

ANA CLAUDIA MORANDI ALÉSSIO

**AVALIAÇÃO DA HIPERHOMOCISTEINEMIA LEVE NA
EVOLUÇÃO DA ATEROSCLEROSE
EM CAMUNDONGOS NORMAIS, COM HEMOFILIA B,
DEFICIÊNCIA DOS RECEPTORES PARA LDL OU
DA APOLIPOPROTEÍNA E**

CAMPINAS

Unicamp

2008

ANA CLAUDIA MORANDI ALÉSSIO

**AVALIAÇÃO DA HIPERHOMOCISTEINEMIA LEVE NA
EVOLUÇÃO DA ATEROSCLEROSE
EM CAMUNDONGOS NORMAIS, COM HEMOFILIA B,
DEFICIÊNCIA DOS RECEPTORES PARA LDL OU
DA APOLIPOPROTEÍNA E**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Medicina Experimental.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

AL25a Aléssio, Ana Claudia Morandi
Avaliação da hiperhomocisteinemia leve na evolução da
aterosclerose em camundongos normais, com Hemofilia B, deficiência
dos receptores para LDL ou apolipoproteína E / Ana Claudia Morandi
Aléssio. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Hiperhomocisteinemia. 2. Modelos animais em pesquisa. 3.
Aterosclerose. 4. Ácido fólico. 5. Metionina. I. Annichino-
Bizzacchi, Joyce Maria. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Evaluation of Mild hyperhomocysteinemia in the
Development of Atherosclerosis in normal, hemophilic B, LDL Receptor-
deficient or Apolipoprotein E-deficient Mice**

Keywords: • Hyperhomocysteinemia

- Animal model
- Atherosclerosis
- Folic acid
- Methionine

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:
Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski
Prof. Dr. Antônio de Pádua Mansur
Prof. Dr. Reich Vinícius de Paula
Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

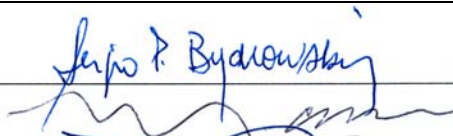
Data da defesa: 26 - 08 - 2008

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Membros:

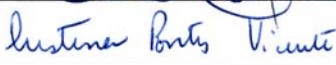
Professor (a) Doutor (a) Sérgio Paulo Bydlowski



Professor (a) Doutor (a) Antônio de Pádua Mansur



Professor (a) Doutor (a) Erich Vinicius de Paula



Professor (a) Doutor (a) Cristina Pontes Vicente



Professor (a) Doutor (a) Joyce Maria Annichino Bizzacchi



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/08/2008

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Luiz Eduardo e Claudia,
pelo apoio irrestrito, amor e compreensão
em todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi, pelos ensinamentos científicos e oportunidade de realizar este trabalho. Um porto seguro em todos os momentos.

Aos Professores Roger Castilho, Erich Vinícius de Paula e Nicola Amanda Conran Zorzetto pelos importantes comentários científicos feitos no meu exame de qualificação.

A todos os funcionários e alunos do Laboratório de Hemostasia e Pesquisa, Hemocentro II, FCM-UNICAMP, que colaboraram de alguma forma na realização deste trabalho.

À Dra. Laurione C. de Oliveira e ao funcionário Davi, do Laboratório de Fisiologia, HC-UNICAMP, pela colaboração na análise do ácido fólico e vitamina B₁₂.

Ao Dr. Célio X. C. Santos e ao funcionário Vitor Debbas do Laboratório de Biologia Vascular, Instituto do Coração (INCOR), Universidade de São Paulo, pela colaboração na análise de *western-blot*.

Ao Dr. Renato Haddad e à Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr pela colaboração na análise de homocisteína plasmática.

À aluna de doutorado Amarylis C. B. A. Wanschel, do Instituto de Biologia-UNICAMP, pelos ensinamentos na análise histológica do seio aórtico.

À Profa. Dra. Helena C. F. de Oliveira e alunos do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia-UNICAMP, pela colaboração na análise de colesterol total.

À Profa. Dra. Maria Cristina C. G. Marcondes e alunos do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia-UNICAMP, por disponibilizar o uso do microscópio de captura de imagem.

Ao Prof. Dr. Kleber G. Franchini e aos funcionários Antônio e Taís do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, FCM-UNICAMP, por disponibilizar o uso de equipamentos utilizados durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu namorado Vinícius, meus irmãos Tato e Aline, e aos amigos Janaína, Luciano, Ucha, Job, Aline, Karen e Vilma pela convivência agradável, carinho, incentivo e amizade em importantes momentos da minha vida.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela Fapesp, processo número 03/12635-9.

*Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou nada sei*

*Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs.
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso chuva para florir.*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha, e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada,
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu sou...
Estrada eu vou...*

*Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs.
É preciso o amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir.*

*Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega, o outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história,
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,
E ser feliz...*

Almir Sater e Renato Teixeira

	PÁG.
RESUMO	xxxvii
ABSTRACT	xli
1- INTRODUÇÃO	45
1.1- Fatores nutricionais e genéticos que influenciam as concentrações da Hcy plasmática	49
1.2- Hcy e doença vascular	51
1.3- Mecanismos celulares pelos quais a Hcy promove aterosclerose	52
1.3.1- Resposta inflamatória.....	52
1.3.2- Estresse oxidativo.....	52
1.3.3- Estresse do retículo endoplasmático (RE).....	53
1.3.4- Mecanismos adicionais.....	55
1.4- Modelos animais de HHcy	56
1.5- Modelos animais apoE^{-/-}	57
1.6- Modelos animais LDLR^{-/-}	58
1.7- Modelos animais com deficiência de fator IX	59
2- OBJETIVOS	61
3- MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1- Modelos animais	67
3.2- Dieta	67
3.3- Coleta de sangue	68
3.4- Extração de DNA	69

3.5- Genotipagem.....	69
3.5.1- Genotipagem para os alelos do gene do FIX.....	69
3.5.2- Genotipagem para os alelos do gene da apoE.....	71
3.5.3- Genotipagem para os alelos do gene do LDLR.....	72
3.6- Dosagem da Hcy plasmática.....	73
3.7- Análise do ácido fólico e vitamina B₁₂.....	74
3.8- Análise do colesterol.....	74
3.9- Western-blot.....	74
3.10- Análise Histológica.....	75
3.10.1- Quantificação das lesões do seio aórtico.....	75
3.11- Análise Estatística.....	76
4- RESULTADOS.....	77
4.1- Camundongos normais.....	79
4.2- Camundongos hemofílicos B.....	83
4.3- Camundongos apoE^{-/-}.....	84
4.4- Camundongos LDLR^{-/-}.....	93
4.5- Western-blot.....	101
5- DISCUSSÃO.....	105
6- CONCLUSÃO.....	117
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
8- ANEXOS.....	135
Anexo 1.....	137
Anexo 2.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS

apoE	Apolipoproteína E
apoE^{-/-}	Homozigoto para a deficiência da apolipoproteína E
ATF3	Ativador de fator de transcrição 3
ATF4	Ativador de fator de transcrição 4
ATF6	Ativador de fator de transcrição 6
ATP	Adenosina trifosfato
Beta-VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade-beta
CBS	Cistationina β -Sintase
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEMIB	Centro de Bioterismo da Unicamp
CHOP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Dieta A	Dieta normal
Dieta B	Dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B ₁₂ e B ₆
Dieta C	Dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B ₁₂ e B ₆
Dieta D	Dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B ₁₂ e B ₆
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTN	Defeitos do tubo neural
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético

EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
EN-RAGE	Ligante transdutor de sinal para receptor de produtos de glicosilação avançada
FIX	Fator IX
g/Kg	Grama por kilograma
Grp78	<i>78-kDa glucose-regulated protein</i>
Grp94	<i>94-kDa glucose-regulated protein</i>
Hcy	Homocisteína
HEPES	N-[2-hidroxietil] piperazina N' [2-ácido etanesulfóico]
HHcy	Hiperhomocisteinemia
HPLC/MS/MS	Cromatografia Líquida da Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massa
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
IL-8	Interleucina-8
IRE1	<i>Inisitol requiring endoplasmic reticulum-to-nucleus signaling-1</i>
ITAL	Instituto Tecnológico de Alimentos
JNK	Proteína quinase NH ₂ -terminal de c-Jun
Kb	Kilobase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LDLR^{-/-}	Homozigoto para a deficiência do receptor da lipoproteína de baixa densidade
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrometro

μmol/L	Micromol por litro
mA	Miliampere
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
<i>m/z</i>	Relação massa carga
NaCl	Cloreto de sódio
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NF-κB	Fator nuclear kappa B
ng/mL	Nanograma por mililitro
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo-1
pb	Par de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PERK	<i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase/pancreatic eIF2α kinase</i>
PKR	<i>Double-stranded RNA-activating protein Kinase</i>
pmol/L	Picomol por litro
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PP1C	<i>Protein phosphatase-1</i>
RAGE	Receptor para produtos de glicosilação avançada
RE	Retículo endoplasmático

rpm	Rotações por minuto
SREBPs	Proteínas de ligação a elemento regulador de esterol
TBS	Tampão salino Tris-HCl
TBS-T	Tampão salino Tris-HCl suplementado com Tween 20
TFA	Ácido trifluoracético
UPR	Resposta a proteínas não-enoveladas
VCAM-1	Molécula de adesão celular expressa pelo endotélio vascular-1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
Vs	Versus
XBP-1	<i>X-box binding protein-1</i>

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Valores de média e desvio padrão da Hcy, ácido fólico e vitamina B ₁₂ dos camundongos normais tratados com as dietas específicas por 8 semanas.....	80
Tabela 2- Valores de média e desvio padrão da Hcy, ácido fólico e vitamina B ₁₂ nos camundongos normais tratados com as dietas específicas por 24 semanas.....	81
Tabela 3- Valores de média e desvio padrão da Hcy, ácido fólico e vitamina B ₁₂ nos camundongos hemofílicos B tratados com as dietas específicas por 8 semanas.....	84
Tabela 4- Valores de média e desvio padrão da Hcy plasmática de acordo com as dietas.....	85
Tabela 5- Valores de média e desvio padrão da vitamina B ₁₂ de acordo com as dietas.....	86
Tabela 6- Valores de média e desvio padrão do ácido fólico de acordo com as dietas.....	87
Tabela 7- Valores de média e desvio padrão da área de lesão aterosclerótica de acordo com as dietas.....	89
Tabela 8- Valores de média e desvio padrão do colesterol plasmático de acordo com as dietas.....	92
Tabela 9- Valores de média e desvio padrão da Hcy de acordo com as dietas..	94

Tabela 10- Valores de média e desvio padrão da vitamina B ₁₂ de acordo com as dietas.....	95
Tabela 11- Valores de média e desvio padrão do ácido fólico de acordo com as dietas.....	96
Tabela 12- Valores de média e desvio padrão da área de lesão aterosclerótica de acordo com as dietas.....	97
Tabela 13- Valores de média e desvio padrão do colesterol plasmático total de acordo com as dietas.....	100

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Desenvolvimento progressivo das lesões ateroscleróticas.....	48
Figura 2- Metabolismo da Hcy.....	50
Figura 3- Esquema da resposta celular a UPR em mamíferos.....	54
Figura 4- Gel de eletroforese para identificação do gene do FIX.....	70
Figura 5- Gel de eletroforese para identificação do gene da apoE.....	71
Figura 6- Gel de eletroforese para identificação do gene do LDLR.....	72
Figura 7- Curva analítica em matriz biológica: Hcy (m/z 90) e homocisteína- d ₄ (m/z 94) nas concentrações de 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 60.0 mmolar.....	73
Figura 8- Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos normais (C57BL/6) alimentados com diferentes dietas por 24 semanas, não mostrando lesões ateroscleróticas.....	82
Figura 9- Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos apoE ^{-/-} (C57BL/6) alimentados com diferentes dietas por 8 semanas, mostrando formação de lesões ateroscleróticas assinaladas por círculo.....	90
Figura 10- Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos apoE ^{-/-} (C57BL/6) alimentados com diferentes dietas por 20 semanas, mostrando lesões ateroscleróticas representativas.....	91

Figura 11-	Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos LDLR ^{-/-} (C57BL/6) alimentados com dieta B por 8 semanas, mostrando lesões ateroscleróticas representativas.....	98
Figura 12-	Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos LDLR ^{-/-} (C57BL/6) alimentados com as dietas por 20 semanas, mostrando lesões ateroscleróticas representativas.....	99
Figura 13-	Análise da expressão das chaperonas Grp78 e Grp94 em camundongos apoE ^{-/-} alimentados com dietas A, B e D por 20 semanas, utilizando a técnica de <i>western-blot</i>	102
Figura 14-	Análise da expressão das chaperonas Grp78 e Grp94 em camundongos normais alimentados com dietas A, B e D por 24 semanas, utilizando a técnica de <i>western-blot</i>	103



RESUMO

Nosso estudo teve o objetivo de analisar o efeito da hiperhomocisteinemia (HHcy) leve e controlada no desenvolvimento da aterosclerose em modelos murinos normais, deficientes de apolipoproteína E (apoE^{-/-}), deficientes dos receptores de LDL (LDLR^{-/-}) ou hemofílicos B. Foi realizada a quantificação das lesões ateroscleróticas no seio aórtico e análise do estresse do retículo endoplasmático (RE) pela técnica de *western-blot*. As concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram determinadas por radioimunoensaio e, a concentração da homocisteína (Hcy) plasmática por HPLC-MS/MS. Os camundongos receberam dietas enriquecidas em metionina por gavagem com baixos ou altos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dietas B e C, respectivamente), e dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dieta D), para induzir uma HHcy leve. Os animais alimentados com dietas B, C e D apresentaram níveis de Hcy 3 a 5 vezes maiores que os encontrados nos animais normais alimentados com dieta padrão (dieta A), o que é proporcional à definição de HHcy leve em humanos. Os camundongos normais e hemofílicos B não desenvolveram lesão aterosclerótica, mesmo na presença da HHcy. Entretanto, os camundongos normais com dieta B por 24 semanas apresentaram aumento na expressão das proteínas Grp78 e Grp94, representando um estresse do RE. Os camundongos apoE^{-/-} e LDLR^{-/-} com dietas B, C e D por 8 e 20 semanas apresentaram aumento progressivo da lesão aterosclerótica, comparados aos camundongos alimentados com dieta A. Os camundongos apoE^{-/-} com dieta B por 20 semanas apresentaram maior lesão quando comparados aos camundongos com dietas C e D. Esses resultados sugerem que a interação de fatores de risco podem ter um efeito aditivo e/ou sinérgico sobre o desenvolvimento da aterosclerose. Os camundongos apoE^{-/-} tratados com dieta enriquecida em ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dieta C) por 20 semanas mostraram menor desenvolvimento de lesões ateroscleróticas que os camundongos apoE^{-/-} tratados com dieta deficiente destas vitaminas (dieta B), ambos submetidos a uma sobrecarga de metionina. Estes resultados corroboram o efeito protetor das vitaminas, particularmente a longo prazo. Como já sugerido em outros estudos, a metionina parece ter um efeito tóxico sobre a vasculatura arterial, evidenciado neste estudo pelo maior grau de lesão nos grupos de animais que tiveram como diferença na dieta a presença deste aminoácido (grupo B vs grupo D). Como os animais hemofílicos morreram muito precocemente, em decorrência de hemorragias, a análise dos resultados ficou

comprometida, apenas permitindo demonstrar que não houve formação de lesão aterosclerótica com 8 semanas de exposição às dietas, apesar do aumento da Hcy.



