et al., 2003b).

Recent studies have demonstrated a neuroprotective role for 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol, the active form of vitamin D3) in experimental models of neurodegenerative diseases (Jang et al., 2014; Jang et al., 2015; Newmark and Newmark, 2007). Others studies have shown that calcitriol improved energy metabolism mainly by affecting Na^+ , K^+ -ATPase activity (Cross and Peterlik, 1983; Elstein and Silver, 1986). The specific mechanisms that mediate this effect are unclear; however, calcitriol acts in many pathways, including the following: i) antioxidant pathways, ii) neuronal calcium regulation, iii) immunomodulation and iv) the glutamatergic system (Shinpo et al., 2000; Taniura et al., 2006; Wang et al., 2001). In another study, Kriebitzsch et al. (2011), showed that in murine and human cells, treatment with calcitriol

induced the transcription of many genes, including cystathionine β -synthase (CBS), which is the first enzyme in the transsulfuration pathway, leading to an increase in CBS activity and a reduction in Hcy levels.

Based on these findings, the hypothesis for this study was that Hcy promotes neural cell dysfunction, leading to impairments in brain energy metabolism, mitochondrial function and redox status. We sought to determine whether calcitriol pre-treatment would be able to prevent these deleterious effects of Hcy. To test our hypothesis, we used an *ex vivo* model involving the incubation of cerebral cortex slices from adult rats with Hcy following pre-treatment with calcitriol.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

All experiments were approved by the local Ethics Commission—CEUA/UFRGS under the number 26073 and followed the National Institutes of Health "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication No. 80-23, revised 1996).

2.2. Animals and chemicals

Male adult Wistar rats (90 days old, $n = 6$) were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry and maintained under a standard dark–light cycle (lights on between

7:00 a.m. and 7:00 p.m.) at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). These conditions were maintained constantly throughout the experiments. Homocysteine, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and all other chemicals were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The reagent 1,25-dihydroxyvitamin D_3 was diluted in 3% ethanol. A control group was formed using the same concentration of ethanol, and no differences were observed in this group across all analyses (data not shown).

2.3. Cerebral cortex preparation and ex-vivo incubation with Hcy and calcitriol

The rats were killed by decapitation, and the cerebral cortex was dissected and cut into slices (0.3 mm) using a McIlwain tissue chopper. The cerebral cortex slices (100–120 mg) were allowed to stand for 30 min in Dulbecco's buffer at 37°C . After this period, the slices were washed with buffer, and the medium was changed in the experimental groups. The slices were pre-incubated in 1.0 mL of Dulbecco's buffer (pH 7.4) containing 5.0 mM D-glucose in a Dubnoff metabolic shaker (60 breaths/min) at 37°C for 30 min. The solutions also contained calcitriol at three different concentrations. After the pre-incubation, we added Hcy (30 μM) to the medium for 60 min according to the method described in Morrone et al. (2013). The slices were separated into five experimental groups: 1) a control group in which the solution contained only Dulbecco's buffer; 2) a group in which Hcy-containing Dulbecco's buffer was used during the pre-treatment period (30 min), and then Hcy was added at a concentration of 30 μM for an additional 60 min; 3) a group in which a solution of Calcitriol (50 nM)-containing Dulbecco's buffer was used during the pre-treatment period (30 min), and then Hcy was added at a concentration of 30 μM for 60 min; 4) a group in which Calcitriol (100 nM)-containing Dulbecco's buffer was used in the pre-treatment period (30 min), and then Hcy was added at a concentration of 30 μM for 60 min; 5) a group in which Calcitriol (250 nM)-containing Dulbecco's buffer was used during the pre-treatment period (30 min) and Hcy was then added at a concentration of 30 μM for 60 min. After the incubation, the samples were washed, homogenized in a buffer, and stored in a freezer at -80°C until analysis.

We performed a calcitriol dose-response curve to determine the safest dose to use (data not shown) because some studies have shown that calcitriol can be toxic at high concentrations. We showed that 250 nM of calcitriol induced a significant decrease in cell viability. Several studies in the literature have shown that humans and rodents can tolerate plasma $25(\text{OH})\text{D}_3$ concentrations up to 500 nmol/L with no toxicity (Jang et al., 2014, 2015; Tukaj et al., 2010; Vieth, 2006).

2.4. Assays to determine respiratory chain enzyme activity

2.4.1. Analysis of Na^+ , K^+ -ATPase activity

A reaction mixture was prepared for Na^+ , K^+ -ATPase activity assays. It contained 5.0 mM MgCl_2 , 80.0 mM NaCl , 20.0 mM KCl , and 40.0 mM Tris-HCl (pH 7.4) in a final volume of 200 μl . After 10 min of pre-incubation at 37°C , the reaction was begun by adding ATP at a final concentration of 3.0 mM, and the slices were incubated for 20 min. Control experiments were performed under the same conditions but using 1.0 mM ouabain. Na^+ , K^+ -ATPase activity was calculated as the difference between the two assays according to their methods described in Wyse et al. (2000). Released inorganic phosphate (P_i) was measured using the methods described in Chan et al. (1986), and enzyme-specific activity was expressed as nmol P_i released per min per mg of protein.

2.4.2. Succinate dehydrogenase activity

To analyse succinate dehydrogenase (SDH) activity, cerebral cortex slices were homogenized 1:20 (w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (sucrose 250 mM, 2 mM EDTA, 1 mM Trizma base and 50 U/ml of heparin). The homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 1 min, and the supernatants were stored at -70°C until use to determine enzymatic activity. SDH activity was determined according to the method described by Fischer et al. (1985) as a decrease in the absorbance of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) at 600 nm, with 700 nm used as the reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), in the presence of phenazine methosulfate (PMS). For this test, the samples were thawed and refrozen three times to break the mitochondrial membranes. A reaction solution containing 40 mM potassium phosphate (pH 7.4), 16 mM succinate, and 8 μM DCIP was pre-incubated with 40–80 μg of homogenized protein at 30°C for 20 min. Then, 4 mM sodium azide, 7 μM rotenone and 40 μM DCIP were added. The reaction was initiated by the addition of 1 mM PMS and verified after 5 min. The results were expressed as nmol/min/mg protein.

2.4.3. Complex II activity

Complex II activity was defined as a decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) at 600 nm, with 700 nm used as the reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), according to Fischer et al. (1985). Immediately before this test, the samples were thawed and refrozen three times to break the mitochondrial membranes. A reaction solution containing 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate, and 8 μM DCIP was pre-incubated with 40–80 μg of homogenized protein at 30°C for 20 min. Then, 4 mM sodium azide and 7 μM rotenone were added. The reaction was initiated by the addition of 40 μM DCIP and verified after 5 min. The results were expressed as nmol/min/mg protein.

2.4.4. Cytochrome c oxidase activity

The activity of this enzyme was determined according to the methods described in Rustin et al. (1994). Enzymatic activity was measured at 25°C for 10 min as a decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm, with 580 nm used as the reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A reaction solution was prepared containing 1 mM potassium phosphate (pH 7.0), 0.6 mM *n*-dodecyl- β -D-maltoside, and 2–4 μg of homogenized protein, and the reaction was initiated by adding 7.0 μg reduced cytochrome c. The results were expressed in nmol/min/mg protein.

2.5. Flow cytometry assay

2.5.1. Mitochondrial mass and membrane potential measurements

MitoTracker Red (MTR or Chloromethyl-X-rosamine) and MitoTracker Green (MTG) dyes were used to assess mitochondrial function. MTR and MTG were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to create a 1 mM stock solution. The cerebral cortex samples (20 mg) were mechanically dissociated using 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 1 mg/mL of collagenase IV. These solutions were filtered through a 40- μm nylon mesh to remove large clumps of cells and debris and then stained with 100 nM MTR and 100 nM MTG for 45 min at 37°C in a water bath in a dark room according to the method described by Keij et al. (2000) and Pendergrass et al. (2004), with some modifications. Immediately after staining, the cell suspensions were removed from the water bath and analysed using flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.5.2. Immunostaining for GFAP, NeuN and PI

Cerebral cortex samples (30 mg) were mechanically dissociated in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4), containing 1 mg/mL of collagenase IV and then filtered through a 40- μ m nylon mesh to remove large clumps of cells and debris. They were then incubated in PBS/collagenase containing 10 μ g/mL propidium iodide (PI). The cells were incubated at room temperature in the dark for 30 min, washed twice with PBS, and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at 4°C to remove the free PI-containing supernatant. Afterwards, the cells were permeabilized using 0.001% PBS Triton X-100 and blocked for 15 min with 1% bovine serum albumin. After blocking the cells, they were incubated for 1 h in blocking solution containing monoclonal anti-NeuN antibodies that were diluted 1:100 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) or anti-GFAP antibodies that were diluted 1:100 (Dako, CA, USA). The cells were washed twice with PBS and then incubated for 1 h in blocking solution containing Alexa 488 anti-mouse IgG (diluted 1:200) or Alexa 488-anti-rabbit IgG (diluted 1:200) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA). The level of PI incorporation and the number of NeuN-positive or GFAP-positive cells were determined using flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Alexa Fluor 488 and the PI dyes were excited at 488 nm using an air-cooled argon laser. Negative controls (samples incubated with only the secondary antibody) were included in the machine voltage setup. The emission of fluorochromes was recorded using specific band-pass fluorescence filters – green (FL-1; 530 nm/30) and red (FL-3; 670 nm long pass) – and CellQuest Pro software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Fluorescence emissions were collected using logarithmic amplification. Briefly, the data from 20,000 events (intact cells) were acquired, and the mean relative fluorescence intensity was determined after excluding debris events from the data set. All flow cytometric analyses were performed using Flow Jo software 7.6.3 (Treestar, Ashland, OR). Flow cytometry data were analyzed and plotted using density in dot plots, which show the relative FL1 fluorescence on the x-axis and the relative FL3 fluorescence on the y-axis. The negative and positive quadrants were determined using unstained samples. The number of cells in each quadrant was computed, and the proportion of cells stained with PI, NeuN and GFAP were expressed as percentages of the control according to the methods described in Heimfarth et al. (2012).

2.6. Oxidative stress parameters

2.6.1. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

According to Draper and Hadley (1990), a test was performed to assess reactive species of thiobarbituric acid (TBARS) and lipid oxidation indices. The TBARS test consists of an acid-heating reaction containing the lipid peroxidation end product, malondialdehyde, and thiobarbituric acid (TBA). The TBARS were determined at 532 nm, and the results were expressed as nmol/mg protein.

2.6.2. Measurement of protein carbonyls

The oxidative damage to proteins was measured by quantifying the number of carbonyl groups in a reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) according to the protocol described in Levine et al. (1994).

2.6.3. 2',7'-Dihydrodichlorofluorescein oxidation

The production of reactive oxygen/nitrogen species was measured following the methods described in Lebel et al. (1992), which are based on analyses of DCFH oxidation and 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA).

2.6.4. Total protein thiol content

After incubation, the swatches were analyzed for thiol content, which was used as an estimate of the number of oxidative modifications to proteins according to the methods described by Ellman (1959).

2.6.5. Antioxidant activities assays

To determine superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (SOD) activity, we used homogenized samples (40 μ g of protein), as described by Boveris (1984). Catalase (EC 1.11.1.6) (CAT) activity was measured as previously described by Aebi (1984). Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) (GPx) activity was measured according to the methods described by Wendel (1981), using *tert*-butyl hydroperoxide as the substrate.

2.7. Western blot analysis

Proteins (20–30 μ g) isolated from cerebral cortex slices were separated using SDS-PAGE on 10% (w/v) acrylamide gels and then electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) containing 5% (w/v) bovine serum albumin for 1 h at room temperature. The membranes were then incubated overnight with the appropriate primary antibody, including glutathione peroxidase (1:1000; Cell Signalling®), superoxide dismutase 2 (1:5000), vitamin D receptor (1:1000; Abcam®) and β -actin (1:2000; Sigma Aldrich®). The membranes were then rinsed with TBS-T and exposed to horseradish peroxidase-linked anti-IgG antibodies for 2 h at room temperature. Chemiluminescent bands were detected using an ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare®), and densitometry analyses were performed using Image-J® software. The results were expressed as a percentage of the control according to the technique described by de Oliveira et al. (2013).

2.8. Statistical analyses

The data are expressed as the mean \pm S.E.M. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 16.0, Chicago, IL, USA) software. Differences among groups were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* tests. $P < 0.05$ was determined to indicate significance.

3. Results

Fig. 1 shows the protective effect provided by pre-treatment with calcitriol against cell dysfunction that was induced by Hcy on brain energy metabolism and mitochondrial function. Hcy promoted a significant decrease succinate dehydrogenase-SDH activity (1A), cytochrome c oxidase (COX) activity (1B) and Na^+ , K^+ -ATPase activity (1C), respectively ($P < 0.05$). Fig. 1D and 1E demonstrate that Hcy caused a significant increase in mitochondrial mass (1D, $P < 0.05$) and did not affect mitochondrial membrane potentials (1E, $P < 0.05$). Pre-treatment with calcitriol (50 nM and 100 nM) blocked these effects.

In Fig. 2, we show that incubation with Hcy promoted an increase in NeuN/ PI^+ cells (2A, $P < 0.05$), which indicates neuronal death; however, we did not observe any difference in astrocytes (GFAP/ PI^+ cells) (2B). Pre-treatment with calcitriol (50 nM and 100 nM) prevented the Hcy-induced decrease in the NeuN/ PI^+ cells.

In Figs. 3 and 4, we sought to investigate whether pre-treatment with calcitriol would act as an antioxidant against the oxidative damage induced by Hcy. Incubation with Hcy induced a significant increase in reactive species via the oxidation of DCFH-DA (3A, $P < 0.05$), in lipid peroxidation (3B; $P < 0.05$) and in the protein carbonyl content (3C; $P < 0.05$), but did not affect sulfhydryl groups

(3D). Pre-treatment with calcitriol at 50 nM prevented these effects ($P < 0.05$). Incubation with Hcy also promoted a decrease in the activity of antioxidant enzymes (SOD activity; Fig. 4A, $P < 0.05$) and a decrease in CAT (Fig. 4B, $P < 0.05$) and GPx (Fig. 4C, $P < 0.05$). Calcitriol (50 nM and 100 nM) completely prevented these effects ($P < 0.05$).

Fig. 5 shows that Hcy did not affect SOD or calcitriol receptor-VDR immunocontent (Fig. 5A and 5B, respectively), but it did increase GPx expression (Fig. 5C, $P < 0.05$). However, pre-treatment with calcitriol at 50 nM and 100 nM prevented the Hcy-induced decrease in GPx immunocontent (Fig. 5C, $P < 0.05$) and the increase in VDR (Fig. 5B, $P < 0.05$).

4. Discussion

Elevated levels of Hcy in the circulation increase the risk of developing many neurological disorders, such as age-related diseases, Parkinson's, Alzheimer's, dementia and stroke (Manolescu et al., 2010; Obeid and Herrmann, 2006). Hcy plays a role in a shared biochemical cascade involving the overstimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Lipton et al., 1997), oxidative stress (Huang et al., 2001; Outinen et al., 1998), the activation of caspases, DNA damage and mitochondrial dysfunction (Kruman et al., 2000). However, the exact mechanisms involved in the neurotoxicity of Hcy, and the discovery of a good neuroprotective agent has not been achieved.

In the present study, we demonstrated that Hcy impaired energy metabolism, increased neuronal death and induced oxidative stress. Furthermore, pre-treatment with calcitriol (50 nM) attenuated the deleterious effects induced by Hcy, probably via the activation of vitamin D receptors, which would promote the upregulation of CBS activity (Kriebitzsch et al., 2011).

Brain energy metabolism is very important to maintain all of the physiological functions in different neural cells. Several studies have demonstrated that Hcy impairs Na⁺, K⁺-ATPase (Scherer et al., 2013), acetylcholinesterase (Scherer et al., 2014) and enzymes in the electron transport chain (Streck et al., 2003b). In agreement with previous results, we used an *ex vivo* model to show for the first time that Hcy decreased SDH, COX, Na⁺, K⁺-ATPase activity and impaired mitochondrial functionality. In addition, calcitriol prevented Hcy-induced dysfunctions in SDH, COX and Na⁺, K⁺-ATPase activity and mitochondrial swelling. Changes in enzymatic antioxidant activity and GPx levels were also prevented by calcitriol. This protective effect of calcitriol on Na⁺, K⁺-ATPase activity was previously described by Cross and Peterlik (1983) in peripheral tissues.

The toxicity of Hcy in the CNS has been extensively described to affect both neuronal survival and the ability of neurons to transmit signals and to thereby form functional neural networks. These results demonstrate that Hcy has effects that extend beyond neuronal survival (Seshadri et al., 2002). In agreement with the literature, we found in our work that Hcy promoted an increase in neuronal death but did not affect glial reactivity. In our study, we demonstrated that pre-treatment with calcitriol (50 nM) prevented neuronal death. In agreement with this result, another study showed that lower concentrations (1–100 nM) of 1,25-dihydroxyvitamin D3 provided neuroprotection against excitotoxic insults in rat hippocampal primary cultures (Brewer et al., 2001).

Several hypotheses concerning the neurotoxic effects of Hcy have been proposed, and oxidative stress is central to all of them (Petras et al., 2014). These hypotheses are in agreement with previous studies that showed that during the oxidation of Hcy, reactive species such as O₂⁻ and OH⁻, which are harmful to most cellular components, are generated (Welch et al., 1998). In a previous pre-clinical study, our group showed that mild hyperhomocysteinemia promoted oxidative stress in the blood and the cerebral

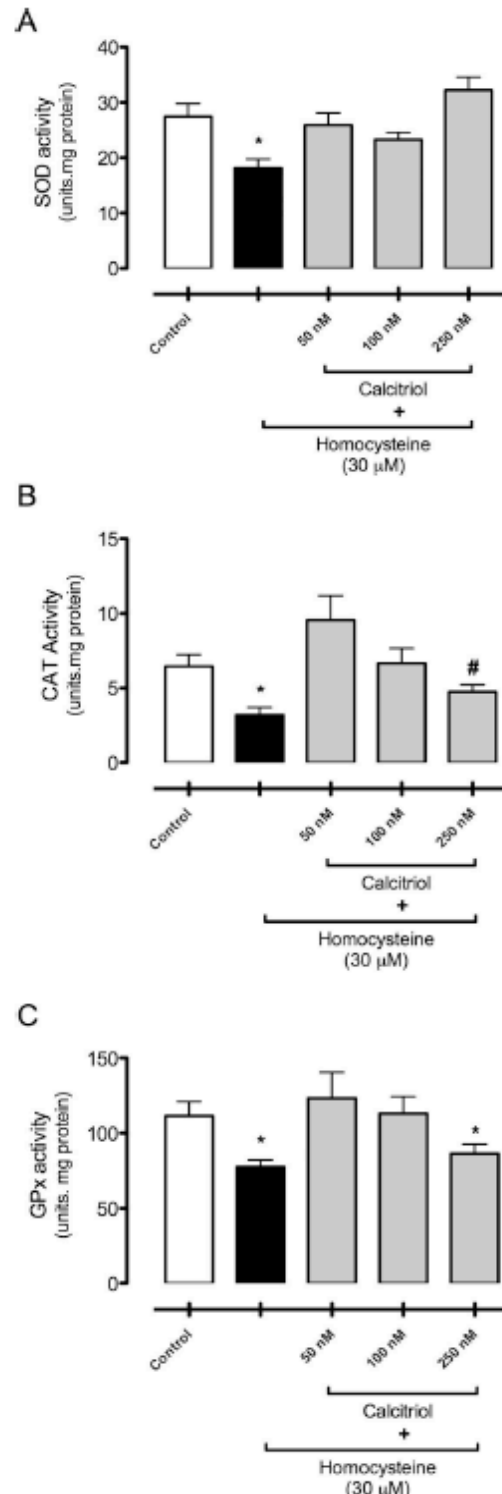


Fig. 4. The effect of pre-treatment with calcitriol against incubation with Hcy in rat cerebral cortex slices. The effects on superoxide dismutase (A), catalase (B) and glutathione peroxidase (C) are shown. All enzymes are expressed in units/mg of protein and as the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ per group). * indicates $P < 0.05$ compared to the groups without the symbol, and # indicates $P > 0.05$ similarity to all groups, as evaluated using two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

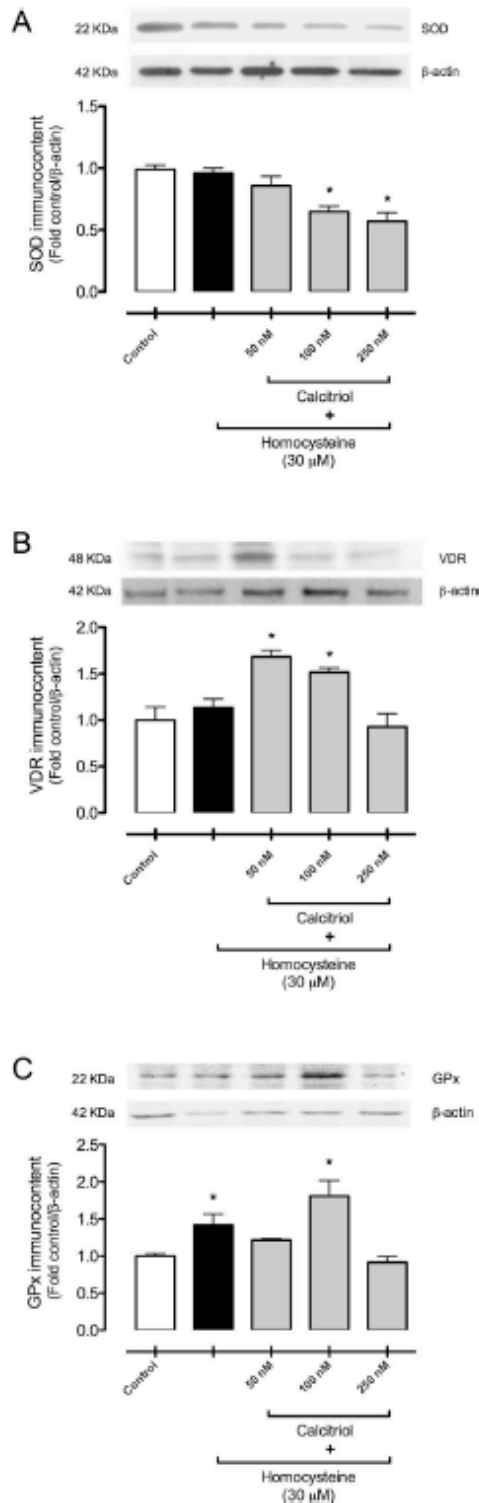


Fig. 5. The effect of pre-treatment with calcitriol against incubation with Hcy in rat cerebral cortex slices on levels of SOD (A), VDR (B) and GPx (C). The results are expressed as folds of the control/ β -actin and as the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ per group). * indicates $P < 0.05$ compared to the other groups as evaluated using two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

cortex, where it disrupted enzymatic and non-enzymatic antioxidant defences (Scherer et al., 2011b). In this study, we found that incubating cerebral cortex slices with Hcy induced an increase in the production of reactive species and in lipid peroxidation and damage to proteins, resulting in a misbalance in antioxidant enzymatic activity. We show that pre-treatment with calcitriol (50 nM) prevented these changes to the redox state. While the mechanism for the neuroprotective action of calcitriol is not clear, in the literature, recent work using the SH-SY5Y cell line showed that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ reversed the neurotoxic effects of rotenone by enhancing autophagy-related signalling pathways (Jang et al., 2014).