ABSTRACT

This study evaluated the effect of controlled mild hyperhomocysteinemia (HHcy) in the development of atherosclerosis using normal, apolipoprotein E-deficient (apoE^{-/-}), LDL receptor-deficient (LDLR^{-/-}), or hemophilia B mice. We quantified atherosclerotic lesions at the aortic sinus and analyzed endoplasmic reticulum (RE) stress by western-blot technique. Concentrations of folic acid and vitamin B₁₂ were determined using radioimmunoassay and homocysteine (Hcy) plasma levels were determined using HPLC-MS/MS. Mice received diets enriched in methionine with low or high levels of folic acid, vitamin B₁₂, and B₆ (diets B and C, respectively), and diet only with low levels of folic acid, vitamin B₁₂, and B₆ (diet D), to induce mild HHcy. Mice that received diets B, C, and D presented Hcy levels of about 3 to 5 fold the concentration found in wild-type mice fed on standard rodent chow (diet A), representing the same proportional increase of mild HHcy defined in humans. Normal mice and hemophilia B mice did not develop atherosclerotic lesions, even in the presence of mild HHcy. However, normal mice fed on diet B for 24 weeks presented increases in protein Grp78 and Grp94 expressions, representing RE stress. The apoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mice fed on diets B, C, and D for 8 and 20 weeks presented a progressive increase in arteriosclerotic lesions, compared to mice fed on diet A. The apoE^{-/-} mice fed on diet B for 20 weeks presented a greater area of the lesion than mice fed on diets C and D. These results suggest that an interaction of risk factors may have a synergic or additive effect in the development of atherosclerosis. The apoE^{-/-} mice fed on the diet enriched in folic acid, vitamin B₁₂, and B₆ (diet C) for 20 weeks showed a lower development of atherosclerotic lesions than apoE^{-/-} mice fed on a diet with low levels these vitamins (diet B), both subjected to an overload of methionine. These results corroborated the protective effect of vitamins, particularly in the long term. As suggested in other studies, methionine may have a toxic effect on arterial vasculature, demonstrated in this study by greater lesions in the animal groups that presented this amino acid in the diet (group B vs group D). Since hemophilia B mice died very early, due to hemorrhage, the analysis of the results was compromised. We could only demonstrate that they did not develop atherosclerotic lesions with 8 weeks of exposure to diets, in spite of increase of Hcy levels.



1- INTRODUÇÃO

A aterosclerose é considerada a principal causa das doenças cardiovasculares, caracterizando-se por um processo inflamatório crônico complexo, que se inicia nos locais de injúria endotelial e culmina na formação de lesões na parede arterial (ROSS, 1999; SPADY, 1999). As principais características das lesões ateroscleróticas são: infiltração subendotelial monocitária, proliferação e migração de células musculares lisas, acúmulo de colesterol e formação de uma matriz extracelular. O colesterol é carregado pelas células musculares lisas e macrófagos, sendo morfologicamente reconhecidas como células espumosas, e são observadas em todos os estágios do desenvolvimento da lesão (STARY et al., 1994; STARY et al., 1995). A importância do colesterol e seus derivados oxidados na patogênese da aterosclerose foram confirmados por estudos demonstrando a sua presença dentro das lesões, tanto em pacientes como em animais (SUARNA et al., 1995; LUSIS, 2000). Tradicionalmente, o colesterol e seus derivados oxidados parecem acumular nas lesões ateroscleróticas, contribuindo deste modo para a formação de ateromas avançados. Essas lesões ateroscleróticas avançadas causam estreitamento progressivo do lúmen vascular (Fig. 1), levando a sintomas isquêmicos, síndromes coronarianas agudas, geralmente como resultado da ruptura da lesão, e trombose (ROSS, 1999).

Os fatores de risco convencionais para doenças cardiovasculares incluem hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo e diabetes, presentes em aproximadamente 50% de todos os casos (ROSS, 1999; LUSIS, 2000). Evidências indicam que hiperhomocisteinemia (HHcy) é um importante fator de risco para doença cardiovascular aterosclerótica (MCCULLY, 1996; UELAND et al., 2000; WELCH et al., 1998). Além disso, mais de 40% dos pacientes diagnosticados com doença arterial coronariana prematura, doença vascular periférica ou trombose venosa recorrente apresentam HHcy (UELAND et al., 2000; MCCULLY, 1996).

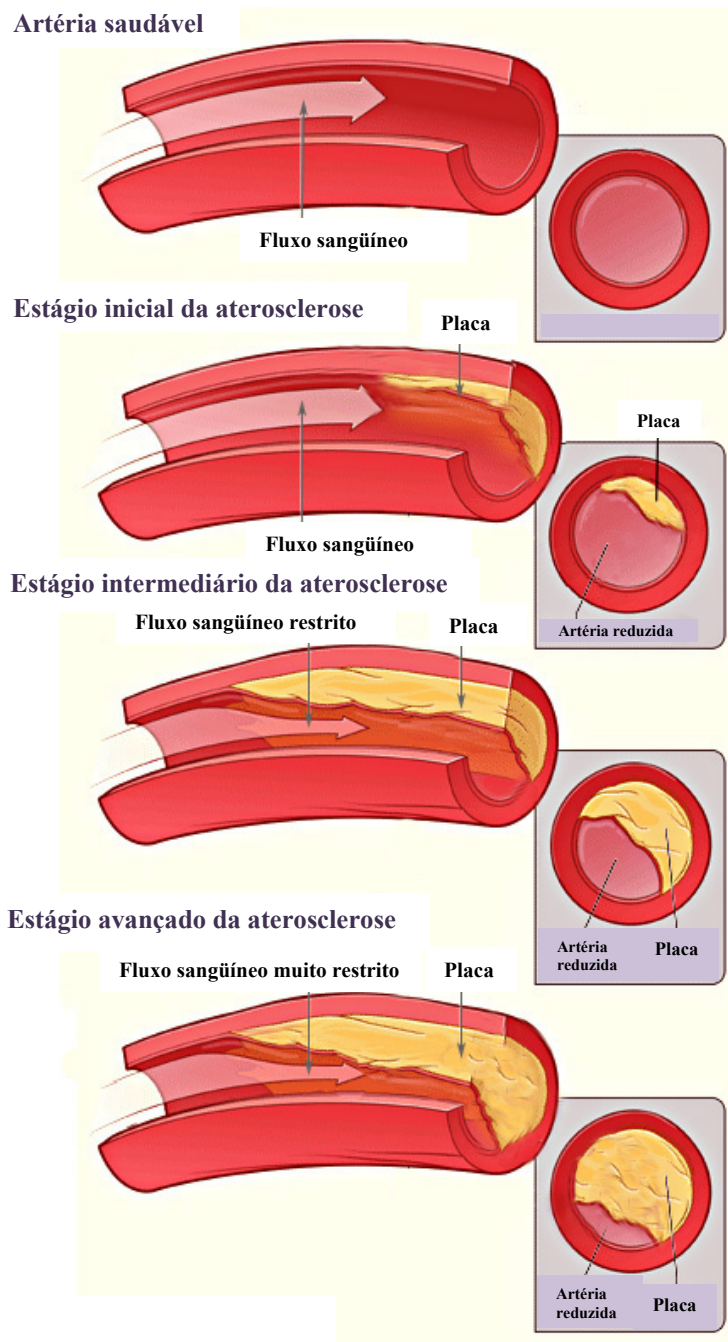


Figura 1- Desenvolvimento progressivo das lesões ateroscleróticas.

1.1- Fatores nutricionais e genéticos que influenciam as concentrações da Hcy plasmática

A homocisteína (Hcy) é um metabólito intermediário do grupo sulfidríla formado durante a conversão da metionina, que é um aminoácido essencial proveniente da dieta. O metabolismo intracelular da Hcy ocorre através de duas vias: a via de remetilação na qual a Hcy originará novamente a metionina, e a via de transulfuração que culmina na formação de cisteína (JAMES et al., 2000). A figura 2 demonstra como ocorre o metabolismo da Hcy e os principais fatores envolvidos.

Mutações em genes responsáveis pelo metabolismo da Hcy pode resultar em homocistinúria, uma forma grave de HHcy (WILCKEN et al., 1992). A causa genética mais comum de homocistinúria é a deficiência em homozigose da cistationina β -sintase (CBS), resultando em concentrações da Hcy plasmática acima de 400 $\mu\text{mol/L}$. Normalmente, as concentrações da Hcy no plasma variam de 8 a 12 $\mu\text{mol/L}$. A deficiência em homozigose da CBS é herdada como uma desordem recessiva autossômica com várias manifestações clínicas, incluindo retardamento mental, *ectopia lentis*, anomalias esqueléticas e esteatose hepática (WILCKEN et al., 1992). Além disso, os pacientes apresentam um risco maior de aterosclerose prematura e trombose, sendo a principal causa de morte (WELCH et al., 1998). Embora a deficiência em homozigose da CBS seja rara, a deficiência em heterozigose ocorre em aproximadamente 1% da população geral e está associada com aterosclerose prematura e trombose em indivíduos fenotipicamente normais (MCCULLY, 1996).

A deficiência de metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), enzima envolvida na remetilação da Hcy para metionina, também causa HHcy e pode levar ao desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (FROSST et al., 1995). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a associação de polimorfismos nos genes da MTHFR e CBS pode levar a alterações nas concentrações da Hcy plasmática em crianças saudáveis (ALÉSSIO et al., *in press*).

As deficiências nutricionais de vitaminas requeridas no metabolismo da Hcy, incluindo ácido fólico, vitaminas B₁₂, B₆ e B₂ (SELHUB et al., 1993) são a causa mais importante de HHcy na população. Recentemente, demonstramos que a diminuição na concentração do ácido fólico durante a infância levou ao aumento na concentração de Hcy, sendo considerado um fator de risco independente para HHcy neste grupo de crianças (ALÉSSIO et al., 2004).

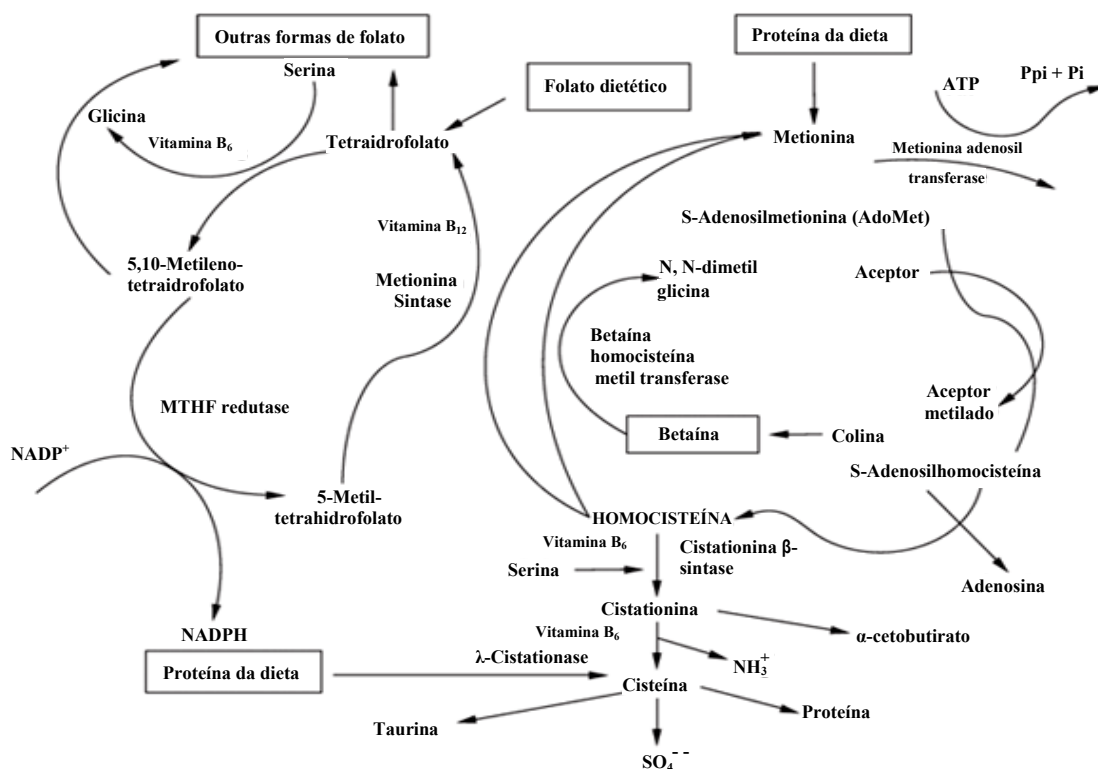


Figura 2- Metabolismo da Hcy (LENTZ, 2001a).

1.2- Hcy e doença vascular

Os pacientes com homocistinúria desenvolvem espessamento da camada íntima arterial e placas fibrosas ricas em colágeno e células musculares lisas (WILCKEN et al., 1992; REFSUM, et al., 1998). Estas lesões fibrosas são mais numerosas que as lesões ateroscleróticas ricas em gordura, e estão presentes nas principais artérias dos pacientes homocistinúricos (REFSUM, et al., 1998).

Trombose venosa e arterial é comum em pacientes com homocistinúria (BRATTSTROM et al., 2000). A trombose induzida pela Hcy parece resultar de distúrbios no potencial trombótico das células endoteliais, levando ao desenvolvimento de um fenótipo pró-trombótico consistente com disfunção vascular (WELCH et al., 1998; WILCKEN et al., 1992).

É estimado que 5 a 7% da população geral apresenta HHcy leve ou moderada (MCCULLY, 1996). Como vários estudos caso-controle e epidemiológicos têm indicado que concentrações aumentadas de Hcy plasmática estão associadas com o desenvolvimento de aterosclerose, bem como trombose arterial e venosa (ARONOW et al., 2000), o controle da HHcy leve pode ser importante na prevenção da aterosclerose, principalmente quando outros fatores de risco confirmados estão presentes.

O European Concerted Action Project demonstrou que a HHcy pode ser considerada um fator de risco de magnitude semelhante ao tabagismo e a hipercolesterolemia (GRAHAM et al., 1997). Além disso, este estudo sugere que HHcy leve pode ter um efeito sinérgico com outros fatores de risco, tais como diabetes e hipertensão.

Contudo, estudos prospectivos não conseguiram demonstrar essa associação de modo tão convincente, principalmente quando realizados com indivíduos saudáveis, sem doença cardiovascular prévia (THE HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION, 2002). Esses achados discordantes, entre estudos caso-controle e prospectivos podem decorrer dos diferentes modelos empregados na seleção, objetivos finais, heterogeneidade genética e nutricional, que resultam na análise de diferentes perfis populacionais.

1.3- Mecanismos celulares pelos quais a Hcy promove aterosclerose

1.3.1- Resposta inflamatória

Estudos *in vitro* vêm demonstrando que a HHcy aumenta a produção de várias citocinas pró-inflamatórias. A expressão da proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) está aumentada em culturas de células endoteliais, musculares e monócitos humanos tratados com Hcy. Já se sabe que a MCP-1 aumenta a ligação e o recrutamento do monócito para o espaço endotelial, um passo inicial importante na formação de estrias gordurosas (YLA-HERTTUALA et al., 1989). A Hcy também pode aumentar a expressão de interleucina-8 (IL-8) (PODDAR et al., 2001), um quimiotático para neutrófilos e linfócitos T, na cultura de células endoteliais. Após a indução da HHcy, a expressão de MCP-1 e IL-8 nos monócitos e nas células endoteliais parece ocorrer através da ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), um fator de transcrição relacionado à modulação do processo pró-inflamatório (COLLINS et al., 2001). O NF-κB ativo é encontrado nas lesões ateroscleróticas e estimula a produção de citocinas, interferon, moléculas de adesão leucocitária e fator de crescimento hematopoiético – todos os quais parecem influenciar a inflamação vascular e aterosclerose (COLLINS et al., 2001).

1.3.2- Estresse oxidativo

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a produção de espécies reativas de oxigênio, tais como radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, e uma menor produção de óxido nítrico endotelial seriam os mecanismos centrais pelos quais a exposição vascular a uma concentração aumentada de Hcy levariam a um dano oxidativo nas superfícies vasculares a longo prazo (LOSCALZO et al., 1996).

Um estudo *in vivo* realizado em humanos demonstrou que o aumento moderado da Hcy plasmática após uma sobrecarga de metionina, resultou na diminuição da vasodilatação da artéria braquial, em resposta à infusão de acetilcolina. Este processo foi suprimido na presença de ácido ascórbico antioxidante (KANANI et al., 1999).

1.3.3- Estresse do retículo endoplasmático (RE)

Perturbações na síntese de proteínas no RE acionam uma cascata de sinalização que integra diretamente o lúmen do retículo ao núcleo em células de mamíferos (KAUFMAN, 2004), conhecida como resposta a proteínas não-enoveladas (UPR). Estas vias de sinalização resgatam a homeostase da qualidade da síntese protéica, elevando a expressão das chaperonas do retículo e diminuindo a síntese total ou mesmo a proteólise das proteínas malformadas (SITIA et al., 2003). Desequilíbrios na sinalização da UPR podem conduzir à condição de “estresse do RE” presente em várias patologias (KAUFMAN, 2002; POCKLEY, 2003).

Em mamíferos, as vias da UPR são desencadeadas por três proteínas transmembrana presentes no RE: um fator de transcrição ATF6 e duas quinases IRE1 e PERK (Fig. 3) (KAUFMAN, 2002; SCHRÖDER et al., 2005). A ativação destas vias conduz a um programa de sinalização celular que resulta em uma redução dos fatores de iniciação de tradução e elevação da transcrição de determinados genes (SCHRÖDER et al., 2005).