It is clear in the literature that calcitriol plays a physiological and very important role in the central nervous system in rodents and humans. This statement can be made based on the fact that the VDR and the enzyme (CYP27B1) responsible for the formation of calcitriol, which is the active form of vitamin D, are expressed throughout the regions of the brain (Eyles et al., 2005; Prifer et al., 1999; Veenstra et al., 1998). The receptor and the enzyme were found in both neurons and glial cells. Several clinical reports have supported an association between inadequate levels of 25-hydroxyvitamin D and increased risk of developing neurodegenerative diseases (Derex and Trouillas, 1997; Newmark and Newmark, 2007; Sato et al., 1997; Sutherland et al., 1992). Pre-treatment with calcitriol increased the level of the vitamin D receptor only when calcitriol was used at concentrations of 50 nM and 100 nM, which were the same concentrations that provided a neuroprotective effect. In agreement with our results, an extensive study by Kriebitzsch et al. (2011) that investigated the LASA cohort, a human population-based study (1264 individuals between 65 and 88 years of age), found a significant correlation between Hcy levels and 25-hydroxyvitamin D₃ levels in the plasma, with the lowest Hcy levels being observed when the 25-hydroxyvitamin D₃ level was between 50 and 60 nM (20–24 ng/mL), which is the same dose that we show promotes neuroprotective effects against Hcy toxicity. In the same study, the authors proposed that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promotes an increase in the mRNA levels of CBS and that functional VDR was required for this process to happen. We therefore suggested that the beneficial effects of calcitriol that are demonstrated in this study are mediated through the vitamin D receptor and the up-regulation of the expression of some genes, such as CBS.

In this work, we used an *in vivo* model to show that calcitriol acts as a neuroprotective substance to prevent the alterations induced by Hcy in brain energy metabolism, the redox state and neuronal cell death. These data suggest that calcitriol may be a new target for therapies aimed at preventing the deleterious effects of mild concentrations of Hcy toxicity.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Baydas, G., Kutlu, S., Naziroglu, M., Canpolat, S., Sandal, S., Ozcan, M., Kelestimur, H., 2003. Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine. *J. Pineal Res.* 34, 36–39.
- Bottiglieri, T., 2005. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1103–1112.
- Boveris, A., 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* 105, 429–435.

- Brewer, L.D., Thibault, V., Chen, K.C., Langub, M.C., Landfield, P.W., Porter, N.M., 2001. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 21, 98–108.
- Cankurtaran, M., Yesil, Y., Kuyumcu, M.E., Ozturk, Z.A., Yavuz, B.B., Halil, M., Ulger, Z., Cankurtaran, E.S., Ariogul, S., 2013. Altered levels of homocysteine and serum natural antioxidants links oxidative damage to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 33, 1051–1058.
- Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.
- Cross, H.S., Peterlik, M., 1983. Vitamin D stimulates (Na⁺+K⁺)-ATPase activity in chick small intestine. *FEBS Lett.* 153, 141–145.
- de Oliveira, R.B., Senger, M.R., Vasques, L.M., Gasparotto, J., dos Santos, J.P., Pasquali, M.A., Moreira, J.C., Silva Jr., F.P., Gelain, D.P., 2013. Schistosoma mansoni infection causes oxidative stress and alters receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and tau levels in multiple organs in mice. *Int. J. Parasitol.* 43, 371–379.
- Dere, L., Trouillas, P., 1997. Reversible parkinsonism, hypophosphoremia, and hypocalcemia under vitamin D therapy. *Mov. Disord.* 12, 612–613.
- Diaz-Arrastia, R., 2000. Homocysteine and neurological disease. *Arch. Neurol.* 57, 1422–1427.
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid-peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421–431.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Elstein, D., Silver, J., 1986. Na⁺/K⁺-ATPase activity and 25(OH) vitamin D₃ hydroxylation in rat proximal tubules. *Pflügers Arch.* 407, 451–455.
- Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43, 37–71.
- Eyles, D.W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., McGrath, J.J., 2005. Distribution of the vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J. Chem. Neuroanat.* 29, 21–30.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C., Janssen, A.J., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* 153, 23–36.
- Grieve, A., Butcher, S.P., Griffiths, R., 1992. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *J. Neurosci. Res.* 32, 60–68.
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Dutra, M.F., Andrade, C., Pettenuzzo, L., Guma, F.T.C.R., Goncalves, C.A.S., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2012. In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: implications of MAPK and Akt pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 143–152.
- Herrmann, W., Obeid, R., 2011. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 435–441.
- Huang, R.F., Huang, S.M., Lin, B.S., Wei, J.S., Liu, T.Z., 2001. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci.* 68, 2799–2811.
- Jang, W., Kim, H.J., Li, H., Jo, K.D., Lee, M.K., Song, S.H., Yang, H.O., 2014. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates rotenone-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through induction of autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 142–147.
- Jang, W., Park, H.H., Lee, K.Y., Lee, Y.J., Kim, H.T., Koh, S.H., 2015. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates L-DOPA-induced neurotoxicity in neural stem cells. *Mol. Neurobiol.* 51, 558–570.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., Kariish, S.J., 2003. Structure and mechanism of Na₂K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 817–849.
- Keij, J.F., Bell-Prince, C., Steinkamp, J.A., 2000. Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor green, and MitoTracker green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry* 39, 203–210.
- 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.
- Kriebitzsch, C., Verlinden, L., Eelen, G., van Schoor, N.M., Swart, K., Lips, P., Meyer, M.B., Pike, J.W., Boonen, S., Carlborg, C., Vitvitsky, V., Bouillon, R., Banerjee, R., Verstuyf, A., 2011. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ influences cellular homocysteine levels in murine preosteoblastic MC3T3-E1 cells by direct regulation of cystathionine beta-synthase. *J. Bone Miner. Res.* 26, 2991–3000.
- Kruman, I.I., Culumsee, 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.
- Kuhn, W., Roebroek, R., Blom, H., van Oppenraaij, D., Przuntek, H., Kretschmer, A., Buttner, T., Wölschlägel, D., Müller, T., 1998. Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. *Eur. Neurol.* 40, 225–227.
- Lebel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the Probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins oxygen radicals in biological systems. *PTC* 233, 346–357.
- Lipton, S.A., Kim, W.K., Choi, Y.B., Kumar, S., D'Emilia, D.M., Rayudu, P.V., Arnette, D.R., Stamler, J.S., 1997. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5923–5928.
- Manolescu, B.N., Oprea, E., Farcasanu, I.C., Berceanu, M., Cercasov, C., 2010. Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment: a review. *Acta Biochim. Pol.* 57, 467–477.
- Miller, A.L., 2003. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern. Med. Rev.* 8, 7–19.
- Morrone, M.D., de Assis, A.M., da Rocha, R.F., Gasparotto, J., Gazola, A.C., Costa, G.M., Zucolotto, S.M., Castellanos, L.H., Ramos, F.A., Schenkel, E.P., Reginatto, F.H., Gelain, D.P., Moreira, J.C.F., 2013. Passiflora manicata (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation in vitro and ex vivo models. *Food Chem. Toxicol.* 60, 45–51.
- Mudd, S.H., Cerone, R., Schiaffino, M.C., Fantasia, A.R., Minniti, G., Caruso, U., Lorini, R., Watkins, D., Matiaszuk, N., Rosenblatt, D.S., Schwahn, B., Rozen, R., LeGros, L., Kotb, M., Capdevila, A., Luka, Z., Finkelstein, J.D., Tangerman, A., Stabler, S.P., Allen, R.H., Wagner, C., 2001. Glycine N-methyltransferase deficiency: a novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. *J. Inher. Metab. Dis.* 24, 448–464.
- Newmark, H.L., Newmark, J., 2007. Vitamin D and Parkinson's disease—a hypothesis. *Mov. Disord.* 22, 461–468.
- Nishio, E., Watanabe, Y., 1997. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for hydrogen peroxide. *Br. J. Pharmacol.* 122, 269–274.
- Obeid, R., Herrmann, W., 2006. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett.* 580, 2994–3005.
- Ohtinen, P.A., Sood, S.K., Liaw, P.C., Sarge, K.D., Maeda, N., Hirsh, J., Ribau, J., Podor, T.J., Weitz, J.L., Austin, R.C., 1998. Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochem. J.* 332, 213–221, Pt 1.
- Ovey, I.S., Naziroglu, M., 2015. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience* 284, 225–233.
- 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.
- Pendergrass, W., Wolf, N., Poot, M., 2004. Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 61, 162–169.
- Petrus, M., Tatarikova, Z., Kovalska, M., Mokra, D., Dobrota, D., Lehotsky, J., Drgova, A., 2014. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J. Physiol. Pharmacol.* 65, 15–23.
- Prufer, K., Veenstra, T.D., Jirikowski, G.F., Kumar, R., 1999. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 16, 135–145.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228, 35–51.
- Sachdev, P., 2004. Homocysteine, cerebrovascular disease and brain atrophy. *J. Neurol. Sci.* 226, 25–29.
- Sato, Y., Kikuyama, M., Oizumi, K., 1997. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in Parkinson's disease. *Neurology* 49, 1273–1278.
- Scherer, E.B., da Cunha, A.A., Kolling, J., da Cunha, M.J., Schmitz, F., Sitta, A., Lima, D.D., DeLwng, D., Vargas, C.R., Wyse, A.T., 2011b. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 693–699.
- Scherer, E.B., Loureiro, S.O., Vuaden, F.C., da Cunha, A.A., Schmitz, F., Kolling, J., Savio, L.E., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2014. Mild hyperhomocysteinemia increases brain acetylcholinesterase and proinflammatory cytokine levels in different tissues. *Mol. Neurobiol.* 50, 589–596.
- Scherer, E.B., Loureiro, S.O., Vuaden, F.C., Schmitz, F., Kolling, J., Siebert, C., Savio, L.E., Schweinberger, B.M., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Wyse, A.T., 2013. Mild hyperhomocysteinemia reduces the activity and immunocomponent, but does not alter the gene expression, of catalytic alpha subunits of cerebral Na⁺/K⁺-ATPase. *Mol. Cell. Biochem.* 378, 91–97.
- 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.
- Shimpo, K., Kikuchi, S., Sasaki, H., Morioka, F., Tashiro, K., 2000. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cultured mesencephalic dopaminergic neurons to the combined toxicity caused by L-buthionine sulfoximine and 1-methyl-4-phenylpyridine. *J. Neurosci. Res.* 62, 374–382.
- Smeyne, M., Smeyne, R.J., 2013. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 13–25.
- Stipanuk, M.H., 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 539–577.
- Streck, E.L., Delwing, D., Tagliari, B., Matte, C., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003a. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem. Int.* 43, 597–602.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P.S., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003b. Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1637, 187–192.
- Sutherland, M.K., Somerville, M.J., Young, L.K., Bergeron, C., Haussler, M.R., McLachlan, D.R., 1992. Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 13, 239–250.

- Taniura, H., Ito, M., Sanada, N., Kuramoto, N., Ohno, Y., Nakamichi, N., Yoneda, Y., 2006. Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 83, 1179–1189.
- Tjiattas, L., Ortiz, D.O., Dhivant, S., Mitton, K., Rogers, E., Shea, T.B., 2004. Folate deficiency and homocysteine induce toxicity in cultured dorsal root ganglion neurons via cytosolic calcium accumulation. *Aging Cell* 3, 71–76.
- Tukaj, C., Trzonkowski, P., Pikula, M., Hallmann, A., Tukaj, S., 2010. Increased migratory properties of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 208–211.
- Tyagi, S.C., 1998. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am. J. Physiol* 274, C396–405.
- Veenstra, T.D., Prufer, K., Koenigsberger, C., Brimijoin, S.W., Grande, J.P., Kumar, R., 1998. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo. *Brain Res.* 804, 193–205.
- Vieth, R., 2006. What is the optimal vitamin D status for health? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92, 26–32.
- Wang, J.Y., Wu, J.N., Cherng, T.L., Hoffer, B.J., Chen, H.H., Borlongan, C.V., Wang, Y., 2001. Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res.* 904, 67–75.
- Welch, G.N., Upchurch Jr., G.R., Farivar, R.S., Pigazzi, A., Vu, K., Brecher, P., Keaney Jr., J.F., Loscalzo, J., 1998. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110, 22–31.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–333.
- White, A.R., Huang, X., Jobling, M.F., Barrow, C.J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Bush, A.I., Cappai, R., 2001. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J. Neurochem.* 76, 1509–1520.
- Wyse, A.T., Streck, E.L., Barros, S.V., Brusque, A.M., Zugno, A.J., Wajner, M., 2000. Methylmalonate administration decreases Na⁺/K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11, 2331–2334.

Homocysteine induces glial reactivity in adult rat astrocyte cultures

Aline Longoni¹, Bruna Bellaver¹, Larissa Daniele Bobermin¹, Camila Leite Santos¹, Yasmine Nonose¹, Janaina Kolling¹, Tiago M. dos Santos¹, Adriano M de Assis¹, André Quincozes-Santos^{1, 2, *}, Angela TS Wyse^{1, 2}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brasil;

² Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brasil.

*Corresponding author:

André Quincozes-Santos, Ph.D.

Departamento de Bioquímica

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo

Bairro Santa Cecília

90035 –003 Porto Alegre, RS, Brazil

Fax: +55 51 3308 5535; Phone: +55 51 3308 5567

E-mail: andrequincozes@ufrgs.br

Periódico:

Status: a ser submetido

IV. DISCUSSÃO

A HHcy é caracterizada pelo acúmulo de Hcy na circulação e vem sendo considerada um fator de risco para doenças cardiovasculares e cerebrais. Acredita-se que, cerca de 7% da população apresenta HHcy, uma vez que essa condição pode ser causada por diversos fatores, como, deficiências nutricionais, medicamentos, doenças renais e envelhecimento (Aksoy et al., 2006; Castro et al., 2006; Selhub, 2006; Troen et al., 2008).

Desta forma, o principal objetivo desse trabalho foi estabelecer dois modelos experimentais de HHcy leve em fatias de tecidos e em cultura primária de ratos adultos. A concentração e o tempo de incubação foram escolhidos com objetivo de induzir uma concentração de Hcy semelhante aquelas consideradas fator de risco para o desenvolvimento de doenças cerebrais e cardíacas em humanos. Analisamos também diferentes doses de vitamina D, a fim de estabelecer a melhor dose terapêutica para tentar prevenir os efeitos tóxicos da Hcy.

4.1. Experimentos em fatias com vitamina D (coração e córtex)

Níveis elevados de Hcy tem sido observados em muitas condições médicas, incluindo vários distúrbios neurológicos e cardiovasculares. A patogênese da Hcy atrai a atenção de diversos pesquisadores, simplesmente porque a intervenção precoce normalizando os níveis de Hcy pode ser benéfica para esses pacientes, prevenindo assim a toxicidade do mesmo. Entretanto, estudos clínicos demonstraram conclusões inconsistentes sobre os mecanismos de ação da Hcy (Zhu et al. 2007; Ansari et al., 2014). Utilizando um modelo experimental de incubação de HHcy leve analisamos em fatias de coração de ratos adultos parâmetros como estresse oxidativo, função mitocondrial, parâmetros bioenergéticos, bem como o imunoconteúdo de

enzimas antioxidantes e receptores de vitamina D (VDR). Embora diversos estudos demonstrem a correlação entre os níveis de Hcy e os riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Eikelboom et al., 1999; De Bree et al., 2002; Cacciapuoti, 2011) não existe uma estratégia terapêutica eficaz. Simultaneamente testamos os efeitos protetores do calcitriol, utilizando o modelo *ex vivo* envolvendo a incubação de fatias com Hcy em um pré-tratamento com o calcitriol. Porém, já está bem estabelecido que o acúmulo de Hcy no coração pode estar associado ao metabolismo mais lento, devido à deficiência na via de transulfuração, pela ausência da enzima CBS, gerando assim uma via de transulfuração incompleta (Finkelstein, 1998).

A fosforilação oxidativa mitocondrial gera radicais livres e os complexos da cadeia de transporte de elétrons são vulneráveis a esses radicais livres (Dudkina et al., 2008; da Cunha et al., 2013). Citocromo c oxidase é um marcador de fosforilação oxidativa, na cadeia respiratória, que catalisa um passo limitante na transferência de elétrons ao oxigênio molecular (Beal, 1992). Portanto, a inibição desta enzima pode conduzir a redução incompleta do oxigênio e, conseqüentemente, ao aumento da formação de radicais livres (Bose et al., 1992). A fim de elucidar como a Hcy influencia o funcionamento da cadeia respiratória, nós examinamos as atividades da SDH, complexo II e citocromo c oxidase. Nossos resultados mostraram que a Hcy reduz a atividade dessas enzimas, sugerindo que em baixa concentração esse aminoácido pode comprometer o metabolismo energético. O calcitriol foi capaz de reverter esses efeitos.

As disfunções mitocondriais ocorrem principalmente em função de alterações no potencial e na massa mitocondrial (Distelmaier et al., 2008). Para

saber se a disfunção na atividade da cadeia respiratória foi devida a alterações mitocondriais, nós resolvemos avaliar o potencial e a massa mitocondrial por citometria de fluxo utilizando fluoróforos mitocondriais. Observamos que a Hcy induziu uma elevação na massa mitocondrial, mas este efeito não foi acompanhado por alterações no potencial mitocondrial. A transferência de elétrons através dos quatro complexos de proteína são acompanhadas por bombas de prótons da matriz para o espaço intermembrana, ocorrendo a formação de um gradiente eletroquímico, que corresponde ao potencial de membrana. Este potencial pode ser considerado um indicador importante da função mitocondrial e da atividade metabólica. Alterações nesse parâmetro pode levar a uma alteração substancial na homeostase energética celular (Solaini et al., 2007; Distelmaier et al., 2008). Além do que foi exposto, temos ainda que, o calcitriol foi capaz de prevenir estes efeitos.

Uma vez que a disfunção mitocondrial pode levar à formação de espécies reativas e/ou induzir o estresse oxidativo, investigamos o efeito da Hcy sobre alguns parâmetros do estado redox em fatias de coração. Em diversos estudos já realizados, foi encontrado que este aminoácido promove um aumento na peroxidação de lipídios e na produção de ERO, bem como danos às proteínas, o qual é indicado por uma elevação no conteúdo de carbonilas e uma redução do teor de tióis (Malinow, 1990; Hogg, 1999; Cavalca et al., 2001). Os miócitos cardíacos, células endoteliais, fibroblastos e músculos vasculares são fonte celular de produção de ERO. Além disso, é bem documentado que o miocárdio tem sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos endógenos que neutralizam essas ERO geradas pelo metabolismo celular.

As principais fontes de espécies reativas de oxigênio no infarto agudo do miocárdio são a cadeia de transportadora de elétrons mitocondrial, a NADPH-oxidase e/ou auto-oxidação de muitas substâncias, tais como Hcy (Misra et al., 2009). Diante disso, investigamos se as defesas antioxidantes estavam ativas no tecido cardíaco. Observamos que a Hcy causou uma diminuição nas atividades da SOD, CAT e GPX, bem como no imunoconteúdo da SOD e da CAT. Estes resultados sugerem que a Hcy promoveu um desequilíbrio oxidativo em fatias de coração de ratos, o que significa que o sistema antioxidante não foi eficaz de manter o equilíbrio oxidativo. Além disso, verificamos que o calcitriol preveniu o efeito da Hcy sobre as ERO, dano aos lipídeos e às proteínas, além de recuperar a atividades das enzimas antioxidantes e impedir a redução do imunoconteúdo dessas.

A participação do VDR mediando os efeitos cardioprotetores do calcitriol ainda é controversa na literatura (Nigwekar e Thadhani, 2013). Além disso, neste trabalho encontramos um efeito cardioprotetor do calcitriol, mas a modulação intracelular desta substância não parece ser através de VDR, porque não houve diferença no imunoconteúdo da proteína após o pré-tratamento com calcitriol. Interessantemente, o calcitriol não alterou o imunoconteúdo das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), mas impediu a diminuição da atividade dessas enzimas. Assim, levando em consideração o modelo experimental deste estudo e os relatos encontrados na literatura (Kono et al., 2013; Wang et al., 2013), esses resultados apontam para ações benéficas do calcitriol, provavelmente promovidas por um resultado antioxidante inibindo a sinalização pró-oxidante, sem o envolvimento da expressão do VDR.

Considerando, I) os efeitos cardioprotetores da vitamina D frente aos insultos provocados pela Hcy; II) que esses efeitos não foram mediados através dos VDR, buscamos na literatura uma explicação plausível e sugerimos duas hipóteses: (1) onde esse efeito cardioprotetor foi promovido pelo coração e não pela vitamina D, insinuando que o coração foi capaz de se adaptar aos insultos promovidos pela Hcy. Concordando com essa hipótese, Nishizawa et al., 1999 demonstrou que o coração desenvolve mecanismos de adaptação em um aumento de espécies reativas; (2) que a vitamina D possa estar protegendo o coração através de um mecanismo de ação, relacionado com a inibição de γ -glutamil transpeptidase, que é a enzima chave do metabolismo da glutathione, aumentando as defesas antioxidantes, por um aumento de glutathione e assim ocorrendo uma diminuição do ERO, exercendo um efeito protetor diante os danos causados pela Hcy. Este efeito está bem estabelecido em outro órgão de acordo com o Kalueff et al., 2004.