A chaperona do retículo Grp78 é um elemento chave na UPR atuando como um sensor desta cascata. Em geral ela encontra-se associada às quinases PERK e IRE1 e ao fator ATF6 na porção luminal, regulando a UPR negativamente. Em condições de estresse celular, como o acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo, a Grp78 se desliga destas proteínas, permitindo a homodimerização e auto-fosforilação das quinases PERK e IRE1 (processo reversível) e clivagem do ATF6. Esta ativação aciona vias distais que vão resultar em efeitos biológicos de sobrevivência (principalmente pela elevação da expressão de Grp78 e Grp94) e pró-apoptóticos (expressão de CHOP e XBP1 e também clivagem da procaspase 12) (SCHRÖDER et al., 2005). Estes efeitos são dependentes da qualidade e intensidade de estímulos que desencadeiam ou sustentam os seus componentes (RUTKOWSKI et al., 2006).

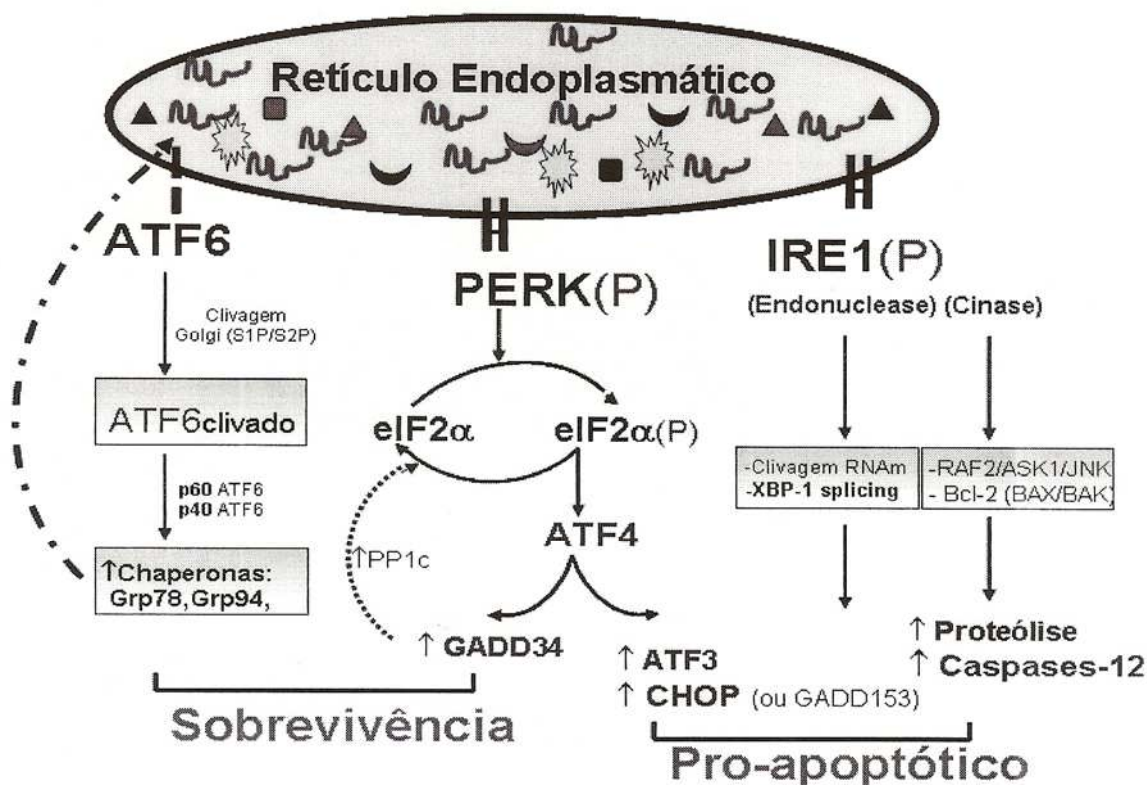


Figura 3- Esquema da resposta celular a UPR em mamíferos.

Legenda:

Grp78 (78-kDa glucose-regulated protein);

Grp94 (94-kDa glucose-regulated protein);

XBP-1 (X-box binding protein-1);

ATF3, ATF4 e ATF6 (fatores de transcrição 3, 4 e 6);

CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein);

PP1c (protein phosphatase-1);

IRE1 (Inositol requiring endoplasmic reticulum-to-nucleus signaling-1);

PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase/pancreatic eIF2α kinase);

PKR (Double-stranded RNA-activating protein Kinase).

Um dos mecanismos de injúria celular, envolvendo a capacidade da Hcy de causar o estresse do RE, está relacionado a reduções na formação de ligações dissulfídicas, levando ao mal-dobramento das proteínas que passam pelo RE (OUTINEN et al., 1999; OUTINEN et al., 1998; RON, 2001). Além disso, muitos estudos demonstram que concentrações elevadas da Hcy intracelular aumentam a expressão de vários genes relacionados ao estresse do RE, incluindo Grp78 e Grp94 (OUTINEN et al., 1999; OUTINEN et al., 1998).

O estresse crônico e transitório do RE observado na HHcy causa várias disfunções celulares envolvidas no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, incluindo alterações na biosíntese dos lipídeos, morte celular programada e inflamação (LAWRENCE DE KONING et al., 2003).

1.3.4- Mecanismos adicionais

A HHcy também foi associada com estados pró-trombóticos. Durand et al (1997) sugeriram que a HHcy aumentaria a agregação das plaquetas e a produção do fator tecidual. Além disso, o aumento da ativação de fatores de coagulação, tais como, fator V, X e XII e a diminuição da ativação de proteína C e da trombomodulina estariam relacionados com a HHcy (LENTZ et al., 1991).

Outros estudos sugerem que o aumento na concentração de Hcy estimularia a proliferação de células musculares lisas (LUBEC et al., 1996), e aumentaria a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (HIRANO et al., 1994).

1.4- Modelos animais de HHcy

Estudos utilizando modelos animais de HHcy, induzida tanto através da dieta como por deficiência genética de enzimas envolvidas no metabolismo da Hcy, têm mostrado que HHcy moderada ou grave acelera o desenvolvimento da aterosclerose (KONING DE LAWRENCE et al., 2003). Além disso, estes estudos corroboram muitos mecanismos propostos *in vitro* e fornecem uma maior perspectiva fisiológica da função da Hcy na indução da doença cardiovascular.

A HHcy plasmática pode ser induzida através da dieta e/ou modificações genéticas. O enriquecimento da dieta com metionina e/ou diminuição de vitamina B₁₂, B₆ e ácido fólico é utilizado para induzir HHcy leve a grave. Camundongos geneticamente modificados, com deficiência de MTHFR ou CBS, são utilizados como modelos animais de HHcy. Camundongos com deficiência em homozigose para CBS apresentam concentrações de Hcy plasmática 40 vezes maior que o normal, desenvolvendo retardamento mental, *ectopia lentis* e esteatose hepática – alterações fenotípicas também observadas em pacientes com deficiência em homozigose da CBS (WATANABE et al., 1995). Entretanto, os camundongos com deficiência em heterozigose da CBS não apresentam as mesmas alterações que os camundongos homozigotos, exceto que a HHcy leve presente nesses animais, após um longo período, causou disfunção endotelial pela diminuição do óxido nítrico vascular (EBERHARDT et al., 2000; WEISS et al., 2002). Coelhos e macacos alimentados com dieta para induzir a HHcy também apresentaram disfunção endotelial (LANG et al., 2000; LENTZ et al., 2000; LENTZ et al., 2001b). Embora os camundongos com deficiência da CBS e os modelos não-murinos de HHcy apresentaram disfunção endotelial, é importante ressaltar que eles não desenvolveram aterosclerose.

Camundongos com deficiência da MTHFR foram desenvolvidos para avaliar o efeito da HHcy resultante de deficiências genéticas na via de remetilação (CHEN et al., 2001). Embora os camundongos com deficiência da MTHFR compartilhem similaridades fenotípicas básicas com os camundongos deficientes em CBS, eles são os únicos que apresentam predisposição para desenvolver aterosclerose. Camundongos idosos homozigotos ou heterozigotos para MTHFR acumulam lipídeos na artéria aorta proximal (CHEN et al., 2001). Isto é significativo, dado que as concentrações de lipídeos no plasma

são normais nesses animais. Contudo, as inclusões lipídicas na aorta não são semelhantes às lesões encontradas em modelos murinos de aterosclerose, tais como os camundongos com deficiência de apolipoproteína E (apoE^{-/-}) e os camundongos com deficiência dos receptores para LDL (LDLR^{-/-}).

Estudos têm demonstrado que HHcy moderada ou grave acelera a aterosclerose em camundongos apoE^{-/-} (ZHOU et al., 2001; HOFMANN et al., 2001). Zhou et al (2001) mostrou que camundongos apoE^{-/-} alimentados com dietas enriquecidas em metionina ou Hcy desenvolveram lesões arteriais maiores, mais numerosas e mais complexas, comparados aos camundongos alimentados com dieta controle. Uma importante característica destas alterações patológicas foi que elas ocorreram sem uma elevação significativa nas concentrações de lipídeos no plasma. A maioria das lesões era rica em colágeno, favorecendo a hipótese que a Hcy estimularia a proliferação de células musculares lisas (MAJORS et al., 1997; MAJORS et al., 2002). Hofmann et al (2001) demonstrou que os camundongos apoE^{-/-} alimentados com dietas enriquecidas com metionina para induzir HHcy moderada apresentaram um aumento significativo na área de lesão aterosclerótica, comparados aos camundongos alimentados com dietas controle. Além disso, a HHcy induzida pela dieta favoreceu a ativação de NF-κB no tecido aórtico, levando ao aumento na expressão da molécula de adesão celular expressa pelo endotélio vascular-1 (VCAM-1), assim como de mediadores pró-inflamatórios, tais como receptor para produtos de glicosilação avançada (RAGE) e ligante transdutor de sinal para RAGE (EN-RAGE).

1.5- Modelos animais apoE^{-/-}

A apolipoproteína E (apoE) é uma das dez apolipoproteínas que mediam o metabolismo das partículas lipoprotéicas. A apoE e suas isoformas assim como seus defeitos genéticos são relacionados a dislipidemias e doença arterial. Elas atuam como um ligante para o receptor de LDL (LDLR), e são cruciais tanto para a remoção direta das lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), como para sua conversão em partículas lipoprotéicas menores.

Em humanos, a deficiência de apoE gera acúmulo de IDL e quilomícrons, levando a um quadro de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, com acúmulo das beta-VLDL, que são aterogênicas, numa condição conhecida como disbetalipoproteinemia (ou hiperlipoproteinemia tipo III), caracterizada por desenvolvimento precoce de doença aterosclerótica e aparecimento de xantomas planares (GHISELLI et al., 1981).

Em 1992, camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes em apoE criados em laboratório por recombinação homóloga de células primordiais embrionárias, desenvolveram hipercolesterolemia grave e lesões ateroscleróticas precocemente, com características e distribuição semelhantes às encontradas em humanos (ZHANG et al., 1992). Estes animais desenvolveram não apenas lesões gordurosas, mas também placas de fibrose em sítios vasculares tipicamente afetados em humanos.

O desenvolvimento de hipercolesterolemia e destas lesões são evidentes e exacerbados quando os animais são expostos a uma dieta rica em colesterol e gordura, tipo Western (contendo 0,15% de colesterol e 21% de gordura). Através de estudo cromatográfico foi identificado que este aumento de colesterol dava-se principalmente pelas frações da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e IDL. É interessante ressaltar que estes resultados foram obtidos com animais homozigotos para a deficiência. Animais heterozigotos não apresentaram diferenças significativas nos níveis de lípides ou lipoproteínas, mesmo quando submetidos a uma dieta tipo Western.

1.6- Modelos animais LDLR^{-/-}

Em 1994, Ishibashi et al, através de recombinação homóloga de células primordiais embrionárias, desenvolveram uma linhagem de camundongos LDLR^{-/-} da linhagem C57BL/6, que fenotipicamente manifestam diminuição do *clearance* de VLDL, IDL e LDL no plasma.

Como resultado, o nível médio de colesterol plasmático total se eleva acima de 2 vezes, com aumento de sete a nove vezes nos níveis de IDL e LDL. Quando estes animais são submetidos a um período mais prolongado com dieta aterogênica, desenvolvem lesões

arteriais com placa fibrosa, como a encontrada em humanos (BRESLOW, 1993).

1.7- Modelos animais com deficiência de fator IX

O desenvolvimento de camundongos deficientes em fator IX (FIX) por *knockout* gênico permitiu a investigação *in vivo* das funções desse fator. De maneira geral, esses animais mimetizam a doença hemorrágica em humanos, denominada de hemofilia B, e apresentam herança ligada ao cromossomo X, reproduzindo-se normalmente.

A hemofilia B é uma coagulopatia hereditária mais freqüente em homens, e dessa forma possibilita determinar o papel do FIX no desenvolvimento das complicações vasculares da aterosclerose, no grupo de indivíduos de maior risco até a quinta década de vida. Em estudo publicado em 1989 sobre mortalidade e causas de óbito em hemofílicos na Holanda, Rosendaal et al sugeriu que a mortalidade por doença coronariana isquêmica em hemofílicos é menor que na população geral, não somente pelas diferenças relacionadas aos fatores de risco, mas sim por um efeito protetor relacionado a deficiência do FIX. Posteriormente, esta observação inicial foi confirmada por um estudo comparativo de fatores de risco para doença coronariana isquêmica entre hemofílicos e a população geral (ROSENDAAL et al., 1990). Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar essa baixa incidência, tentando associar a importância da trombose e fatores pró-cogulantes à patogênese do ateroma e da obstrução arterial. Primeiro, estes pacientes teriam uma sobrevida menor, não chegando na grande parte dos casos à faixa etária de maior risco para desenvolver doença aterosclerótica, o que atualmente não se justificaria frente às novas terapêuticas aplicadas à doença. Segundo, por algum mecanismo desconhecido, esses pacientes desenvolveriam menos ateromatose, e terceiro, eles teriam uma menor tendência a formar trombos oclusivos nos vasos com ateromatose. A ação protetora nestes pacientes pode ser relacionada à menor geração de trombina, ou pela ação direta destes fatores na aterogênese.

Três modelos de grandes deleções do gene do FIX foram gerados, por laboratórios distintos e com semelhanças quanto ao fenótipo e características reprodutivas.

Utilizando-se de método *plug-socket* de manipulação de genes, Lin et al desenvolveram em 1997, um modelo murino deficiente em FIX, substituindo o promotor do exon 3 do gene do FIX pelo neo Δ HPRT, que é um gene funcional, mais o minigene parcialmente deletado da hipoxixantina fosforibosil transferase.

Os vários modelos animais utilizados em estudos da hemostasia demonstraram que a coagulação parece interferir no processo de aterosclerose. Em modelos de hipocoagulação, como na deficiência de fator de von Willebrand ou do inibidor do ativador de plasminogênio tipo-1 (PAI-1), verificou-se redução das lesões ateroscleróticas, principalmente nos pontos onde a coagulação parece mais ativada (bifurcações e turbilhonamentos), com influência na presença das lesões, no tempo para seu aparecimento e nas suas características.



2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Através do controle estrito da dieta, induzir HHcy leve nos camundongos normais, com hemofilia B, camundongos LDLR^{-/-} e camundongos apoE^{-/-};
- Determinar as concentrações de Hcy plasmática, vitamina B₁₂ e ácido fólico dos camundongos, antes e após o recebimento das dietas;
- Avaliar o efeito das dietas sobre o desenvolvimento da aterosclerose;
- Analisar o efeito da concentração plasmática de Hcy, obtida com diferentes dietas, sobre o estresse do RE nos camundongos normais e apoE^{-/-}.



3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Modelos animais

Os procedimentos envolvendo animais estão de acordo com os princípios éticos na experimentação, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental teve aprovação do CEEA (Comissão de Ética na Experimentação Animal) do Instituto de Biologia da Unicamp, sob número 624-1.

Os camundongos machos hemofílicos B e os camundongos machos normais, ambos da linhagem C57BL/6, foram fornecidos pelo CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp) com idade de 3 a 5 semanas. Os animais com deficiência de FIX foram doados pela Dra. Katherine High do The Children's Hospital of Philadelphia.

Tanto os camundongos machos LDLR^{-/-} (ISHIBASHI et al., 1994) como os camundongos machos apoE^{-/-} (PLUMP et al., 1992; ZHANG et al., 1992), também da linhagem C57BL/6, são provenientes do Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME, EUA) e foram mantidos no Biotério do Laboratório de Hemostasia e Pesquisa (Certificado de Biossegurança Hemocentro: CQB 0072/98, com data de publicação em 30 de setembro de 1998).