Empregando este mesmo modelo experimental avaliamos parâmetros de metabolismo energético, funções mitocondriais e estresse oxidativo em fatias de córtex cerebral de ratos. Posteriormente, analisamos a melhor dose de vitamina D que atue prevenindo os efeitos deletérios da Hcy. Primeiramente, demonstramos que a Hcy prejudica o metabolismo energético, diminui a atividade das enzimas da cadeia respiratória, como a SDH e a COX, aumenta a morte neuronal e induz o desequilíbrio oxidativo, aumentando as ERO, a lipoperoxidação e o dano às proteínas. Esses achados mostram dados similares a estudos anteriores onde a Hcy, sofrendo auto-oxidação, gera homocistina, dissulfetos mistos e ERO (Baydas et al., 2006). Em relação às enzimas antioxidantes, observamos uma diminuição na atividade da SOD, CAT

e GPx, o que promove um desequilíbrio entre elas, uma vez que a SOD atua sobre o radical O_2^- . dismutando essa molécula em H_2O_2 , que pode ser decomposta pela CAT ou GPx e assim, a ação coordenada dessas enzimas é capaz de detoxificar as espécies reativas. Além disso, o pré tratamento com calcitriol (50nM) atenuou os efeitos deletérios induzidos pela Hcy, provavelmente através da ativação de VDR, promovendo a regulação da atividade da CBS, de forma similar aos experimentos do coração.

O metabolismo energético cerebral é muito importante para todas as funções em diferentes células neuronais. Vários estudos têm demonstrado que a Hcy prejudica a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, da acetilcolinesterase e das enzimas da cadeia transportadora de elétrons. A toxicidade da Hcy no SNC tem sido extensivamente descrita, afetando tanto a sobrevivência neural, como a capacidade dos neurônios de transmitir sinais e de formar redes neurais funcionais. Nossos resultados mostram uma inibição da SDH e da COX, dessa forma, a transferência de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória fica diminuída e com isso seguramente a transferência de energia para formar ATP é reduzida.

O cérebro necessita de fornecimento contínuo de oxigênio e de glicose para manter seu funcionamento adequado, assim como várias funções celulares são dependentes de energia. Então quando ocorre uma redução a níveis críticos, uma cascata é ativada, desencadeada por uma depleção de ATP (Moro et al., 2005). Uma diminuição na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase e alterações nessa enzima podem induzir danos importantes na função cerebral, já que ela é fundamental para a atividade neural e para a captação de neurotransmissores (Blanco, 2005).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstram que a Hcy inibe diretamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral (Scherer et al., 2013). A redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela HHcy leve foi ocasionada provavelmente por estresse oxidativo, uma vez que em outros trabalhos do nosso grupo mostram que agentes antioxidantes preveniram a diminuição de Na^+, K^+ -ATPase em encéfalo de ratos submetidos à HHcy severa. Contudo, podemos sugerir que a inibição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela HHcy leve pode estar associada com a peroxidação lipídica, uma vez que essa enzima está inserida na membrana plasmática e assim qualquer alteração nesse microambiente pode prejudicar o seu funcionamento. Nossos achados demonstram que o calcitriol foi eficaz em prevenir a inibição da Na^+, K^+ -ATPase causada pela Hcy. Um efeito protetor do calcitriol na atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi previamente descrito por Cross e Peterlik (1983) em tecidos periféricos, mostrou que a Hcy e a vitamina D se comportam de maneira similar, tanto no córtex como no coração de ratos.

A integridade funcional das mitocôndrias é essencial para sobrevivência celular (Snow et al., 2003). Encontramos no nosso trabalho que a Hcy promove um aumento na morte neuronal, mas não afeta a reatividade glial. Além disso, demonstramos que o pré tratamento com calcitriol (50 nM) previne a morte neuronal, do modo similar a incubação do coração. De acordo com este resultado, outro estudo (Jang et al., 2014) mostrou que em concentrações mais baixas a 1,25 dihidroxivitamina D3 atua como neuroprotetora contra insultos excitotóxicos em cultura primária de hipocampo de ratos.

Várias hipóteses relativas aos efeitos neurotóxicos da Hcy tem sido propostas, e o estresse oxidativo é central para todas. Estas hipóteses estão

de acordo com estudos, que mostraram que durante a auto-oxidação da Hcy, espécies reativas geradas, são prejudiciais para a maioria dos componentes celulares. Verificamos que a incubação com Hcy em fatias de córtex cerebral induziu um aumento na produção de espécies reativas, peroxidação lipídica e no dano às proteínas. Corroborando, as lipoproteínas plasmáticas presentes nas membranas são essencialmente vulneráveis aos ataques de espécies reativas, que também prejudicam funções como transporte, permeabilidade, fluidez e atividade de enzimas (Gutteridge, 2001; Swapna et al., 2006). As defesas antioxidantes enzimáticas também foram investigadas. A Hcy foi capaz de diminuir a atividade das enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e GPx, demonstrando um desequilíbrio. O acúmulo de H_2O_2 , causado por esse desequilíbrio enzimático, pode reagir com metais de transição pela reação de Fenton e Haber-Weiss, formando o radical $OH\cdot$, que é um potente indutor de lipoperoxidação (Halliwell e Whiteman, 2004).

O pré tratamento com calcitriol (50 nM) foi capaz de evitar as alterações do estado redox. Embora o mecanismo da ação neuroprotetora do calcitriol não estar descrito na literatura, um trabalho utilizando linhagem celular, SH-SY5Y, mostra que a 1,25 dihidroxivitamina D_3 reverte os efeitos neurotóxicos da rotenona, melhorando as vias de sinalização relacionadas com a autofagia. Além disso, sabe-se que o calcitriol desempenha um importante papel fisiológico no SNC de roedores e humanos. Essa afirmação é feita com base no fato de que o VDR e a enzima responsável pela formação do calcitriol, a forma ativa da vitamina D, está expresso em todas as regiões do cérebro. O receptor de vitamina D e a enzima 1α -hidroxilase foram encontrados tanto em

neurônios como em células gliais (Veenstra et al., 1998; Prufer et al., 1999; Eyles et al., 2005).

Observamos em nosso estudo, que o pré tratamento com o calcitriol aumentou os níveis do receptor de vitamina D apenas quando o calcitriol foi usado na concentração de 50 nM e 100 nM, que são as mesmas concentrações que proporcionam um efeito neuroprotetor, e esses resultados foram contrários aos resultados encontrados neste trabalho em fatias de coração. De acordo com os nossos resultados, um estudo realizado por Kriebitzsch et al., (2011) investigou a LASA, estudo de base populacional humana com 1264 pessoas, com idade entre 65 e 88 anos, onde foi encontrado uma correlação entre os níveis de Hcy e os níveis de 25-hidroxivitamina D₃ no plasma. Foram observados níveis mais baixos de Hcy, quando os níveis de 25-dihidroxivitamina D₃ encontravam-se entre 50 e 60 nM (20-24 ng/mL), que é a mesma dose que promoveu efeito neuroprotetor contra a toxicidade da Hcy. No mesmo estudo, os autores propuseram que a 1,25-dihidroxivitamina D₃ promove um aumento nos níveis de mRNA da CBS e que o VDR funcional é necessário para este processo acontecer. Podemos ressaltar dessa forma, que os efeitos benéficos do calcitriol demonstrados neste estudo são mediados pelo VDR e pela super regulação da expressão de alguns genes.

4.2. Experimentos em cultura de astrócito

No último capítulo dessa tese, resolvemos investigar os mecanismos neurotóxicos da Hcy, pois estes efeitos sobre os astrócitos e seus mecanismos

ainda permanecem obscuros e precisam ser melhor esclarecidos (Minagar et al., 2002; Szadejko et al., 2013). Atualmente, sabe-se que a Hcy está associada com doenças neurodegenerativas, desta forma a cultura de astrócitos adultos pode contribuir para a compreensão do papel da Hcy e a funcionalidade glial nestas doenças (Sudduth et al., 2013; Bonetti et al., 2016).

Com base nestas hipóteses, culturas de astrócitos foram tratadas com Hcy e foram analisadas as respostas antioxidante e inflamatória, bem como as vias envolvidas nestes mecanismos. Observamos no presente trabalho que, nos astrócitos a Hcy aumenta a atividade transcricional do NF κ B promovendo uma diminuição das defesas celulares (SOD, GPx e GSH) e ativando a liberação de citocinas pró-inflamatórias; como resultado destes efeitos podemos observar alterações na reatividade glial.

Estudos anteriores demonstram que a Hcy promove uma diminuição nas atividades enzimáticas antioxidantes (SOD e GPx) e um aumento na morte neuronal em fatias de córtex cerebral, fornecendo evidências de que essa estrutura cerebral é suscetível a danos causados pela Hcy (Longoni et al., 2015). Existem várias hipóteses relativas aos efeitos neurotóxicos da Hcy relacionados ao estresse oxidativo, devido a sua auto-oxidação que promove um desequilíbrio na atividade das enzimas antioxidantes (Hogg, 1999). Nossos achados corroboram com a literatura, mostrando que o tratamento das células com Hcy causa uma diminuição significativa na atividade da SOD e da GPx. A diminuição da atividade enzimática da SOD e da GPx demonstra claramente que as ERO podem se acumular, causando danos às macromoléculas de ativação das vias de sinalização como a do NF κ B podendo conduzir a alterações morfológicas, assim como nós observamos. As células expostas à

Hcy apresentaram uma desorganização das fibras de estresse indicando um rearranjo de filamentos de actina, disfunção energética e finalmente morte celular, assim como os resultados de córtex cerebral.

O funcionamento adequado da enzima Na^+, K^+ -ATPase é muito importante para o processo fisiológico em que as células são dependentes de concentrações dos íons Na^+ e K^+ (Aperia et al., 2007). Em células astrogliais, essa enzima é especialmente importante e sensível aos radicais livres, uma vez que o aumento da produção de ERO levam ao seu funcionamento inadequado (Grisar et al., 1992; Chakraborty et al., 2003; Quincozes-santos et al., 2014). No presente trabalho, o tratamento com Hcy mostrou diminuir a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, corroborando com estudo realizado por (Schulpis et al, 2006). Não podemos excluir a idéia de que a Na^+, K^+ -ATPase é um regulador potente de mudanças astrocíticas, em função do seu papel na excitabilidade cerebral (Sastry e Phillis, 1977) e no metabolismo energético (Mata et al., 1980). Além disso, em nosso estudo existe a possibilidade de ter ocorrido uma deficiência energética celular causada pela Hcy, pois esta enzima necessita de uma alta demanda energética para a sua atividade.

A GSH também é um regulador importante do estado redox intracelular, sendo que sua depleção esta associada com a neurotoxicidade, e a sua produção pode ser regulada por HO-1, uma via de sinalização das defesas antioxidantes (Steele et al., 2013; Brennan et al., 2015). Nosso resultados mostram que, a Hcy diminuiu os níveis de GSH e o imunoconteúdo de HO-1 no córtex cerebral, de forma dose dependente, o que sugere que a Hcy compromete as defesas celulares contra o dano de ERO. A isoforma induzível da heme oxigenasse, HO-1, é uma enzima de fase 2, regulada em resposta ao

estresse oxidativo, inflamação e lesão celular (Syapin, 2008). Esta pesquisa é a primeira que relaciona os efeitos da Hcy com HO-1 em astrócitos. Outros estudos em tecidos periféricos demonstraram que Hcy promove uma regulação negativa na expressão da HO-1 (Tan et al., 2013; Luo et al., 2014). A HO-1 é induzida como um mecanismo de proteção, como as enzimas antioxidantes, para proteger contra danos oxidativos dos lipídeos, proteínas e nucleoproteínas (Takahashi et al., 2004). Corroborando com esses resultados, mostramos que o tratamento de cultura primária de astrócitos com Hcy (30 mM e 100 mM) por 24 h promoveu uma diminuição no imunoconteúdo de HO-1.