Ficou definido que cada grupo de animais seria constituído por 8 a 12 camundongos.

3.2- Dieta

Os camundongos foram mantidos com ração para roedores Nuvilab CR-1 (Nuvital), fornecida pelo Biotério do Núcleo de Medicina-Unicamp, até a idade de 8 semanas. Posteriormente os animais foram divididos em quatro grupos, recebendo quatro dietas específicas, tais como:

- Grupo 1: dieta normal (ração para roedores Nuvilab CR-1) (dieta A);

- Grupo 2: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dieta B);
- Grupo 3: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dieta C);
- Grupo 4: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dieta D).

A ração enriquecida com ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ e a ração deficiente em ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ foram adquiridas da empresa HN&C Consultoria, vinculada ao ITAL (Instituto Tecnológico de Alimentos). As rações foram formuladas de acordo com a dieta AIN93M (REEVES et al., 1993), com modificações nas concentrações de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Os animais receberam L-Metionina (Ajinomoto) por gavage (0.5 g/Kg de peso por dia), conforme avaliação semanal do peso de cada animal. Como os animais alimentados com as dietas A e D não recebiam metionina, eles foram gavados com água.

Os camundongos normais foram alimentados com as dietas específicas por 8 e 24 semanas; os camundongos hemofílicos B, apenas por 8 semanas; e os camundongos LDLR^{-/-} e apoE^{-/-}, por 8 e 20 semanas.

3.3- Coleta de sangue

Foram realizadas duas coletas de sangue de cada camundongo. A primeira coleta foi realizada antes de qualquer dieta e a segunda coleta, após o recebimento das dietas específicas.

As coletas de sangue foram feitas com os camundongos sob anestesia inalatória, por via caudal ou retro-orbital. Foi coletado 400 a 700 µL de sangue em *ependorf* contendo 18 a 29 µL de EDTA a 10%, sendo posteriormente centrifugado a 3.000 rpm durante 15 minutos. Foram separadas duas alíquotas de plasma, sendo uma para

a dosagem de Hcy plasmática (armazenada a -80°C), e a outra para a dosagem de colesterol, ácido fólico e vitamina B₁₂ (armazenadas a -20°C).

3.4- Extração de DNA

A extração do DNA murino foi realizada com kit para extração de DNA (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit – Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, EUA).

3.5- Genotipagem

3.5.1- Genotipagem para os alelos do gene do FIX

A amplificação do DNA genômico para identificação do gene do FIX murino normal ou mutante (LIN et al., 1997) foi realizada utilizando um termociclador automático (PTC 100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research) a partir da reação com 1,5 μL do DNA genômico, 2,5 μL de tampão de reação (Tris HCl a 75 mM, pH 9,0), 0,8 μL de MgCl_2 a 50mM, 0,5 μL de dNTP a 10 mM, 0,3 μL de 10 pmol/ μL de cada *primer*, e 1,5 U de Taq polimerase. Os *primers* utilizados estão descritos abaixo:

P1: 5'-AACAgggATAgTAAGATTgTTCC-3' gene do FIX normal (sense).

P2: 5'-AgCTATggAATTACATgAAC-3' gene do FIX normal (antisense).

P3: 5'-ATATACAgTTACCAAATTCaG-3' gene do FIX mutante (sense).

P4: 5'-CAgTAATgTTgACTgTATTTTCCAA-3' gene do FIX mutante (antisense).

Os parâmetros da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizados foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 4 minutos a 94°C , seguidos por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação do DNA a 94°C , 1 minuto para anelamento dos *primers* a

52°C, 1 minuto e 30 segundos para extensão do DNA a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

O gene do FIX mutante envolvido contém uma sequência adicional que rompe com o gene normal (identificado pelo uso dos *primers* P3 e P4). O material amplificado pela PCR relativo à cópia normal do FIX é identificado por um fragmento de 1.0 kb, enquanto o gene mutante (que inclui a sequência artificial) gera um produto de 1.4 kb.

O material amplificado pela PCR foi submetido à corrida em gel de agarose 1,5% (Fig. 4). As amostras foram aplicadas no gel da seguinte maneira: no primeiro poço foi aplicado o material obtido com *primers* relacionados ao gene normal (P1 e P2) e, no segundo poço, o material obtido com os *primers* relacionados ao gene mutante (P3 e P4).

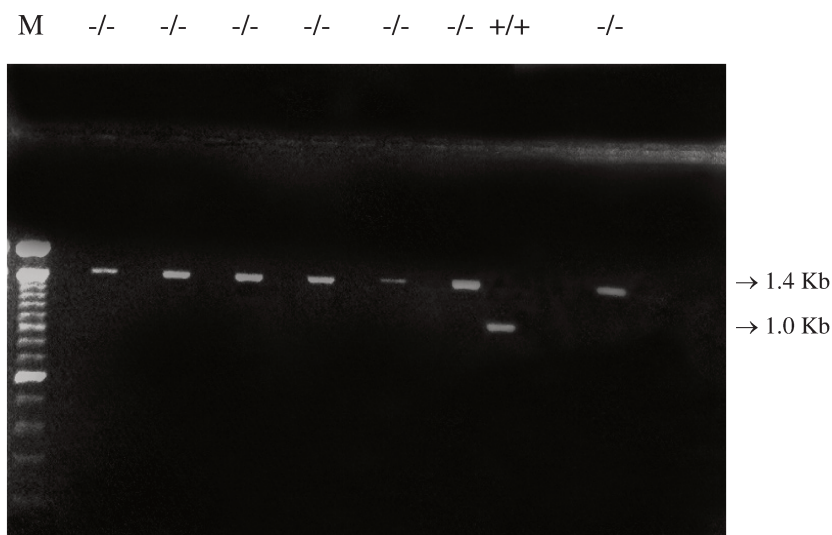


Figura 4- Gel de eletroforese para identificação do gene do FIX.

Legenda:

-/- (camundongo hemofílico B).

+/+ (camundongo normal).

M: marcador (100pb DNA Ladder, Gibco BRL).

3.5.2- Genotipagem para os alelos do gene da apoE

A amplificação do DNA genômico para identificação do alelo normal ou mutante do gene da apoE foi realizada conforme o protocolo do Laboratório Jackson (www.jax.org), utilizando-se os seguintes *primers*:

- oIMR0180 (5'-gCCTAgCCgAgggAgAgCCg-3');
- oIMR0181 (5'-TgTgACTTgggAgCTCTgCAgC-3');
- oIMR0182 (5'-gCCgCCCCgATgCATCT-3').

O produto da PCR para o alelo normal do gene da apoE apresenta um fragmento de 155pb e para o alelo mutante um fragmento de 245pb (Fig. 5).

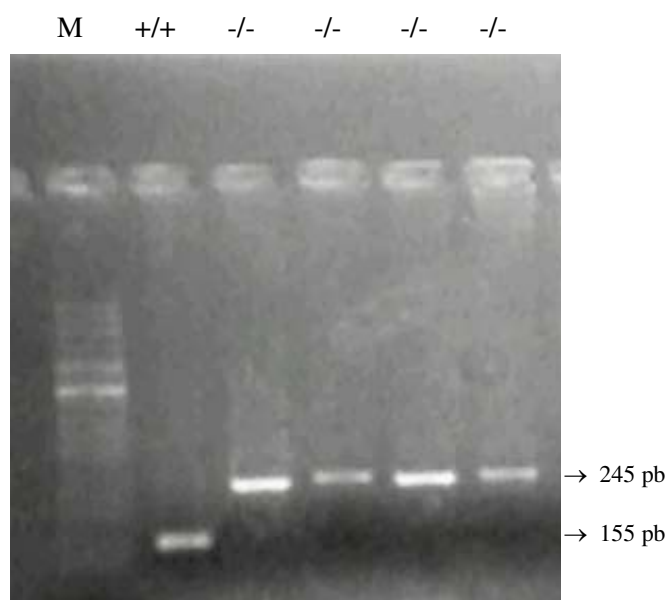


Figura 5- Gel de eletroforese para identificação do gene da apoE.

Legenda:

-/- (camundongo homozigoto para a deficiência da apoE).

+/+ (camundongo normal).

M: marcador (100pb DNA Ladder, Gibco BRL).

3.5.3- Genotipagem para os alelos do gene do LDLR

A amplificação do DNA genômico para identificação do alelo normal ou mutante do gene do LDLR foi realizada conforme o protocolo do Laboratório Jackson, utilizando-se os seguintes *primers*:

- oIMR0046 (5'-ACCCCAAgACgTgCTCCCAggATg-3');

- oIMR059 (5'-CgCAgTgCTCCTCATCTgACTTgT-3');

- oIMR014 (5'-AggTgAgATgACAaggAgATC-3').

Na primeira reação foram adicionados os *primers* oIMR0046 e oIMR059; e na segunda reação, os *primers* oIMR0046 e oIMR014.

O produto da PCR para o alelo normal do LDLR apresenta um fragmento de 400pb, e para o alelo mutante um fragmento de 800pb (Fig. 6).

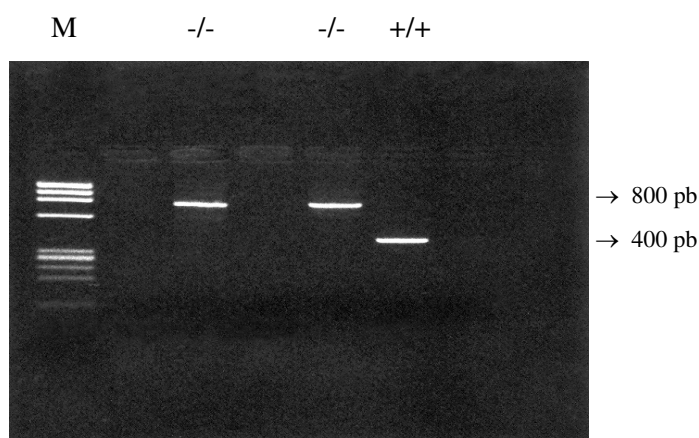


Figura 6- Gel de eletroforese para identificação do gene do LDLR.

Legenda:

-/- (camundongo homozigoto para a deficiência do LDLR).

+/+ (camundongo normal).

M: marcador (Φ X174 DNA – Hae III, Gibco BRL).

3.6- Dosagem da Hcy plasmática

A dosagem de Hcy foi padronizada por Cromatografia Líquida da Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massa (HPLC/MS/MS), utilizando-se o equipamento Q-Trap (Applied-Biosystems-QqQTrap). Cada amostra foi preparada com 50 µL de plasma murino, 10 µL de homocistina-d₈, utilizado como padrão interno, 10 µL de Dithiotreitol (DTT-500 mM) e agitada em vortex durante 15 segundos. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 100 µL de uma mistura desproteinizante constituída de acetonitrila, ácido fórmico e ácido trifluoracético (TFA) (100mL:0,1:mL:0,05 mL), agitado em vortex durante 1 minuto, e centrifugado a 3600 rpm durante 15 minutos. Retirou-se 10 µL do sobrenadante e injetou-se em uma coluna C18 de 5 µm de comprimento. Foram monitoradas as dissociações dos íons m/z 136 $\rightarrow$ m/z 90 da Hcy e m/z 140 $\rightarrow$ m/z 94 para a homocisteína-d₄. As curvas de calibração e adição de padrão em matriz biológica mostrou ótimos resultados ($r^2=0,9972$), como apresentado na Figura 7.

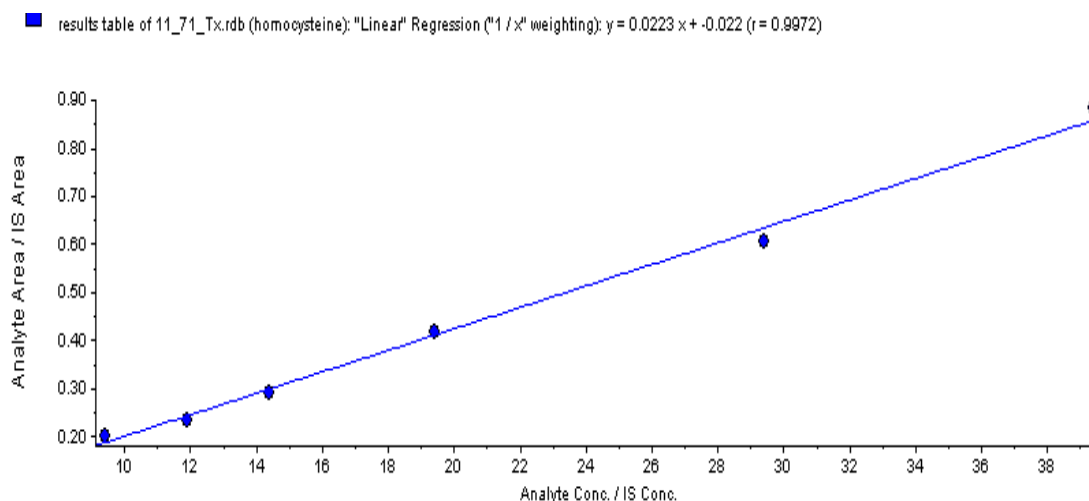


Figura 7- Curva analítica em matriz biológica: Hcy (m/z 90) e homocisteína-d₄ (m/z 94) nas concentrações de 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 60.0 mmolar.

3.7- Análise do ácido fólico e vitamina B₁₂

As dosagens de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram realizadas com o kit da Dualcount de fase sólida sem fervura (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, EUA), teste de radioimunoensaio desenvolvido para a medida simultânea de vitamina B₁₂ e ácido fólico (LEE et al., 2004). No procedimento estão envolvidas três etapas: desnaturação alcalina de proteínas endógenas, competição pelo ligante purificado em pH de 9,3 e separação da fase sólida.

3.8- Análise do colesterol

As concentrações plasmáticas do colesterol total (Roche®) foram determinadas com kit enzimático colorimétrico conforme as instruções do fabricante.

3.9- *Western-blot*

Foi realizada a técnica de *western-blot*, utilizando-se o anticorpo anti- KDEL que marca as chaperonas Grp78 e Grp94, para avaliar o estresse do RE nos camundongos normais e apoE^{-/-}.

As carótidas foram trituradas em nitrogênio líquido e submetidas à extração de proteínas com tampão de lise contendo 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% Glicerol, 1% Triton, 1 mM EGTA, 1,5 mM MgCl₂, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina e 1 mM PMSF. Os extratos (30µg) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% a uma corrente de 25 mA por gel. A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi obtida pelo sistema de transferência semi-seco por 1 hora a uma corrente de 50 mA. A eficiência da transferência foi analisada pela detecção de proteínas na membrana com o reagente Ponceau. A membrana foi submetida ao bloqueio com TBS contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite desnatado por 2 horas. Após lavagem com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo anti- KDEL (1:1000) (Stressgen)

overnight à 4°C. Decorrido este período, a membrana foi lavada com TBS-T, incubada com anticorpo secundário anti-mouse-HRP (1:2000) (Calbiochem) por 1 hora, submetida à reação quimiluminescente com ECL (Enhanced Chemiluminescence System-ECL, Amersham) e exposta a filmes autoradiográficos. As imagens obtidas das membranas foram quantificadas no programa Scion Image.

3.10- Análise histológica

3.10.1- Quantificação das lesões do seio aórtico

Após perfusão com salina, seguido de solução neutra de formalina a 10% no ventrículo esquerdo, o coração foi retirado e mantido em formalina 10% durante pelo menos dois dias. O coração foi embebido em gelatina G2500 tipo A (Sigma) sequencialmente em 5%, 10% e 25%. Os cortes foram processados e corados como previamente descrito (PAIGEN et al., 1987). Resumidamente, após aplicação de *tissue-tek optimum cutting temperature compound* (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) nos blocos de gelatina contendo os corações, estes foram cortados transversalmente em criostato (HM 560 Microm) a uma temperatura de -25°C com uma espessura de 10 µm. As lâminas contendo 8 cortes foram coletadas a partir do aparecimento das válvulas semi-lunares até seu desaparecimento. Assim, foi utilizado um microscópio para visualizar a localização das válvulas semi-lunares na aorta. Os cortes foram corados com Oil Red-O (0,24%) e contra-corados com Light Green (0,25%) e Hematoxilina de Harris (2,4%). As lesões lipídicas foram quantificadas como descrito por Rubin et al (1991), usando o programa Image Pro Plus software (versão 3.0). As lâminas foram lidas antes da identificação dos genótipos e no aumento de 20x. A área da lesão foi expressa como a soma das lesões em 6 cortes de 10 µm, obtidos a uma distância de 80 µm entre eles, ao longo de uma extensão de 480 µm da aorta.