Como descrito anteriormente, a diminuição da GSH está bem relacionada com a neurotoxicidade e a neuroinflamação. Essa diminuição do conteúdo de GSH em astrócitos favorece a resposta inflamatória, já que um estado pró oxidante ativa várias vias de sinalização que participam da síntese e liberação de citocinas pro inflamatórias (Lee et al., 2010; Currais e Maher, 2013). A Hcy e a resposta inflamatória parecem estar associados com a demência vascular (Lazzerini et al., 2007; Sudduth et al., 2013). O TNF- α executa muitas funções no SNC, além de iniciar uma cascata de ativações de citocinas como a IL-1 β , como a IL-6 (Tanabe et al., 2010). Os nossos dados mostraram que o tratamento com Hcy promoveu um aumento nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 de astrócitos de córtex cerebral de adultos, mostrando ser dose dependente. De acordo com nossos resultados, Scherer et al., 2014 demonstraram que no modelo *in vivo* de HHcy leve em ratos, a Hcy promove um aumento no TNF- α , IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral. Similarmente, uma pesquisa utilizando um modelo de administração aguda de Hcy em ratos, demonstrou um aumento nos mesmos marcadores inflamatórios no córtex

cerebral (da Cunha et al., 2010). Vários estudos têm mostrado que os astrócitos podem responder aos diferentes agentes, tais como amônia, glutamato, radicais livres, ativando a liberação de citocinas pró-inflamatórias e este mecanismo é regulado por proteínas de sinalização via NFκB (Soliman et al., 2012; Santos et al., 2015).

A partir de nossos resultados, podemos supor que o fator chave para a ativação da liberação de citocinas foi o desequilíbrio redox. Em um grande estudo clínico, Gori et al., (2005) analisou mais de mil pacientes em 2 pequenas cidades perto de Florença, Itália, e demonstraram que as concentrações circulantes elevadas de IL-1 e IL-6 estão correlacionados a com a condição de HHcy moderada.

O NFκB é um fator de transcrição responsável pela ativação de inúmeros genes em respostas a danos no SNC (Jones e Thomsen, 2013). No citoplasma, o NFκB, heterodímero p50/p65 são inativados através da ligação de proteínas para IκB, e as citocinas exercem um efeito oposto através da ativação da fosforilação de proteínas inibidoras IKKS e sua degradação, permitindo a translocação do NFκB para o núcleo e assim se ligando a sequências específicas (Abraham, 2000). De acordo com os nossos resultados, a atividade de NFκB é aumentada pelo tratamento com Hcy em cultura primária de astrócitos, de forma dose dependente, indicando que uma resposta aos danos por via de NFκB foi desencadeada. Neste contexto, nós observamos que Hcy induz uma depleção de todos os agentes de proteção, como as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas e HO-1, esta redução pode estar correlacionada com o aumento do NFκB e citocinas pró-inflamatórias.

Sabendo da importância do uso de modelos experimentais para investigar mecanismos envolvidos em doenças humanas e novos alvos terapêuticos preventivos, destacamos a relevância do estabelecimento dos modelos utilizados na presente tese para estudar alterações teciduais causadas pela Hcy.

Em conjunto, os resultados desta tese demonstraram que a Hcy induz alterações no metabolismo energético, como disfunção mitocondrial, desequilíbrio no estado redox e inflamatório central e periférico, prejudicando a funcionalidade de importantes enzimas, e morte celular. Observamos que o calcitriol consegue prevenir muitos desses efeitos nocivos da Hcy via VDR e por ações antioxidantes. Desta forma, considerando que a HHcy leve é tipo mais prevalente na população e é considerada um fator de risco para doenças cardiovasculares e cerebrais, os presentes modelos experimentais podem ser úteis para maiores investigações dessas doenças e seus mecanismos, além de elucidar estratégias protetoras da vitamina D, prevenindo os efeitos deletérios da Hcy, podendo ser considerada como um possível adjuvante terapêutico.

IV. CONCLUSÕES

Nossos estudos, usando um modelo com concentrações de Hcy mostraram que a Hcy causou os seguintes efeitos:

a) alterações na função mitocondrial e no estado redox em fatias de coração, o que pode estar relacionado com complicações cardiovasculares. O calcitriol foi capaz de reverter essas alterações, protegendo contra a maioria dos efeitos da Hcy. Ressaltando que nosso estudo é o primeiro a analisar o efeito de Hcy em combinação com pré-tratamento de calcitriol no modelo agudo de fatias coração. Certamente, mais estudos ainda são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais o calcitriol age.

b) alterações no metabolismo energético, a morte celular e o estado redox em cortex cerebral. Neste modelo *ex vivo* mostramos que o calcitriol atua como uma substância protetora, evitando essas alterações, sugerindo que o calcitriol pode ser um novo alvo para terapias destinadas a prevenir os efeitos deletérios de toxicidade da Hcy em concentrações leves.

c) alterações em astrócitos levando a um desequilíbrio no estado redox, diminuição nas defesas celulares (antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos), ativando NFkB, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, causando um déficit energético e alterações morfológicas via HO-1. Estes resultados contribuem para a compreensão da fisiopatologia da HHcy leve e moderada indicando um possível mecanismo para ser explorado na busca de um alvo terapêutico.

V. PERSPECTIVAS

1. Investigar por qual mecanismo a vitamina D exerce efeito neuro e cardio protetor;
2. Compreender o efeito da vitamina D em cultura de astrócitos expostos a Hcy;
3. Avaliar o efeito da Hcy em outros tecido cerebrais, hipocampo, bem como o efeito neuroprotetor da vitamina D;
4. Realizar um tratamento *in vivo* em modelo experimental de Hcy, testando o possível efeito protetor da vitamina D, bem como realizar cultura de astrócitos adultos destes mesmod animais.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbracchio M. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacological Reviews*. 2006;58(3):281-341.

Abraham E. NF- κ B activation. *Critical Care Medicine*. 2000;28(Supplement):N100-N104.

Adinolfi L, Ingrosso D, Cesaro G, Cimmino A, D'Antò M, Capasso R et al. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2005;41(5):995-1003.

Ajith TRanimenon. Homocysteine in ocular diseases. *Clinica Chimica Acta*. 2015;450:316-321.

Aksoy M, Basar Y, Salmayenli N, Ayalp K, Genc F A, Dilege S, Kayabali M, Baktiroglu S, Kurtoglu M. Hyperhomocysteinemia in patients with arterial occlusive disease. *Surg Today*. 2006; 36,327-31.

Alcama E, Hacohen N, Schulte L, Rennert P, Hynes R, Baltimore D. Requirement for the NF- κ B Family Member RelA in the Development of Secondary Lymphoid Organs. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(2):233-244.

Allaman I, Bélanger M, Magistretti P. Astrocyte–neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in Neurosciences*. 2011;34(2):76-87.

Ansari R, Mahta A, Mallack E, Luo JJ. Hyperhomocysteinemia and Neurologic Disorders: a Review. *J Clin Neurol*. 2014; 281-288.

APERIA et al, 2007 --- Na K ATPase astrocytos

Banecka-Majkutewicz Z, Sawula W, Kadzinski L, Wegrzyn A, Banecki B. Homocysteine, Heat Shock Proteins, Genistein And Vitamins In Ischemic Stroke--Pathogenic And Therapeutic Implications. *Homocysteine, Heat Shock Proteins, Genistein And Vitamins In Ischemic Stroke--Pathogenic And Therapeutic Implications. Acta Biochim* . 2012; 59, 495-499.

Banerjee A, Khemka VK, Ganguly A, Roy D, Ganguly U and Chakrabarti. Vitamin D and Alzheimer's Disease: Neurocognition to Therapeutics. *Int. J of Alzheimer's Dis.* 2015; 192747,11.

Baydas G, Ozer M, Yasar A, Koz S, Tuzcu M. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochemistry (Moscow).* 2006;71(S1):S91-S95.

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol.* 1992;31:119-30.

Benarroch E. Na⁺, K⁺-ATPase: Functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology.* 2011;76(3):287-293.

Birben E, Sahiner U.M, Sackesen C, Erzurum S, And Kalayci O. Oxidative stress and antioxidante defense. 2012. *WOA Journal.*

Blaise S, Nédélec E, Schroeder H, Alberto J, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant J et al. Gestational Vitamin B Deficiency Leads to Homocysteine-Associated Brain Apoptosis and Alters Neurobehavioral Development in Rats. *The American Journal of Pathology.* 2007;170(2):667-679.

Blanco G, Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 1998; 275, F633-50.

Bonetti F, Brombo G, Zuliani G. The relationship between hyperhomocysteinemia and neurodegeneration. *Neurodegenerative Disease Management.* 2016;6(2):133-145.

Bose R, Schnell CL, Pinsky C, Zitko V. Effects of excitotoxins on free radical indices in mouse brain. *Toxicol Lett.* 1992;60:211-9.

Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2005;29(7):1103-1112.

Brennan M, Matos M, Li B, Hronowski X, Gao B, Juhasz P et al. Dimethyl Fumarate and Monoethyl Fumarate Exhibit Differential Effects on KEAP1, NRF2 Activation, and Glutathione Depletion In Vitro. *PLOS ONE.* 2015;10(3):e0120254.

Cacciapuoti F. Hyper-homocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases? Pathogenetic and therapeutical uncertainties. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;32:82-8.

Cao W. Stimulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor Expression in Endometrial Stromal Cells by Interleukin 1, beta Involving the Nuclear Transcription Factor NF B. *Biology of Reproduction*. 2005;73(3):565-570.

Carocho MFerreira I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;51:15-25.

Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de almeida I. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: an overview. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29,3-20.

Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C, De Franceschi M, Belardinelli R and Guazzi MD. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clinical Chemistry*. 2001; 47:887-892.

Chakraborty H, Sen P, Sur A, Chatterjee U, Chakrabarti S. Age-related oxidative inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Experimental Gerontology*. 2003;38(6):705-710.

Chen Z. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(5):433-443.

Colton C. Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2009;4(4):399-418.

Cross HS, Peterlik M. Vitamin D stimulates (Na⁺⁺K⁺)-ATPase activity in chick small intestine. *FEBS Lett*. 1983; 153,141-145.

Currais AMaher P. Functional Consequences of Age-Dependent Changes in Glutathione Status in the Brain. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;19(8):813-822.

da Cunha A, Ferreira A, da Cunha M, Pederzoli C, Becker D, Coelho J et al. Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2011;358(1-2):153-160.

da Cunha A, Ferreira A, Loureiro S, da Cunha M, Schmitz F, Netto C et al. Chronic Hyperhomocysteinemia Increases Inflammatory Markers in Hippocampus and Serum of Rats. *Neurochem Res*. 2012;37(8):1660-1669.

da Cunha A, Ferreira A, Wyse A. Increased inflammatory markers in brain and blood of rats subjected to acute homocysteine administration. *Metabolic Brain Disease*. 2010;25(2):199-206.

da Cunha MJ, da Cunha AA, Ferreira GK, Baladao ME, Savio LE, Reichel CL, et al. The effect of exercise on the oxidative stress induced by experimental lung injury. *Life Sci*. 2013;92:218-27.

Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, Boger R, Sigmund C, Faraci F et al. Cerebral Vascular Dysfunction Mediated by Superoxide in Hyperhomocysteinemic Mice. *Stroke*. 2004;35(8):1957-1962.

De Bree A. Homocysteine Determinants and the Evidence to What Extent Homocysteine Determines the Risk of Coronary Heart Disease. *Pharmacological Reviews*. 2002;54(4):599-618.

Den H. M, Lewwington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost*. 2005;3(2):292-299.

Distelmaier F, Koopman WJ, Testa ER, de Jong AS, Swarts HG, Mayatepek E, et al. Life cell quantification of mitochondrial membrane potential at the single organelle level. *Cytometry A*. 2008;73:129-38.

Doré S, Sampei K, Goto S, Alkayed NJ, Gustella D, Blackshaw S, Gallagher M, Traystman RT, Hurn PD, Koehler RC, Snyder SH. Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Mol. Med. Camb. Mass*. 1999; 656-663.

dos Santos E, Busanello E, Miglioranza A, Zanatta Â, Barchak A, Vargas C et al. Evidence that folic acid deficiency is a major determinant of hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *Metabolic Brain Disease*. 2009;24(2):257-269.

Dougherty KA, Dilissio MF, Agrawal DK. Vitamin D and the immunomodulation of rotator cuff injury. *Journal of inflammation research*. 2016; 123-131.

Dudkina NV, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40:419-24.

Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Jr., Hankey G and Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med*. 1999;131:363-75.

Eliades M, Spyrou E. Vitamin D: A new player in non-alcoholic fatty liver disease? *World Journal of Gastroenterology*. 2015; 1718-1727.

Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J. Chem. Neuroanat*. 2005; 29, 21-30.

Faraci F, Lentz S.R. Hyperhomocysteinemia, Oxidative Stress, And Cerebral Vascular Dysfunction. *Stroke*. 2004; 35, 345-347.

Ferreira A, Stefanello F, Cunha A, da Cunha M, Pereira T, Bonan C et al. Role of antioxidants on Na⁺,K⁺-ATPase activity and gene expression in cerebral cortex of hyperprolinemic rats. *Metabolic Brain Disease*. 2011;26(2):141-147.

Finkelstein J. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. 2007;45(12).

Finkelstein Y, Markowitz ME, Rosen JF. Low-Level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Research Reviews*. 1998; 168-176.

Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W et al. Unravelling the complexities of the NF-κB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*. 2006;25(51):6781-6799.

Gezen-Ak D, Dursun E., and Yilmazer S. "Vitamin D inquiry

Goldsmith JR. Vitamin D as an immunomodulators: risks with deficiencies and benefits of supplementation. *Healthcare*. 2015; 219-232.

GORI et al., 2005 interleucinas HHcy

Gozzelino R, Jeney V, Soares M. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50(1):323-354.

Grisar T, Guillaume D, Delgado-Escuet A. Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Research*. 1992;12(2):141-149.

Gutowski M, Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim Pol*. 2013; 60(1):1-16.

Gutteridge, 2001 – Gutteridge, J.M.C., 2001. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Vol. Fourth, Oxford University Press. New York.

Haines D, Lekli I, Teissier P, Bak I, Tosaki A. Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders. *Acta Physiologica*. 2012;204(4):487-501.

Halliwell B, Gutteridge J.M.C. *Free Radicals In Biology And Medicine*. Oxford University, New York. 2007.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 2007;35:1147-1150.

Halliwell, B, Whiteman, M. 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*. 2004; 142, 231-255.

Hamelet J, Maurin N, Fulchiron R, Delabar J, Janel N. Mice lacking cystathionine beta synthase have lung fibrosis and air space enlargement. *Experimental and Molecular Pathology*. 2007;83(2):249-253.

Hayden M, Ghosh S. NF- B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & Development*. 2012;26(3):203-234.

Ho P, Collins S, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E et al. Homocysteine potentiates β -amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*. 2001;78(2):249-253.

Hogg N. The effect of cyst(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(1-2):28-33.

Hohsfield A, Humpel C.L. Homocysteine Enhances Transmigration of Rat Monocytes through a Brain Capillary Endothelial Cell Monolayer via ICAM-1. *CNR*. 2010;7(3):192-200.

Huang C.R., Chang W.N, Tsai, N.W, Lu C.H. Serial Nerve Conduction Studies In Vitamin B12 Deficiency-Associated Polyneuropathy. *Neurological Sciences*. 2011; 32: 183–186.

Huotari A, Herzig KH. Vitamin D and living northern latitudes-an endemic risk área for vitamin D deficiency. *Int. J Circumpolar Health*. 2008; 164-78

Jang W, Kim HJ, Li H, Jo KD, Lee MK, Song SH, et al. 1,25-Dyhydroxyvitamin D(3) attenuates rotenone-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through induction of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451:142-7.in hippocampal neurons: consequences of vitamin D-VDR pathway disruption on calcium channel and the vitamin D requirement,"*Neurological Sciences*. 2013; 1453–1458.

Jiang H, Wang X, Fang L, Tang C, Zhu Y, Wang X. Upregulation of aldose reductase by homocysteine in type II alveolar epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;337(4):1084-1091.

Jones K, Thomsen C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2013;53:52-62.

Julve, J, Errico, T.L, Chen, X, Santos, D, Freixa, J, Porcel, I, Cubero, E, Escola-Gil, J.C, Blanco-Vaca, F. Alterations In The Protein Content And Dysfunction Of High-Density Lipoproteins From Hyperhomocysteinemic Mice. *Clin Investig Arterioscler*. 2013; 25, 164-173.

Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF- κ B in the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2005;1745(3):287-299.

Kalueff A, Eremin K, Tuohimaa P. Mechanisms of Neuroprotective Action of Vitamin D 3. *Biochemistry (Moscow)*. 2004;69(7):738-741.

Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Karras S*,

Rapti E, Matsoukas S, Kotsa K. Vitamina D in fibromyalgia: A causative or confounding biological interplay? *Nutrients*. 2016;8, 343.

Karras S, Rapti E, Matsoukas S and Kotsa K. Vitamin D in Fibromyalgia: A Causative or Confounding Biological Interplay? *Nutrients*. 2016; 8, 343.

Khanal G, Chung K, Solis-Wever X, Johnson B, Pappas D. Ischemia/reperfusion injury of primary porcine cardiomyocytes in a low-shear microfluidic culture and analysis device. *The Analyst*. 2011;136(17):3519.

Kimmie Ng. Vitamin D for prevention and treatment of colorectal cancer: What is the evidence? *NIH-PA*. 2014; 339-345.

Kirchhoff F, Dringen R, Giaume C. Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2001;251(4):159-169.

Kocovska E, Fernell E, Billstedt E, Minnis H, Gillberg C. Vitamin D and autism: Clinical review. *Research in developmental disabilities*. 2012; 1541-1550.

Kolling J, Scherer E, Siebert C, Marques E, dos Santos T, Wyse A. Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats. *Gene*. 2014;545(1):72-79. Kolling et al., 2016

Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ and Wyse ATS. Homocysteine Induces Oxidative-Nitrative Stress in Heart of Rats: Prevention by Folic Acid. *Cardiovascular Toxicology*. 2011;11:67-73.

Kondera-Anasz Z, Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Jońca M. Concentrations of interleukin (IL)-1 α , IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sRII) and IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2005;123(2):198-203.

Kono K, Fujii H, Nakai K, Goto S, Kitazawa R, Kitazawa S, et al. Anti-oxidative effect of vitamin D analog on incipient vascular lesion in non-obese type 2 diabetic rats. *Am J Nephrol*. 2013;37:167-74.

Kriebitzsch C, Verlinden L, Eelen G, Van schoor NM, Swzrt K, Lips P, Meyer MB, Pilke JW, Boonen S, Carlberg C, Vitvisky V, Bouillon R, Banerjee R, Verstuyf A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 influences cellular homocysteine levels in

murine preosteoblastic MC3T3-E1 cells by Direct regulation of cystathionine beta-synthase. *J. Bone Miner.* 2011; 26,2991-3000.

Lardner AL. Vitamin D and hippocampal development-the story so far. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2015; 8-58.

Latimer CS, Brewer LD, Searcy JL, Chen CK, Popovic J, Kraner SD, Thibault O, Blalock EM, Landfield PW, Porter NM. Vitamin D prevents cognitive decline and enhances hippocampal synaptic function in aging rats. *PNAS.* 2014.

Lazzerini P, Capecchi P, Selvi E, Lorenzini S, Bisogno S, Galeazzi M et al. Hyperhomocysteinemia, inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews.* 2007;6(7):503-509.

Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang Y, McGeer E, McGeer P. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *The FASEB Journal.* 2010;24(7):2533-2545.

Lee, S.J, Kim, K.M, Namkoong, S, Kim, C.K, Kang, Y.K, Lee, H, Ha, K.S, Han, J.A, Chung, H.T, Kwon, Y.G, Kim, Y. M. Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent noxa expression. Through the formation of s-nitrosohomocysteine. *The Journal of Biological Chemistry.* 2005.; 5781-5788.

Leishear K, Ferrucci L, Lauretani F, Boudreau R.M, Studenski S.A, Rosano C, Abbate R, Gori A.M, Corsi A.M, Di Iorio A, Guralnik J.M, Bandinelli S, Newman A.B, Strotmeyer E.S. Vitamin B12 And Homocysteine Levels And 6-Year Change In Peripheral Nerve Function And Neurological Signs.*The Journals Of Gerontology.Series A, Biological Sciences And Medical Sciences.* 2012; 67, 537–543.

Lenaz G, Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol.* 2012; 942:93-136.

Lin R. Crosstalk between vitamin D metabolism, VDR signalling, and innate immunity. *BioMed Research International.* 2016.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews.* 2010;4(8):118.

Longoni A, Kolling J, dos Santos T, dos Santos J, da Silva J, Pettenuzzo L et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts neuroprotective effects in an ex vivo model of mild hyperhomocysteinemia. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2016;48:71-79.

Loureiro SO, Romão L, Alves T, Fonseca A, Heimfarth L, Neto VM, Wuse ATS, Pessoa-Pureur R. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. *Brain Research*. 2010; 151-164.

Luo X, Xiao L, Yang H, Zhang R, Jiang M, Ni J et al. Homocysteine downregulates gene expression of heme oxygenase-1 in hepatocytes. *Nutrition & Metabolism*. 2014;11(1):55.

Machado F, Ferreira A, da Cunha A, Tagliari B, Mussulini B, Wofchuk S et al. Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C. *Metabolic Brain Disease*. 2011;26(1):61-67.

Malinow M. Hyperhomocyst(e)inemia. A common and easily reversible risk factor for occlusive atherosclerosis [published erratum appears in *Circulation* 1990 Oct;82(4):1547]. *Circulation*. 1990;81(6):2004-2006.