3.11- Análise estatística

No presente trabalho, aplicamos a análise de média $\pm$ desvio padrão para as variáveis contínuas. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação das variáveis contínuas entre dois grupos. O nível de significância empregado foi de 5%.



4- RESULTADOS

4.1- Camundongos normais

Inicialmente foi realizado um piloto onde oito camundongos normais foram tratados com as quatro dietas específicas por um período de 8 semanas. Antes do início das dietas, os valores de média e desvio padrão da Hcy plasmática, vitamina B₁₂ e ácido fólico foram $2,6 \pm 0,8$ $\mu\text{mol/L}$ (n=8); 15.081 ± 2.072 pmol/L (n=8); e $77,3 \pm 20,7$ ng/mL (n=8), respectivamente.

Após receber as dietas, os camundongos alimentados com as dietas B, C e D apresentaram concentração aumentada da Hcy plasmática quando comparados aos camundongos alimentados com a dieta A (Tabela 1).

As concentrações de vitamina B₁₂ e ácido fólico estavam diminuídas nos camundongos alimentados com dietas B e D comparados aos camundongos alimentados com as dietas A e C (Tabela 1). Além disso, os camundongos alimentados com dieta C apresentaram as maiores concentrações de vitamina B₁₂ quando comparados com os camundongos alimentados com as outras dietas.

A análise histológica do seio aórtico mostrou que os camundongos normais não desenvolveram lesão aterosclerótica no seio aórtico após 8 semanas de dieta, mesmo na presença da HHcy leve.

Tabela 1- Valores de média e desvio padrão da Hcy, ácido fólico e vitamina B₁₂ dos camundongos normais alimentados com as dietas específicas por 8 semanas.

	Antes da dieta (n=8)	Dieta A (n=2)	Dieta B (n=2)	Dieta C (n=2)	Dieta D (n=2)
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	2,6 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 0,6	20,7 $\pm$ 0,5	14,5 $\pm$ 1,5	12,5 $\pm$ 0,1
B₁₂ (pmol/L)	15.081 $\pm$ 2.072	18.427 $\pm$ 3.044	8.695 $\pm$ 521	29.837 $\pm$ 1.205	9.779 $\pm$ 124
Ác. Fólico (ng/mL)	77,3 $\pm$ 20,7	81,6 $\pm$ 23,3	8,4 $\pm$ 1,6	25,4 $\pm$ 7,9	7,5 $\pm$ 1,9

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Como os camundongos normais não desenvolveram lesão aterosclerótica no seio aórtico após 8 semanas de dieta, prolongou-se o período com diferentes dietas para 24 semanas. Foram tratados 25 camundongos normais por 24 semanas. Antes da dieta, os valores de média e desvio padrão da Hcy plasmática, vitamina B₁₂ e ácido fólico foram 1,5 $\pm$ 0,7 $\mu\text{mol/L}$ (n=25); 12.344 $\pm$ 3.202 pmol/L (n=25); e 76,4 $\pm$ 12,7 ng/mL (n=25), respectivamente.

A tabela 2 apresenta os valores da Hcy plasmática, ácido fólico e vitamina B₁₂ dos camundongos normais após 24 semanas de dietas. Os camundongos alimentados com dietas B, C e D apresentaram HHcy leve. As concentrações de vitamina B₁₂ e ácido fólico estavam diminuídas nos camundongos alimentados com dietas B e D comparados aos camundongos alimentados com as dietas A e C (p<0,01). Além disso, os camundongos alimentados com dieta C apresentaram as maiores concentrações de vitamina B₁₂ quando comparados com os camundongos alimentados com as outras dietas (p<0,01).

A análise histológica do seio aórtico não mostrou formação de lesão aterosclerótica nos camundongos normais, após 24 semanas de dieta, mesmo na presença da HHcy (Fig. 8).

Tabela 2- Valores de média e desvio padrão da Hcy, ácido fólico e vitamina B₁₂ nos camundongos normais alimentados com as dietas específicas por 24 semanas.

	Antes da dieta (n=25)	Dieta A (n=4)	Dieta B (n=6)	Dieta C (n=10)	Dieta D (n=5)
Hcy (μmol/L)	1,5±0,7	3,0±0,8	18,2±7,2	12,1±6,0	9,3±2,6 ^c
B₁₂ (pmol/L)	12.344±3.202	18.964±4.024	7.227±1.229	30.889±4.076	8.738±1.372
Ác. Fólico (ng/mL)	76,4±12,7	72,1±18,7	9,6±4,8	63,2±13,0	10,6±4,2

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Análise Estatística: (1) **Hcy:** dieta A vs dieta B, p<0,01; dieta A vs dieta C, p<0,01 e dieta A vs dieta D, p<0,01. (2) **B₁₂:** dieta A vs dieta B, p<0,01; dieta A vs dieta C, p<0,01; dieta A vs dieta D, p<0,01; dieta C vs dieta B, p<0,01 e dieta C vs dieta D, p<0,01. (3) **Ác. fólico:** dieta A vs dieta B, p<0,01; dieta A vs dieta D, p<0,01; dieta C vs dieta B, p<0,01 e dieta C vs dieta D, p<0,01.

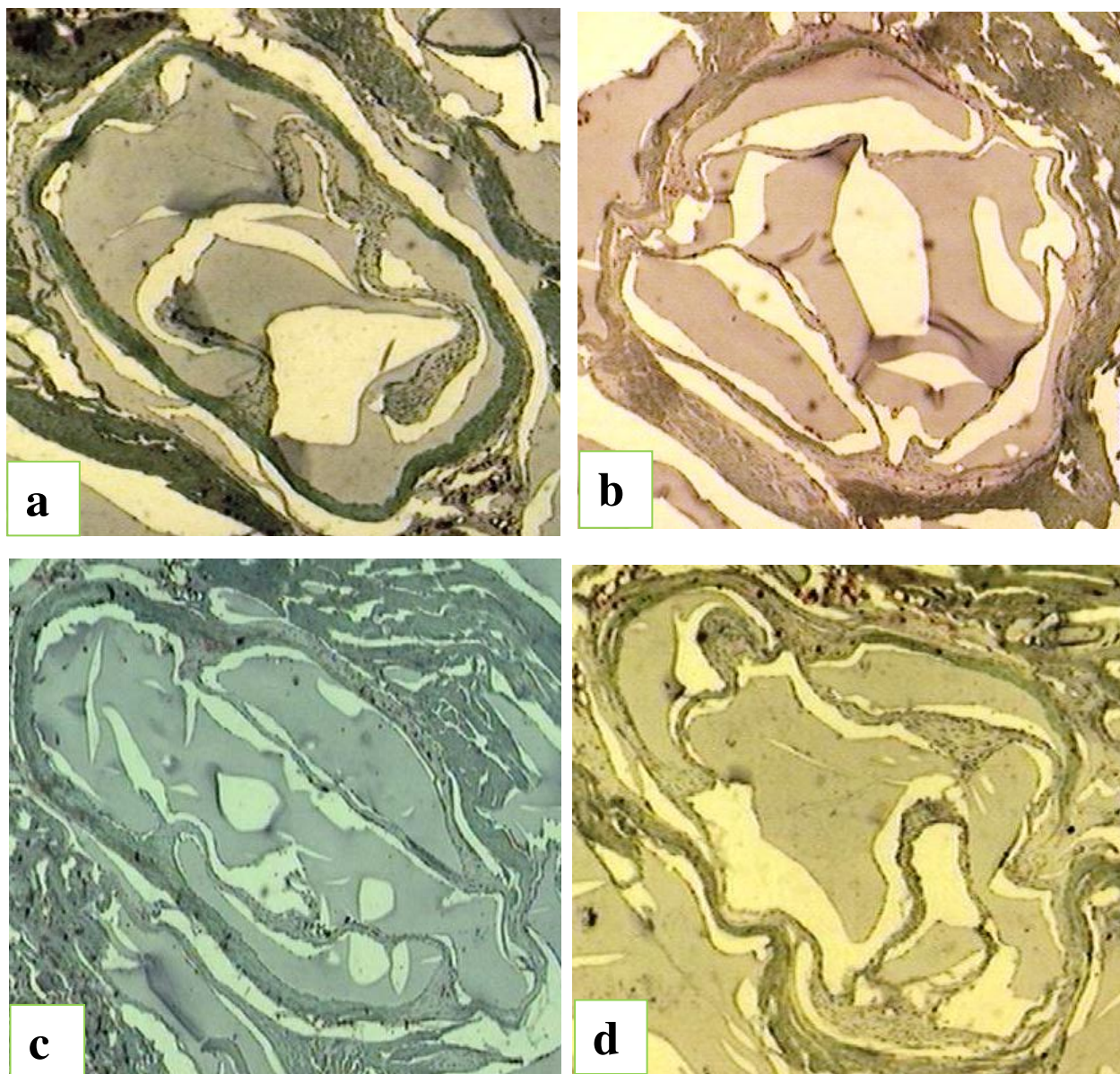


Figura 8- Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos normais (C57BL/6) alimentados com diferentes dietas por 24 semanas, não mostrando lesões ateroscleróticas.

Os cortes foram submetidos à coloração com Oil Red, Light Green e Hematoxilina. O painel (a) representa o grupo com dieta A, (b) o grupo com dieta B, (c) o grupo com dieta C e (d) o grupo com dieta D.

4.2- Camundongos hemofílicos B

Foi realizada a genotipagem para os alelos do gene do FIX em todos os animais com hemofilia B, confirmando a presença da mutação.

Tivemos algumas dificuldades em manter os camundongos hemofílicos B até o final da dieta (período de 8 semanas), devido aos sangramentos e hematomas.

Foram tratados 13 camundongos hemofílicos B. Antes da dieta, os valores de média e desvio padrão da Hcy plasmática, vitamina B₁₂ e ácido fólico foram $1,9 \pm 1,4$ $\mu\text{mol/L}$ (n=13); 14.821 ± 2.380 pmol/L (n=13); e $52,6 \pm 15,2$ ng/mL (n=13), respectivamente.

A tabela 3 mostra as concentrações da Hcy plasmática, vitamina B₁₂ e ácido fólico dos camundongos hemofílicos B após 8 semanas de dieta. Os camundongos alimentados com as dietas B e C apresentaram concentrações estatisticamente aumentadas de Hcy plasmática quando comparados aos camundongos alimentados com a dieta A ($p=0,02$ e $p=0,03$, respectivamente). As concentrações de ácido fólico estavam diminuídas nos camundongos alimentados com as dietas B, quando comparados aos camundongos alimentados com as dietas A e C ($p<0,05$).

A análise histológica do seio aórtico nos camundongos hemofílicos B mostrou que nenhum camundongo alimentado com as dietas específicas por 8 semanas desenvolveu lesão aterosclerótica. O período de dieta não pode ser prolongado para 24 semanas devido ao alto índice de mortalidade.

Tabela 3- Valores de média e desvio padrão da Hcy, ácido fólico e vitamina B₁₂ nos camundongos hemofílicos B tratados com as dietas específicas por 8 semanas.

	Antes da dieta (n=13)	Dieta A (n=3)	Dieta B (n=4)	Dieta C (n=4)	Dieta D (n=2)
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	1,9 $\pm$ 1,4	1,6 $\pm$ 0,8	22,6 $\pm$ 12,8	6,2 $\pm$ 5,0	7,1 $\pm$ 0,05
B₁₂ (pmol/L)	14.821 $\pm$ 2.380	15.666 $\pm$ 2.427	8.926 $\pm$ 3.056	27.520 $\pm$ 6.952	11.462 $\pm$ 1.711
Ác. fólico (ng/mL)	52,6 $\pm$ 15,2	52,3 $\pm$ 22,4	10,3 $\pm$ 4,6	42,7 $\pm$ 28,0	6,2 $\pm$ 1,7

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Análise Estatística: (1) **Hcy**: dieta A vs dieta B, p=0,02 e dieta A vs dieta C, p=0,03. (2) **B₁₂**: dieta A vs dieta B, p=0,03; dieta A vs dieta C, p=0,03 e dieta C vs dieta B, p=0,01. (3) **Ác. fólico**: dieta A vs dieta B, p=0,03 e dieta C vs dieta B, p=0,01.

4.3- Camundongos apoE^{-/-}

Foi realizada a genotipagem para os alelos do gene da apoE, confirmando a presença da mutação. Foram tratados 40 camundongos apoE^{-/-} por 8 semanas e 42 camundongos apoE^{-/-} por 20 semanas, com as quatro dietas específicas, totalizando 82 camundongos.

Antes do início das dietas os valores de média $\pm$ desvio padrão da Hcy plasmática foram: 1,6 $\pm$ 0,7 $\mu\text{mol/L}$ (n=31) para o grupo que recebeu as dietas por 8 semanas, e 2,5 $\pm$ 0,9 $\mu\text{mol/L}$ (n=42) para o grupo que recebeu as dietas por 20 semanas.

A tabela 4 mostra as concentrações da Hcy plasmática dos camundongos apoE^{-/-} após 8 e 20 semanas de dieta. A análise estatística demonstrou que os camundongos alimentados com as dietas B, C e D, tanto por 8 como por 20 semanas, apresentaram um aumento estatisticamente significativo na concentração da Hcy plasmática, quando comparados aos camundongos alimentados com a dieta A (p<0,05).

Tabela 4- Valores de média e desvio padrão da Hcy plasmática de acordo com as dietas.

	Hcy (µmol/L) 8 semanas de dieta	Hcy (µmol/L) 20 semanas de dieta
Antes da dieta	1,6±0,7 (n=31)	2,5±0,9 (n=42)
Dieta A	3,7±1,8 (n=10)	3,1±0,9 (n=10)
Dieta B	15,8±12,1 (n=7)	17,1±6,1 (n=10)
Dieta C	10,9±4,5 (n=8)	11,9±8,6 (n=11)
Dieta D	8,6±6,0 (n=7)	8,3±3,7 (n=11)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Nos animais alimentados por 8 semanas, a comparação das concentrações de Hcy plasmática entre os grupos de acordo com as dietas, mostraram que os seguintes valores de *P*: dieta A vs dieta B, p<0,01; dieta A vs dieta C, p<0,01 e dieta A vs dieta D, p=0,03. A comparação da Hcy entre os grupos alimentados por 20 semanas demonstrou que dieta A vs dieta B, p<0,01; dieta A vs dieta C, p<0,01 e dieta A vs dieta D, p<0,01.

Os valores de média e desvio padrão da vitamina B₁₂ antes da administração das dietas para o grupo de animais tratados por 8 semanas foi 12.695±4.570 pmol/L e para o grupo de camundongos tratados por 20 semanas foi 10.584±5.586 pmol/L.

A tabela 5 apresenta os valores de vitamina B₁₂ antes e após o recebimento das dietas. Podemos observar que os camundongos tratados com a dieta C apresentaram as maiores concentrações de vitamina B₁₂ quando comparados com os outros grupos (p<0,01). Além disso, os camundongos que receberam dietas B e D mostraram as menores concentrações de vitamina B₁₂ (p<0,01).

Tabela 5- Valores de média e desvio padrão da vitamina B₁₂ de acordo com as dietas.

	Vitamina B₁₂ (pmol/L) 8 semanas de dieta	Vitamina B₁₂ (pmol/L) 20 semanas de dieta
Antes da dieta	12.695±4.570 (n=30)	10.584±5.586 (n=42)
Dieta A	16.123±3.582 (n=10)	7.801±2.780 (n=10)
Dieta B	6.639±3.420 (n=10)	4.280±1.438 (n=10)
Dieta C	26.957±8.803 (n=10)	36.378±7.077 (n=11)
Dieta D	11.056±2.196 (n=8)	2.630±702 (n=11)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

O resultado da análise estatística, tanto no grupo tratado por 8 semanas como no grupo tratado por 20 semanas, mostrou que a comparação das concentrações de B₁₂ entre os grupos de acordo com as dietas foi estatisticamente significativo (dieta A vs dieta B, p<0,01; dieta A vs dieta C, p<0,01; dieta A vs dieta D, p<0,01; dieta C vs dieta B, p<0,01 e dieta C vs dieta D, p<0,01).

Os valores de média e desvio padrão do ácido fólico antes da administração das dietas para o grupo de animais tratados por 8 semanas foi $76,6 \pm 24,3$ ng/mL e para o grupo de camundongos tratados por 20 semanas foi $90,5 \pm 30,2$ ng/mL.

A tabela 6 apresenta os valores de ácido fólico antes e após o recebimento das dietas. Os camundongos tratados com as dietas B e D apresentaram concentrações de ácido fólico estatisticamente diminuídas, comparados com os camundongos que receberam dietas A e C ($p \leq 0,05$).

Tabela 6- Valores de média e desvio padrão do ácido fólico de acordo com as dietas.

	Ácido fólico (ng/mL) 8 semanas de dieta	Ácido fólico (ng/mL) 20 semanas de dieta
Antes da dieta	76,6 $\pm$ 24,3 (n=30)	90,5 $\pm$ 30,2 (n=42)
Dieta A	71,5 $\pm$ 25,8 (n=10)	88,4 $\pm$ 26,1 (n=10)
Dieta B	9,5 $\pm$ 6,0 (n=10)	7,7 $\pm$ 2,0 (n=10)
Dieta C	46,0 $\pm$ 26,5 (n=8)	83,9 $\pm$ 15,6 (n=11)
Dieta D	19,8 $\pm$ 14,1 (n=8)	12,2 $\pm$ 7,3 (n=11)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Nos camundongos tratado por 8 semanas, a comparação das concentrações de ácido fólico entre os grupos de acordo com as dietas mostrou os seguintes valores de *P*: dieta A vs dieta B, $p < 0,01$; dieta A vs dieta D, $p < 0,01$; dieta C vs dieta B, $p < 0,01$ e dieta C vs dieta D, $p = 0,05$. A mesma comparação foi realizada nos camundongos tratados por 20 semanas (dieta A vs dieta B, $p < 0,01$; dieta A vs dieta D, $p < 0,01$; dieta C vs dieta B, $p < 0,01$ e dieta C vs dieta D, $p < 0,01$).

A tabela 7 mostra os valores da área de lesão aterosclerótica no seio aórtico dos camundongos apoE^{-/-} de acordo com as dietas. Os camundongos que receberam as dietas B, C e D por 8 semanas apresentaram um aumento estatisticamente significativo na área de lesão comparados aos camundongos alimentados com a dieta A ($p < 0,01$) (Fig. 9).

A análise estatística mostrou que os camundongos tratados com as dietas B, C e D por 20 semanas apresentaram um aumento significativo na área de lesão aterosclerótica quando comparados aos camundongos alimentados com a dieta A ($p < 0,01$) (Fig. 10). Além disso, os camundongos alimentados com a dieta B (excesso de metionina e deficiência de vitaminas) por 20 semanas apresentaram a maior área de lesão quando comparados aos camundongos alimentados com as dietas C e D ($p \leq 0,05$).

Tabela 7- Valores de média e desvio padrão da área de lesão aterosclerótica de acordo com as dietas.

	Área de lesão (μm^2) 8 semanas de dieta	Área de lesão (μm^2) 20 semanas de dieta
Dieta A	58.107 $\pm$ 48.135 (n=10)	402.180 $\pm$ 351.930 (n=10)
Dieta B	204.874 $\pm$ 106.340 (n=10)	2.258.880 $\pm$ 777.020 (n=10)
Dieta C	194.081 $\pm$ 154.970 (n=10)	1.765.327 $\pm$ 437.460 (n=11)
Dieta D	185.705 $\pm$ 151.030 (n=10)	1.586.190 $\pm$ 383.100 (n=10)

Legenda:

Dieta A: dieta normal

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆

Nos animais alimentados por 8 semanas, a comparação da área de lesão nos grupos de acordo com as dietas, mostraram que os seguintes valores de *P*: dieta A vs dieta B, *p*<0,01; dieta A vs dieta C, *p*<0,01 e dieta A vs dieta D, *p*<0,01. Nos grupos alimentados por 20 semanas foi demonstrado que dieta A vs dieta B, *p*<0,01; dieta A vs dieta C, *p*<0,01; dieta A vs dieta D, *p*<0,01; dieta C vs dieta B, *p*=0,05 e dieta B vs dieta D, *p*=0,04.

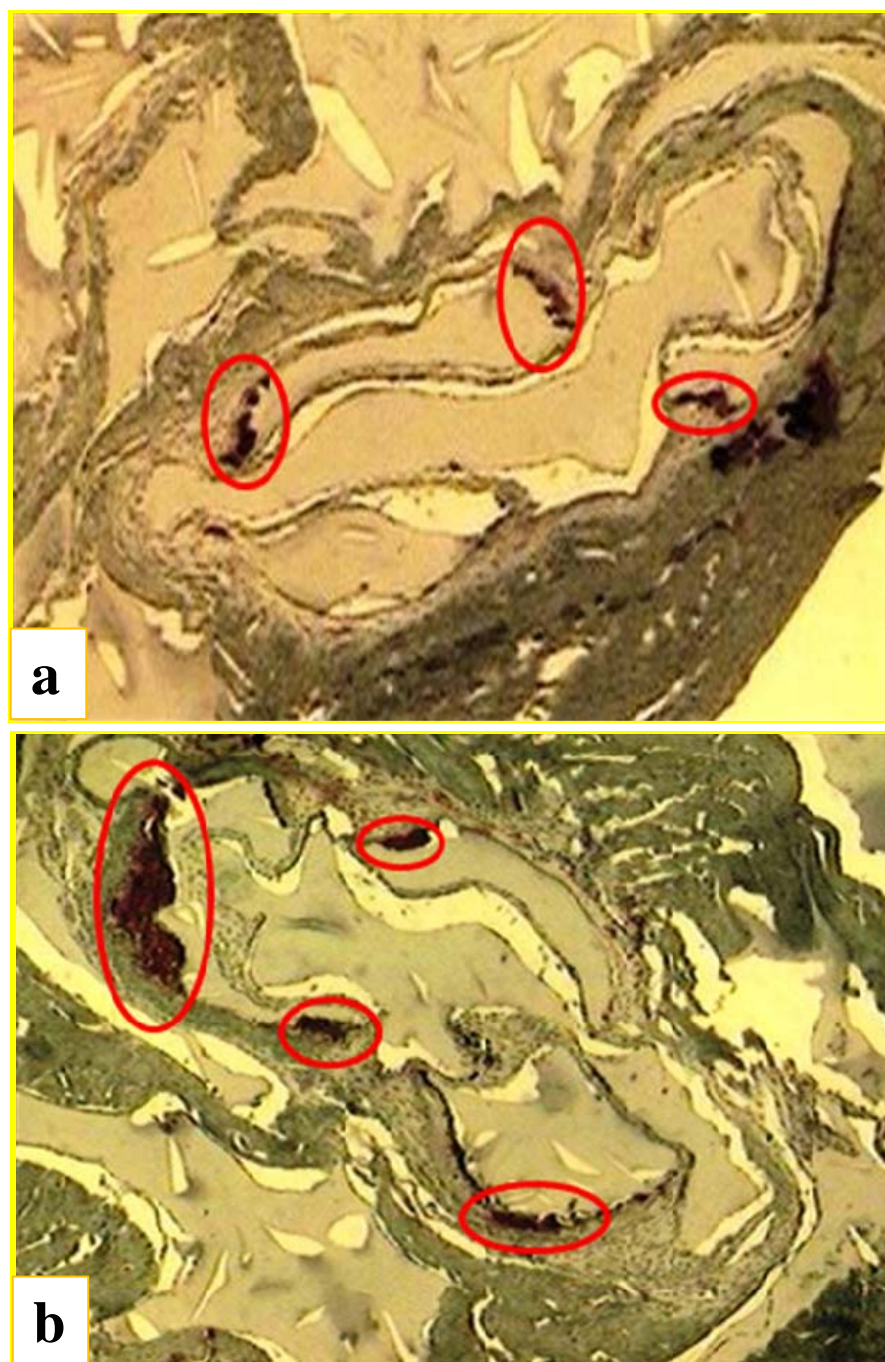


Figura 9- Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos apoE^{-/-} (C57BL/6) alimentados com diferentes dietas por 8 semanas, mostrando formação de lesões ateroscleróticas.

Os cortes foram submetidos à coloração com Oil Red, Light Green e Hematoxilina. O painel (a) representa o grupo com dieta A, (b) o grupo com dieta B.

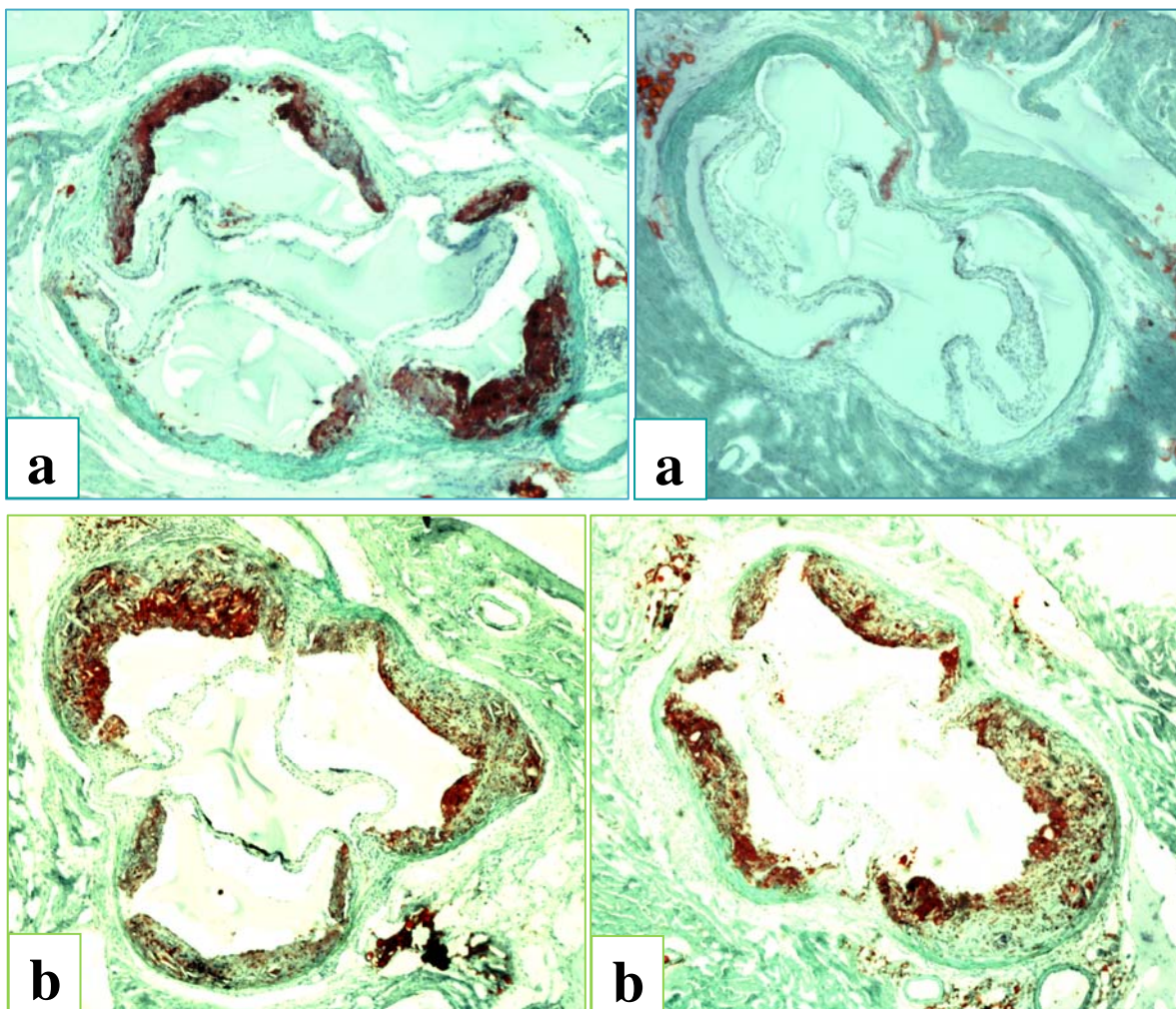


Figura 10- Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos apoE^{-/-} (C57BL/6) alimentados com diferentes dietas por 20 semanas, mostrando lesões ateroscleróticas representativas.

Os cortes foram submetidos à coloração com Oil Red, Light Green e Hematoxilina.

O painel (a) representa o grupo com dieta A, (b) o grupo com dieta B.

Como não havia amostra para análise de colesterol plasmático de todos os camundongos, a mesma foi realizada nos camundongos apoE^{-/-} apenas após o recebimento das dietas. A tabela 8 apresenta os valores de média e desvio padrão do colesterol em cada grupo de acordo com a dieta. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nas concentrações do colesterol entre os grupos.

Tabela 8- Valores de média e desvio padrão do colesterol plasmático de acordo com as dietas.

	Colesterol (mg/dL)
Dieta A	461,8±134,2 (n=5)
Dieta B	625,2±114,2 (n=5)
Dieta C	562,2±288,1 (n=5)
Dieta D	785,2±265,2 (n=5)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

4.4- Camundongos LDLR^{-/-}

Foram tratados 40 camundongos LDLR^{-/-} por 8 semanas e 39 camundongos LDLR^{-/-} por 20 semanas com as quatro dietas específicas, totalizando 79 camundongos. A genotipagem para os alelos do gene do LDLR confirmou a presença da mutação nos animais deficientes.

Antes de receber as dietas, foi realizada a coleta de sangue dos camundongos LDLR^{-/-} para análise da Hcy plasmática. Os camundongos apresentaram os seguintes valores de média e desvio padrão da Hcy plasmática: $1,5 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/L}$ (n=40) para o grupo que recebeu as dietas por 8 semanas, e $2,8 \pm 1,4$ $\mu\text{mol/L}$ (n=35) para o grupo que recebeu as dietas por 20 semanas.

A tabela 9 apresenta os valores de média e desvio padrão da Hcy plasmática dos camundongos LDLR^{-/-} após a alimentação por 8 e 20 semanas com as diferentes dietas. Os animais LDLR^{-/-} alimentados durante 8 semanas com as dietas B, C e D apresentaram valores da Hcy plasmática estatisticamente maiores comparados aos camundongos alimentados com a dieta A ($p < 0,01$). O mesmo foi observado nos camundongos LDLR^{-/-} alimentados por 20 semanas com as dietas B, C e D (dieta A *vs* dieta B, $p < 0,01$; dieta A *vs* dieta C, $p < 0,01$; dieta A *vs* dieta D, $p < 0,01$).

Tabela 9- Valores de média e desvio padrão da Hcy de acordo com as dietas.

	Hcy ($\mu\text{mol/L}$) 8 semanas de dieta	Hcy ($\mu\text{mol/L}$) 20 semanas de dieta
Antes da dieta	1,5 $\pm$ 0,9 (n=40)	2,8 $\pm$ 1,4 (n=35)
Dieta A	2,4 $\pm$ 1,7 (n=10)	2,4 $\pm$ 0,8 (n=5)
Dieta B	14,2 $\pm$ 3,9 (n=10)	21,6 $\pm$ 18,1 (n=4)
Dieta C	11,9 $\pm$ 7,9 (n=11)	13,5 $\pm$ 12,0 (n=10)
Dieta D	5,3 $\pm$ 2,7 (n=9)	10,8 $\pm$ 3,6 (n=6)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Nos camundongos tratado por 8 semanas, a comparação das concentrações de Hcy entre os grupos de acordo com as dietas mostrou os seguintes valores de *P*: dieta A vs dieta B, *p*<0,01; dieta A vs dieta C, *p*<0,01 e dieta A vs dieta D, *p*<0,01.

Os valores de média e desvio padrão da vitamina B₁₂ antes da administração das dietas para o grupo de animais LDLR^{-/-} tratados por 8 semanas foi 15.278 $\pm$ 3.803pmol/L e para o grupo de animais tratados por 20 semanas foi 9.330 $\pm$ 2.409 pmol/L.

A tabela 10 apresenta os valores de média e desvio padrão da vitamina B₁₂ antes e após o recebimento das dietas. Podemos observar que os camundongos tratados com a dieta C apresentaram as maiores concentrações de vitamina B₁₂ quando comparados com os outros grupos (*p*<0,01). Além disso, os camundongos que receberam dietas B e D tiveram concentrações de vitamina B₁₂ mais baixas.

Tabela 10- Valores média e desvio padrão da vitamina B₁₂ de acordo com as dietas.

	Vitamina B ₁₂ (pmol/L) 8 semanas de dieta	Vitamina B ₁₂ (pmol/L) 20 semanas de dieta
Antes da dieta	15.278±3.803 (n=40)	9.330±2.409 (n=22)
Dieta A	18.023±2.427 (n=10)	11.443±2.811 (n=5)
Dieta B	8.874±2.794 (n=10)	10.464±3.994 (n=8)
Dieta C	28.830±4.229 (n=10)	26.481±6.607 (n=10)
Dieta D	13.236±4.856 (n=9)	6.370±5.129 (n=8)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Análise estatística da vitamina B₁₂. (1) Após 8 semanas de dieta: dieta A vs dieta B, p<0,01; dieta A vs dieta C, p<0,01; dieta A vs dieta D, p=0,02; dieta C vs dieta B, p<0,01 e dieta C vs dieta D, p<0,01). (2) Após 20 semanas de dieta: dieta A vs dieta C, p<0,01; dieta C vs dieta B, p<0,01 e dieta C vs dieta D, p<0,01).