Mandarino NR, Junior FCM, Salgado JVL, Lages JS, Filho NS. Is vitamin D deficiency a new risk factor for cardiovascular disease? *The open cardiovascular medicine Journal*. 2015; 9,40-49.

Mata M, Fink D, Gainer H, Smith C, Davidsen L, Savaki H et al. Activity-dependent Energy Metabolism in Rat Posterior Pituitary Primarily Reflects Sodium Pump Activity. *Journal of Neurochemistry*. 1980;34(1):213-215.

Mercurio F, Murray B.W, Shevchenko A, Bennett B.L, Young D.B, Li J.W, Pascual G, Motiwala A, Zhu H, Mann M. e Manning A.M. I κ B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Molecular Cell Biology*. 1999; 19, 1526–1538.

Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic

disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2002;202(1-2):13-23.

Minagawa H, Watanabe A, Akatsu H, Adachi K, Ohtsuka C, Terayama Y et al. Homocysteine, Another Risk Factor for Alzheimer Disease, Impairs Apolipoprotein E3 Function. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(49):38382-38388.

Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R and Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit*. 2009; 15:RA209-219.

Moro M.A, Almeida A, Bolaños J.P, Lizasoain I. Mitochondrial Respiratory Chain And Free Radical Generation In Stroke. *Free Radic. Biol. Med*. 2005;39, 1291–1304.

Nigwekar SU, Thadhani R. Vitamin D receptor activation: cardiovascular and renal implications. *Kidney international supplements*. 2013;3:427-30.

O'Neill L, Kaltschmidt C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in Neurosciences*. 1997;20(6):252-258.

Obeid R. The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. *Nutrients*. 2013;5(9):3481-3495.

Pana A. Homocysteine and Neuropsychiatric Disease. *Psychiatric Annals*. 2015;45(9):463-468.

Paul R, Borah A. The potential physiological crosstalk and interrelationship between two sovereign endogenous amines, melatonin and homocysteine. *Life Sciences*. 2015;139:97-107.

Pavlov V, Tracey K. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(12):743-754.

Permoda-Osip A, Dorszewska J, Skibinska M, Chlopocka-Wozniak M, Rybakowski J. Hyperhomocysteinemia in Bipolar Depression: Clinical and Biochemical Correlates. *Neuropsychobiology*. 2013;68(4):193-196.

Perna A, Ingrosso D, De Santo N. Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):409-417.

Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello P, Robinson K, Jacobsen D. Homocysteine Induces Expression and Secretion of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Interleukin-8 in Human Aortic Endothelial Cells: Implications for Vascular Disease. *Circulation*. 2001;103(22):2717-2723.

Prufer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 1999; 16, 135-145.

Querales MIME, Cruces S, Rojas &L, Sanchez. Association between vitamin D deficiency and metabolic syndrome. *Revista Medical De Chile*. 2010; 138, 1312-1318.

Quincozes-Santos A, Bobermin L, Tramontina A, Wartchow K, Tagliari B, Souza D et al. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: Neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicology in Vitro*. 2014;28(4):544-551.

Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, Kamen DL, Macwana SR, Roberts VC. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70(9):1569-74.

Ryter S. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews*. 2006;86(2):583-650.

Saleron L, Sorrenti V, Giacomo C, Romeo G, Siracusa M. Progress in the Development of Selective Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors. *CPD*. 2002;8(3):177-200.

Santos C, Bobermin L, Souza D, Bellaver B, Bellaver G, Arús B et al. Lipoic acid and N-acetylcysteine prevent ammonia-induced inflammatory response in C6 astroglial cells: The putative role of ERK and HO1 signaling pathways. *Toxicology in Vitro*. 2015;29(7):1350-1357.

Sastry B, Phillis J. Antagonism of biogenic amine-induced depression of cerebral cortical neurones by Na⁺ + ,K⁺ -ATPase inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol*. 1977;55(2):170-179.

Scherer E, da Cunha A, Kolling J, da Cunha M, Schmitz F, Sitta A et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2011;29(7):693-699.

Scherer E, Loureiro S, Vuaden F, da Cunha A, Schmitz F, Kolling J et al. Mild Hyperhomocysteinemia Increases Brain Acetylcholinesterase and Proinflammatory Cytokine Levels in Different Tissues. *Molecular Neurobiology*. 2014;50(2):589-596.

Scherer E, Loureiro S, Vuaden F, Schmitz F, Kolling J, Siebert C et al. Mild hyperhomocysteinemia reduces the activity and immunocontent, but does not alter the gene expression, of catalytic α subunits of cerebral Na^+, K^+ -ATPase. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2013;378(1-2):91-97.

Scherer E, Savio L, Vuaden F, Ferreira A, Bogo M, Bonan C et al. Chronic mild hyperhomocysteinemia alters ectonucleotidase activities and gene expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in rat lymphocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012;362(1-2):187-194.

Schulpis K, Giannoulia-Karantana A, Papaconstantinou E, Parthimos T, Tjamouranis I, Tsakiris S. Erythrocyte membrane Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities in subjects with methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C \rightarrow T genotype and moderate hyperhomocysteinaemia. The role of L-phenylalanine and L-alanine. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. 2006;44(4).

Selhub J. The many facets of hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts. *J Nutr*. 2006;136:1726S-30S.

Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health, in: Andreescu, S. *Oxidative stress: diagnostic, prevention, and therapy*. ACS symposium Series; Washington DC. 2011.

Snow, R.J., Murphy, R.M., 2003. Factors Influencing Creatine Loading Into Human Skeletal Muscle. *Exercise Andsport Sciences Reviews*. 31, 154–158.

Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baracca A. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Bioscience reports*. 2007;27:11-21.

Soliman M, Combs C, Rosenberger T. Modulation of Inflammatory Cytokines and Mitogen-activated Protein Kinases by Acetate in Primary Astrocytes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2012;8(1):287-300.

Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M. Clinical Use And Rational Management Of Homocysteine, Folic Acid, And B Vitamins In Cardiovascular And Thrombotic Diseases. *Z Kardiol*. 2004;93, 439-453.

Steele M, Fuller S, Patel M, Kersaitis C, Ooi L, Münch G. Effect of Nrf2 activators on release of glutathione, cysteinylglycine and homocysteine by human U373 astroglial cells. *Redox Biology*. 2013;1(1):441-445.

Stefanello F, Ferreira A, Pereira T, da Cunha M, Bonan C, Bogo M et al. Acute and chronic hypermethioninemia alter Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2011;29(4):483-488.

Stipanuk, 2011 - 11. Stipanuk M Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *Journal of Inherited*

Sudduth T, Powell D, Smith C, Greenstein A, Wilcock D. Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013;33(5):708-715.

Suhail M. Na⁺, K⁺-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res*. 2010.

Swapna I, Sathya Sai Kumar K, Murthy C, Senthilkumaran B. Membrane alterations and fluidity changes in cerebral cortex during acute ammonia intoxication. *NeuroToxicology*. 2006;27(3):402-408.

Syapin PJ (2008) 1. Syapin P. Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. *British Journal of Pharmacology*. 2009;155(5):623-640.

Szadejko K, Szabat K, Ludwichowska A, Slawek J. Homocysteine and its role in pathogenesis of Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Przeegl Lek.* 2013; 70 (7):443-447

Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S. Heme Oxygenase-1: A Novel Therapeutic Target in Oxidative Tissue Injuries. *CMC.* 2004;11(12):1545-1561.

Tan M, Ouyang Y, Jin M, Chen M, Liu P, Chao X et al. Downregulation of Nrf2/HO-1 pathway and activation of JNK/c-Jun pathway are involved in homocysteine acid-induced cytotoxicity in HT-22 cells. *Toxicology Letters.* 2013;223(1):1-8.

Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, Kozawa O. Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *Journal of Neuroinflammation.* 2010;7(1):16.

Timkova (2016) - 5. Timkova V, Tatarkova Z, Lehotsky J, Racay P, Dobrota D, Kaplan P. Effects of mild hyperhomocysteinemia on electron transport chain complexes, oxidative stress, and protein expression in rat cardiac mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2015;411(1-2):261-270.

Tourjman V, Kouassi É, Koué M, Rocchetti M, Fortin-Fournier S, Fusar-Poli P et al. Antipsychotics' effects on blood levels of cytokines in schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophrenia Research.* 2013;151(1-3):43-47.

Troen A. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2005;29(7):1140-1151.

Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:12474-9.

Vallabhapurapu SKarin M. Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System. *Annual Review of Immunology.* 2009;27(1):693-733.

Veenstra TD, Prufer K, Koenigsberger C, Brimijoin S W, Grande JP, and Kumar R. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo," *Brain Research.* 1998;193–205.

Vile G, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell R. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(7):2607-2610.

Vitvitsky V.M, Garg S.K, Keep R.F, Albin R.L, Banerjee R. Na⁺ and K⁺ ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822, 1671-81.

Vuolo L, Somma CD, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2012; 3-58.

Wakabayashi N, Slocum S, Skoko J, Shin S, Kensler T. When NRF2 Talks, Who's Listening?. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;13(11):1649-1663.

Wang D.D and Bordey A. The Astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*. 2008; 86, 342-367.

Wang X, Zhu Y, Wang X, Yang Y, Cheng S. Cardioprotective effect of calcitriol on myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2013;18:386-91.

Wang Y, Ye Q, Liu C, Xie J, Yan Y, Lai F et al. Involvement of Na/K-ATPase in hydrogen peroxide-induced activation of the Src/ERK pathway in LLC-PK1 cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;71:415-426.

Weinreb O, Mandel S, Youdim M, Amit T. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;62:52-64.

Weiss N, Heydrick S, Postea O, Keller C, Keaney J, Loscalzo J. Influence of Hyperhomocysteinemia on the Cellular Redox State – Impact on Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2003;41(11).

Williams KSchalinske K. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. *BioFactors*. 2010;:NA-NA.

Willis D, Moore A, Frederick R, Willoughby D. Heme oxygenase: A novel target for the modulation of inflammatory response. *Nature Medicine*. 1996;2(1):87-93.

Wintermeyer E, Ihle C, Ehnert S, Stockle U, Ochs G, Zwart P, Flesch I, Bahrs C and Nussler AK. Crucial role of vitamin D in the musculoskeletal system. *Nutrients*. 2016; 8, 319.

Wolf, D., Stachon, P., Bode, C., Zirlik, A., 2013. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Hamostasealogie*. 34.

Wysockiński AKłoszewska I. Homocysteine Levels in Patients with Schizophrenia on Clozapine Monotherapy. *Neurochem Res*. 2013;38(10):2056-2062.

Xiao, W. Advances in NF-κB signaling transduction and transcription. *Cellular & Molecular Immunology*. 2004; 1,425–433.

Xie D, Yuan Y, Guo J, Yang S, Xu X, Wang Q et al. Hyperhomocysteinemia predicts renal function decline: a prospective study in hypertensive adults. *Sci Rep*. 2015;5:16268.

Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(5):398-406.

Zhu X, Smith M. A, Honda K, Aliev G, Moreira P.I, Nunomura, A, Casadesus G, Harris P.L, Siedlak S.L, Perry G. Vascular Oxidative Stress In Alzheimer Disease. *Journal Of The Neurological Sciences*. 2007;257, 240–246.

Ziemińska E, Stafiej A, Łazarewicz J. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochemistry International*. 2003;43(4-5):481-492.

Zou C e Banerjee R. Homocysteine and Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2005;7(5-6):547-559.