Os valores de média e desvio padrão do ácido fólico antes da administração das dietas para o grupo de animais LDLR^{-/-} tratados por 8 semanas foi 88,2±31,4 ng/mL e para o grupo de animais tratados por 20 semanas foi 65,4±21,4 ng/mL.

A tabela 11 apresenta os valores de ácido fólico antes e após o recebimento das dietas. Os camundongos tratados com as dietas B e D apresentaram concentrações de ácido fólico B₁₂ diminuídas comparados com os camundongos que receberam dietas A e C.

Tabela 11- Valores de média e desvio padrão do ácido fólico de acordo com as dietas.

	Ácido fólico (ng/mL) 8 semanas de dieta	Ácido fólico (ng/mL) 20 semanas de dieta
Antes da dieta	88,2±31,4 (n=40)	65,4±21,4 (n=26)
Dieta A	103,5±18,5 (n=10)	64,7±23,6 (n=5)
Dieta B	17,2±7,1 (n=10)	12,9±7,9 (n=9)
Dieta C	65,7±29,0 (n=10)	39,6±28,4 (n=9)
Dieta D	32,8±19,1 (n=9)	10,6±6,7 (n=8)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Análise estatística do ácido fólico. (1) Após 8 semanas de dieta: dieta A *vs* dieta B, $p<0,01$; dieta A *vs* dieta D, $p<0,01$; dieta C *vs* dieta B, $p<0,01$ e dieta C *vs* dieta D, $p=0,01$. (2) Após 20 semanas de dieta: dieta A *vs* dieta B, $p<0,01$; dieta A *vs* dieta D, $p<0,01$; dieta C *vs* dieta B, $p=0,01$ e dieta C *vs* dieta D, $p<0,01$.

A análise histológica mostrou que os camundongos LDLR^{-/-} alimentados com as dietas específicas por 8 semanas apresentaram formação de lesão aterosclerótica no seio aórtico (Fig. 11). A tabela 12 mostra os valores da área de lesão aterosclerótica no seio aórtico dos camundongos LDLR^{-/-} de acordo com as dietas. Os camundongos que receberam as dietas B, C e D por 8 semanas apresentaram um aumento estatisticamente significativo na área de lesão, comparados aos animais alimentados com a dieta A ($p<0,05$).

Os camundongos LDLR^{-/-} alimentados com as dietas B, C e D por 20 semanas demonstraram um aumento significativo na área de lesão aterosclerótica comparados aos camundongos alimentados com a dieta A ($p<0,05$) (Fig. 12).

Tabela 12- Valores de média e desvio padrão da área de lesão aterosclerótica de acordo com as dietas.

	Área de lesão (μm^2) 8 semanas de dieta	Área de lesão (μm^2) 20 semanas de dieta
Dieta A	28.756 $\pm$ 16.984 (n=10)	155.700 $\pm$ 88.893 (n=10)
Dieta B	59.470 $\pm$ 20.647 (n=10)	700.300 $\pm$ 430.720 (n=7)
Dieta C	58.140 $\pm$ 31.853 (n=10)	407.462 $\pm$ 193.930 (n=8)
Dieta D	51.944 $\pm$ 15.452 (n=9)	480.314 $\pm$ 117.350 (n=7)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Nos animais alimentados por 8 semanas, a comparação da área de lesão nos grupos de acordo com as dietas, mostraram que os seguintes valores de *P*: dieta A vs dieta B, $p<0,01$; dieta A vs dieta C, $p=0,01$ e dieta A vs dieta D, $p=0,01$. Nos grupos alimentados por 20 semanas foi demonstrado que dieta A vs dieta B, $p<0,01$; dieta A vs dieta C, $p<0,01$ e dieta A vs dieta D, $p<0,01$.

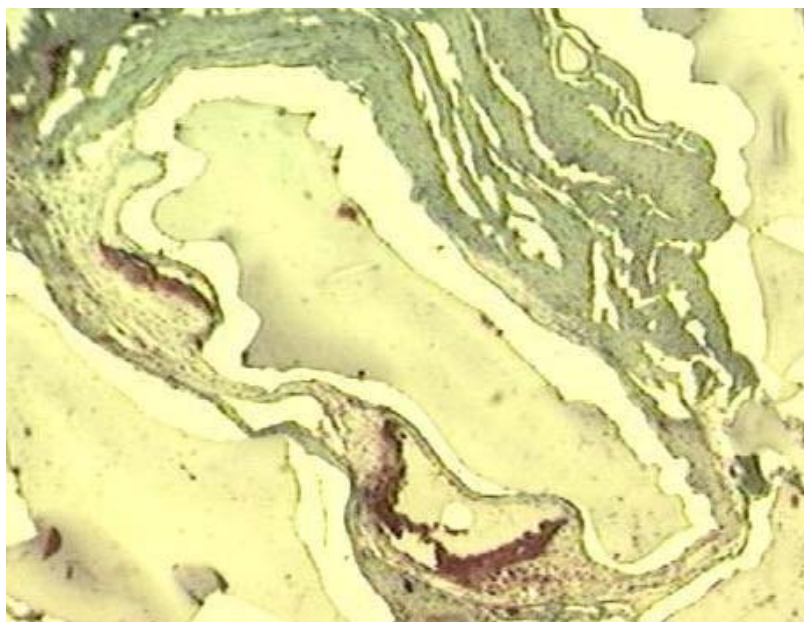


Figura 11- Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos $LDLR^{-/-}$ (C57BL/6) alimentados com dieta B por 8 semanas, mostrando lesões ateroscleróticas representativas.

Os cortes foram submetidos à coloração com Oil Red, Light Green e Hematoxilina.

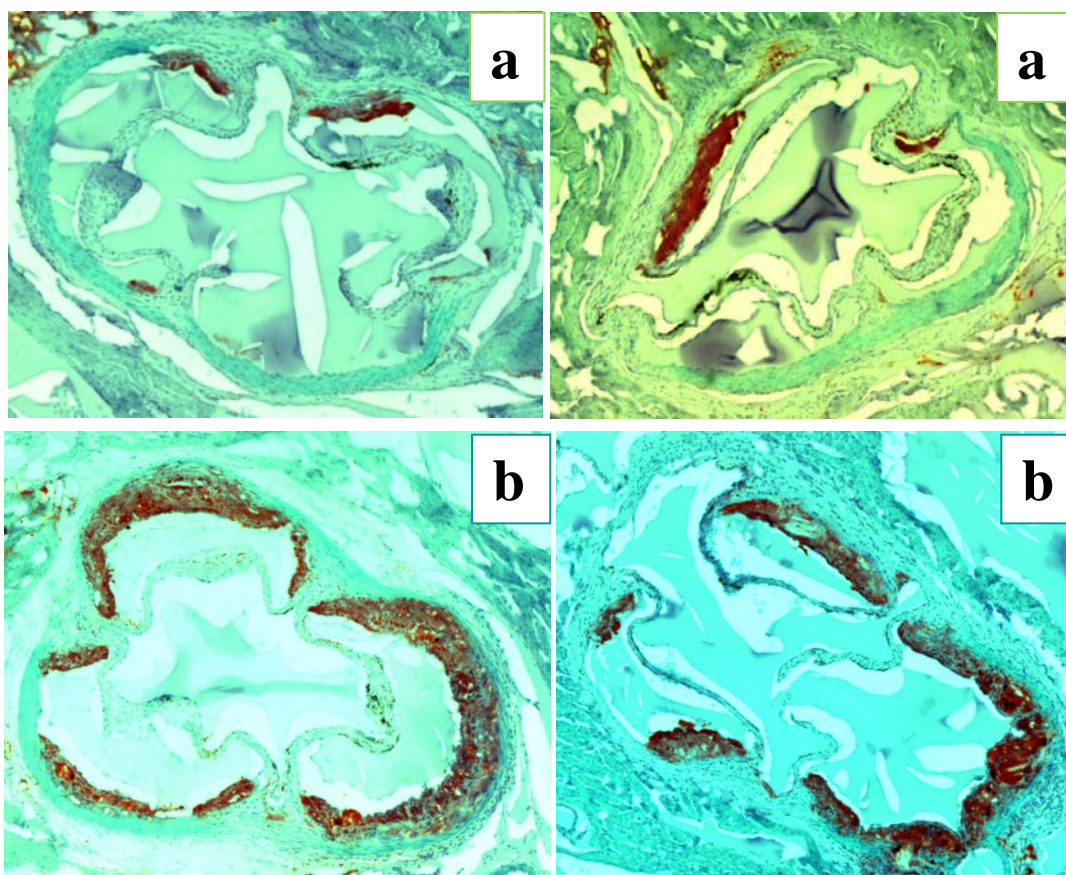


Figura 12- Fotomicrografias de seções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos LDLR^{-/-} (C57BL/6) alimentados com as dietas por 20 semanas, mostrando lesões ateroscleróticas representativas.

Os cortes foram submetidos à coloração com Oil Red, Light Green e Hematoxilina. O painel (a) representa o grupo com dieta A, (b) o grupo com dieta B.

Foi realizada a análise do colesterol plasmático total nos camundongos LDLR^{-/-} após o recebimento das dietas. A tabela 13 apresenta os valores de média e desvio padrão do colesterol em cada grupo de acordo com a dieta. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nas concentrações do colesterol quando os grupos foram comparados.

Tabela 13- Valores de média e desvio padrão do colesterol plasmático total de acordo com as dietas.

	Colesterol (mg/dL)
Dieta A	422,2±79,8 (n=5)
Dieta B	430,0±178,7 (n=5)
Dieta C	466,6±75,7 (n=5)
Dieta D	549,4±118,7 (n=5)

Legenda:

Dieta A: dieta normal.

Dieta B: dieta enriquecida com metionina e com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta C: dieta enriquecida com metionina, ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

Dieta D: dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆.

4.5- Western-blot

Para a análise do estresse do RE utilizou-se o *western-blot* de amostras carotídeas tanto de camundongos apoE^{-/-} alimentados com dietas A, B e D por 8 e 20 semanas, como de camundongos normais alimentados com dietas A, B e D por 24 semanas.

Os resultados desta análise demonstraram que os camundongos apoE^{-/-} alimentados com as diferentes dietas por 8 semanas não apresentaram diferença da expressão das chaperonas Grp78 e Grp94. Entretanto, foi observado um aumento na intensidade das bandas relacionadas às chaperonas Grp78 e Grp94 no grupo de camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta B por 20 semanas, com relação aos grupos que receberam dietas A e D (Fig. 13).

Da mesma forma, os camundongos normais tratados com dieta B por 24 semanas apresentaram um aumento na expressão das chaperonas Grp78 e Grp94 com relação aos que receberam dieta A (Fig. 14).

Valor da densitometria

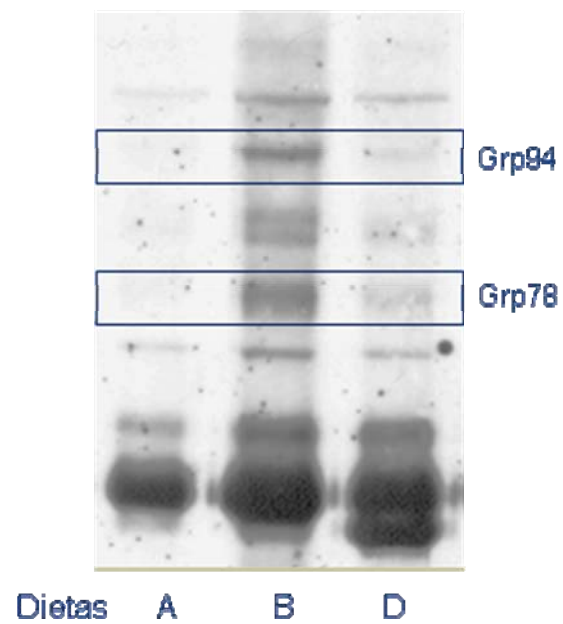
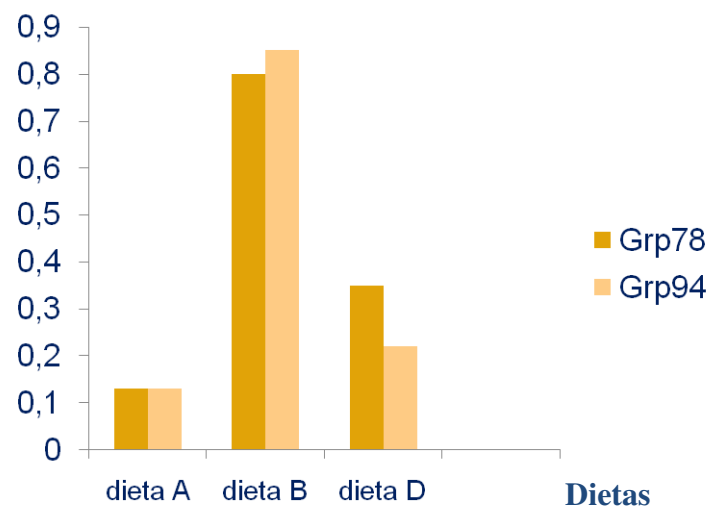


Figura 13- Análise da expressão das chaperonas Grp78 e Grp97 em camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ alimentados com dietas A, B e D por 20 semanas, utilizando a técnica de *western-blot*. Pool de 6 a 10 carótidas.

Valor da densitometria

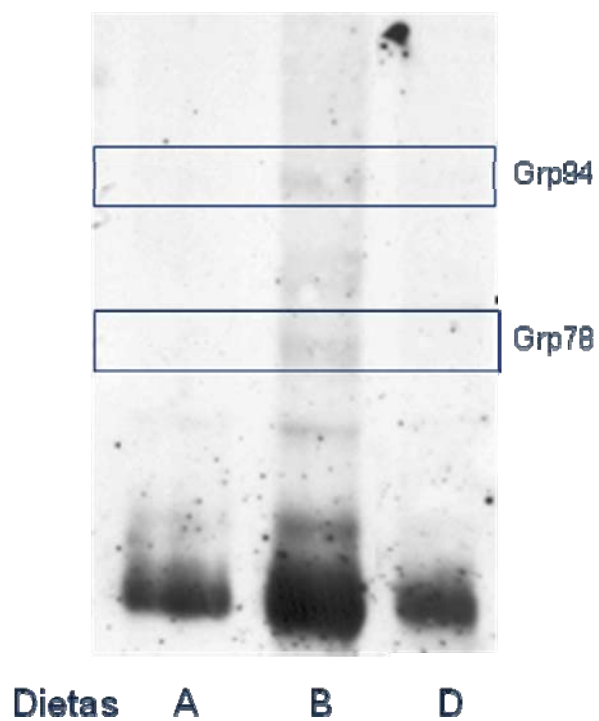
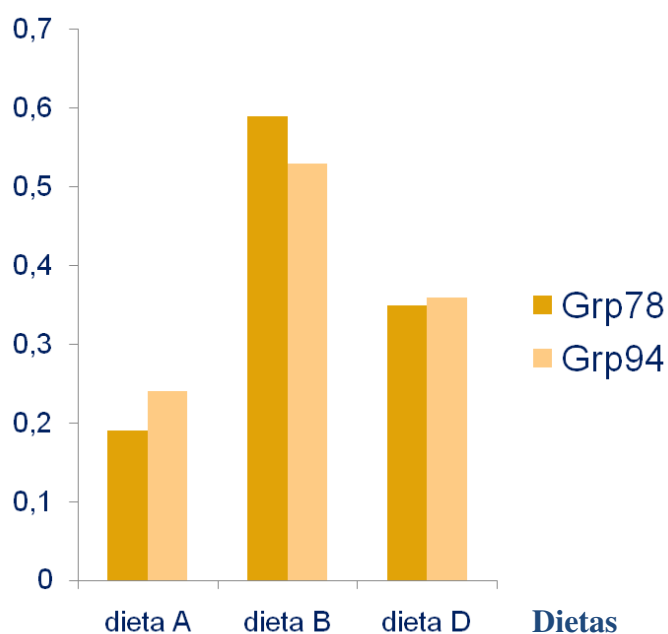


Figura 14- Análise da expressão das chaperonas Grp78 e Grp94 em camundongos normais alimentados com dietas A, B e D por 24 semanas, utilizando a técnica de *western-blot*. Pool de 6 a 10 carótidas.



5- DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos demonstraram que mesmo a HHcy leve está associada com o desenvolvimento da aterosclerose, incluindo doença arterial periférica, doença coronariana e doença cerebrovascular (BOUSHEY et al., 1995). Outros estudos definiram a HHcy como um fator de risco independente para doença cardiovascular (EIKELBOOM et al., 1999). Estudos prospectivos subseqüentes que incluíram um grande número de participantes confirmaram esses achados, mas com um menor grau de significância, especialmente para doença coronariana (THE HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION, 2002).

Estes dados têm grande relevância em saúde pública, pois a HHcy leve é um achado comum e decorrente principalmente pela deficiência dietética de ácido fólico e vitamina B. Portanto, tornou-se atrativo considerar a correção terapêutica da HHcy através da reposição de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆, uma medida simples e econômica que poderia diminuir o risco de doença cardiovascular (HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION, 2005). Inúmeros estudos que randomizaram dezenas de milhares de participantes, finalizados até o momento, não evidenciaram nenhum benefício da suplementação de vitaminas B e da diminuição da Hcy sobre a redução do risco de doença cardiovascular coronariana (TOOLE et al., 2004; LONN et al., 2006; BØNAA et al., 2006). Uma das possibilidades para esse achado negativo é que a maioria dos estudos incluiu pacientes com doença vascular preexistente, que não seria revertida apesar da diminuição de Hcy.

Desde 1990, ambos os governos Americano e Canadense decidiram enriquecer os grãos com ácido fólico para prevenção de defeitos do tubo neural (DTN) em recém-nascidos, além da prevenção da HHcy. Os estudos mostraram que a medida de fortificação dos grãos com ácido fólico foi eficaz na redução das concentrações de Hcy na população geral (BOSTOM et al., 2002; RADER, 2002; ANDERSON et al., 2002). Entretanto, os estudos mostraram que não houve redução no risco de desenvolver aterosclerose e trombose (BOSTOM et al., 2002). Recentemente, a ANVISA adotou a medida de fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro para prevenção de várias doenças. Estudos no Brasil estão sendo desenvolvidos para avaliar a eficácia desta medida, tanto na prevenção de DTN como da HHcy.

Um modelo animal de HHcy leve secundária à deficiência vitamínica dietética é muito interessante, pois permite mimetizar e avaliar os efeitos dessa situação sobre as artérias. Apesar da deficiência de vitaminas em primatas poder desencadear outros efeitos que também podem modular a função arterial, essa deficiência como citado anteriormente é muito comum em humanos (LENTZ et al., 2001b). Adicionalmente, a análise da associação de HHcy com outros fatores de risco para doença arterial também é interessante.

Nosso estudo teve seu foco sobre o efeito da HHcy leve controlada, induzida por diversas dietas no desenvolvimento da aterosclerose aórtica em modelos murinos normais (C57BL/6), deficientes de apoE^{-/-}, LDLR^{-/-} ou hemofílicos B. Os camundongos receberam doses diárias de metionina por gavagem e dietas com baixos ou altos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dietas B e C, respectivamente), e dieta com baixos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dieta D), para induzir a uma HHcy leve. A investigação incluiu análise morfológica da aorta e do estresse do RE em artérias carotídeas.

Através desse controle os animais desenvolveram níveis de Hcy 3 a 5 vezes maiores que os encontrados nos animais normais alimentados com dieta padrão, o que é proporcional à definição de HHcy leve em humanos.

Pacientes assintomáticos com HHcy leve são os mais beneficiados com o avanço no conhecimento dessa alteração e suas conseqüências. Nosso estudo difere de outros estudos de modelos animais com indução de HHcy por dieta, nos quais o grau de HHcy foi moderado ou grave.

A aterosclerose é uma condição clínica progressiva que se inicia já ao nascimento, sugerindo que fatores ambientais e genéticos já têm uma participação na patogênese da aterosclerose desde a infância (PERSONEL et al., 1996; STARY, 1987). Recentemente analisamos a mutação C677T no gene da MTHFR e a Hcy plasmática em um grupo de crianças e adultos saudáveis brasileiros (ALÉSSIO et al., 2004). Nossos resultados mostraram que apesar de mais rara na infância, a HHcy já pode estar presente nessa idade, e que o ácido fólico é o fator determinante mais importante. Portanto, poderíamos especular que a HHcy leve assintomática, presente já na infância, poderia contribuir para as alterações vasculares funcionais e/ou anatômicas que culminariam com a

aterosclerose do adulto. Isto poderia explicar em parte os resultados negativos da fortificação dos grãos com ácido fólico e vitamina B, que não reverteriam lesões já instaladas na idade adulta, apesar da normalização da Hcy. Talvez conclusões definitivas apenas possam ser feitas após 5 a 6 décadas dessa fortificação, quando as crianças que receberam essa dieta desde o nascimento estarão na faixa de risco de doença cardiovascular aterosclerótica.

Muitos estudos têm demonstrado que a HHcy acelera o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos apoE^{-/-} (ZHOU et al., 2003; HOFMANN et al., 2001). Apesar dos estudos mostrarem que HHcy é aterogênica, pelo menos na presença de hiperlipidemia, a via patogênica responsável por este efeito ainda não está claramente definida (LENTZ, 2001).

Várias hipóteses têm sido formuladas tentando explicar os mecanismos pelos quais a HHcy promove aterosclerose e doença cardiovascular, incluindo estresse oxidativo, estresse do RE e a ativação de fatores pró-inflamatórios. Deste modo, fizemos a análise de *western-blot*, utilizando o anticorpo anti-KDEL que marca as chaperonas Grp78 e Grp94, para avaliar o estresse do RE nos camundongos normais e apoE^{-/-}. Com isso, pretendemos verificar se os animais estavam apresentando alguma alteração a nível celular que pudesse favorecer o desenvolvimento da aterosclerose. As chaperonas Grp78 e 94 são induzidas em resposta a uma variedade de agentes patológicos e/ou condições que causam estresse do RE (LEE, 2001).

Os camundongos apoE^{-/-} desenvolvem hipercolesterolemia devido a diminuição no transporte de colesterol para o fígado, levando, desse modo, ao acúmulo de resíduos ricos em colesterol no plasma. Esta hipercolesterolemia grave e persistente (acima de 5 vezes o valor normal) leva ao desenvolvimento prematuro de lesões ateroscleróticas complexas (ZHANG et al., 1992).

No nosso estudo os camundongos apoE^{-/-} tratados com as dietas B, C e D por 8 e 20 semanas apresentaram HHcy leve e um aumento significativo no tamanho das lesões ateroscleróticas do seio aórtico. É importante ressaltar que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação às concentrações de colesterol plasmático total e as dietas.

Nossos resultados corroboram dois estudos que examinaram a relação da HHcy induzida pela dieta com lesões vasculares em camundongos apoE^{-/-} (HOFFMAN et al., 2001; ZHOU et al., 2001). Hoffman et al (2001) mostraram que camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta deficiente em vitaminas B₁₂, B₆ e ácido fólico e enriquecida com metionina por 8 semanas resultou em HHcy grave e duplicação no tamanho e complexidade das lesões ateroscleróticas do seio aórtico. Zhou et al (2001) comparou a aceleração das lesões do seio aórtico usando tanto dieta enriquecida com metionina como com Hcy. As duas dietas resultaram em HHcy moderada e na aceleração das lesões ateroscleróticas. A dieta enriquecida com metionina foi tóxica e resultou na morte dos camundongos após um período de 8 meses.

É difícil ajustar esses dados com a observação de que defeitos congênitos raros no metabolismo da Hcy estão associados com trombose prematura e aterosclerose, se os defeitos são em genes da via de transsulfuração (associados ao aumento de metionina) ou da via de metilação (associados à diminuição de metionina) (MCCULLY et al., 1975). Esta observação tem sido freqüentemente citada como evidência chave, apoiando o conceito de que a doença vascular pela HHcy é devido a Hcy por si só ao invés de um efeito dos seus determinantes metabólicos. Tentativas de mimetizar estas condições humanas em camundongos *knockout* com defeitos na via de transsulfuração da Hcy, ou camundongos com deficiência de CBS, foram realizadas. Entretanto, apesar dos animais apresentarem disfunção endotelial, eles não desenvolveram aterosclerose, mesmo da presença da HHcy (WATANABE et al., 1995). Este achado não permite responder quais aspectos da patologia vascular podem estar causalmente associados à Hcy, ou se fatores adicionais são necessários para que as supostas propriedades vasotóxicas da Hcy tornem-se aparentes (BRATTSTROM et al., 2000; UELAND et al., 2000).

Uma situação experimental similar de HHcy e aterosclerose foi observada em porcos e primatas alimentados com dieta aterogênica (AMBROSI et al., 1999; LENTZ et al., 2001b). Ambrosi et al (1999) mostraram que porcos alimentados com uma dieta enriquecida em metionina por 4 meses apresentaram HHcy e aterosclerose. A suplementação com ácido fólico na dieta enriquecida com metionina normalizou as concentrações de Hcy plasmática, mas não reduziu as lesões vasculares induzidas pela

metionina. Similarmente, Lentz et al (2001b) alimentaram macacos com uma dieta contendo altos níveis de gordura e colesterol por 13 a 26 meses, induzindo não só a hipercolesterolemia e aterosclerose, mas também a HHcy e deficiência de vitaminas B. Quando a mesma dieta foi suplementada com ácido fólico, vitamina B₁₂ e vitamina B₆, as concentrações da Hcy plasmática e das vitaminas foram normalizadas, entretanto, não ocorreu atenuação da aterosclerose ou da disfunção vascular.

Ainda não está definido se o excesso na ingestão de metionina em humanos é aterogênico. Entretanto, evidências importantes de experimentos com animais sugerem que o aumento na ingestão deste aminoácido produz lesões ateroscleróticas em ratos (MORITA et al., 2001) e coelhos (TOBOREK et al., 1995; FUJIMOTO et al., 2003).

Devido a esses resultados relatados na literatura, considerando o excesso na ingestão da metionina na formação de placas ateroscleróticas e os valores da concentração da HHcy plasmática (TROEN et al., 2003; HOFMANN et al., 2001), incluímos em nossa análise camundongos normais e apoE^{-/-} tratados com uma dieta com excesso de metionina e de vitaminas (dieta C), por 8 e 20 semanas. Assim como Hofmann et al (2001), verificamos um aumento nas concentrações de Hcy tanto nos camundongos normais como nos camundongos apoE^{-/-}. Contudo, observamos lesões ateroscleróticas no arco aórtico apenas nos camundongos apoE^{-/-}, em ambos os tempos de tratamento, confirmando os resultados de estudos anteriores. Assim, poderíamos especular que a toxicidade da metionina poderia induzir a HHcy como uma consequência da lesão vascular.

Quando comparamos os camundongos apoE^{-/-} tratados com as dietas B (excesso de metionina e deficiência de vitaminas) e D (apenas deficiência de vitaminas) por 20 semanas, os resultados mostraram tanto uma lesão vascular como um aumento significativo nas concentrações de Hcy plasmática mais proeminente no grupo de camundongos tratados com a dieta B, sugerindo um sinergismo entre os fatores aterogênicos, deficiência das vitaminas e excesso da metionina.

Além disso, os camundongos apoE^{-/-} tratados com dieta B por 20 semanas foi o único grupo que apresentou estresse do RE aumentado em relação aos outros grupos. Um estresse do RE crônico ou transitório secundário à HHcy mostrou afetar desfavoravelmente

várias funções celulares envolvidas no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, incluindo inflamação, morte celular programada e alteração dos lipídeos (LAWRENCE DE KONING et al., 2003). Werstuck et al (2001) demonstrou que o estresse do RE induzido pela Hcy causa alterações na biosíntese de lipídeos pela ativação de proteínas de ligação a elemento regulador de esterol (SREBPs), fatores de transcrição residente no RE responsáveis pela indução dos genes da biosíntese de colesterol e triglicérides (SHIMANO ET al., 1996; HORTON ET al., 1999). Além disso, estudos demonstraram que a ativação *in vitro* de NF- κ B ocorre nas células passando por estresse do RE (PAHL et al., 1995a; PAHL et al., 1995b; PAHL et al., 1996). Este resultado sugere que o estresse do RE induzido pela Hcy poderia contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose pelo aumento direto da resposta inflamatória via ativação de NF- κ B. Hofmann et al (2001) demonstraram que há um aumento da ativação de NF- κ B na lesão aterosclerótica de camundongos apoE^{-/-} alimentados com dietas para induzir HHcy. Embora o mecanismo responsável por este efeito pró-inflamatório da HHcy não seja conhecido, o estresse do RE induzido pela Hcy poderia aumentar a fosforilação e ativação de proteína quinase NH₂-terminal de c-Jun (JNK), levando, deste modo, a mais inflamação e morte celular programada (URANO et al., 2000). Baseado nesses dados, o estresse do RE induzido pela Hcy demonstra ser um importante mecanismo que não só contribui para o desenvolvimento da aterosclerose, mas também influencia outras doenças específicas, incluindo diabetes e hipertensão.

Estudos têm demonstrado que as concentrações da Hcy plasmática e as concentrações do ácido fólico e vitamina B₆ correlacionam-se inversamente (SELHUB et al., 1993). Baixas concentrações do ácido fólico e vitamina B₆ são mais frequentes entre pacientes com aterosclerose e trombose que entre indivíduos do grupo controle (ROBINSON et al., 1998; GRAHAM et al., 1997). Mais recentemente estudos têm mostrado que o ácido fólico é capaz de reverter a disfunção endotelial tanto *in vitro* como *in vivo* (MOAT et al., 2004). Além disso, o ácido fólico e 5-metiltetrahidrofolato parecem ter um efeito direto na vasculatura, que são independentes das mudanças nas concentrações de Hcy (DOSHI et al., 2001; VERHAAR et al., 1998). No nosso estudo, os camundongos apoE^{-/-} tratados com dieta enriquecida em ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ (dieta C) por 20 semanas mostraram menor desenvolvimento de lesões ateroscleróticas que os camundongos apoE^{-/-} tratados com dieta deficiente destas vitaminas (dieta B), ambos submetidos a uma

sobrecarga de metionina. Estes resultados corroboram o efeito protetor das vitaminas, particularmente a longo prazo, uma vez que os camundongos apoE^{-/-} alimentados com a dieta C por 8 semanas apresentaram aceleração no desenvolvimento da aterosclerose e a suplementação com ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ não atenuou seu desenvolvimento.

Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito de várias dietas para induzir HHcy leve no desenvolvimento da aterosclerose, utilizando camundongos LDLR^{-/-}. Considerando as dietas, a concentração de Hcy plasmática e formação de lesão aterosclerótica, os camundongos LDLR^{-/-} se comportaram da mesma forma que os camundongos apoE^{-/-}. A única diferença foi que os camundongos LDLR^{-/-} apresentaram menor área de lesão aterosclerótica quando comparados com os camundongos apoE^{-/-}.

Os camundongos LDLR^{-/-} caracterizam-se pela diminuição do *clearance* de VLDL, IDL e LDL no plasma. Como resultado, as concentrações de colesterol plasmático total se elevam e um aumento de sete a nove vezes nos níveis de IDL e LDL são observados (ISHIBASHI et al., 1994). Apesar de aumentado, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação às concentrações de colesterol plasmático total com as diferentes dietas. Esse resultado sugere que o colesterol não influenciou a aceleração da aterosclerose, observada nos camundongos LDLR^{-/-} alimentados com as dietas B, C e D.

Uma relação entre HHcy induzida pela dieta e aceleração do desenvolvimento da aterosclerose foi estabelecido nos camundongos apoE^{-/-} e LDLR^{-/-}. Entretanto, não é possível saber se o efeito pró-aterogênico da HHcy nesses animais é independente da hiperlipidemia. Assim, examinamos camundongos normais (C57BL/6) submetidos ao mesmo regime alimentar dos camundongos apoE^{-/-} e LDLR^{-/-} por 8 e 24 semanas. Observamos que apesar da indução de uma HHcy leve, não houve desenvolvimento de lesão aterosclerótica em nenhum dos grupos analisados. Entretanto, uma anormalidade funcional, demonstrada pelo aumento no estresse do RE estava presente nos camundongos normais tratados com dieta B por 24 semanas, o único grupo com associação de todos os fatores deletérios que predis põem à aterosclerose. Assim, poderíamos sugerir que isto é uma alteração inicial que poderia contribuir para lesões ateroscleróticas futuras.

O único estudo publicado anteriormente que investigou o efeito da HHcy leve sobre a aterosclerose aórtica empregou um modelo murino deficiente em MTHFR (CHEN et al., 2001). Nesse estudo os animais heterozigotos apenas mostraram deposição lipídica arterial após 14 meses de exposição. Em nosso estudo, camundongos normais alimentados por 6 meses com 4 dietas diferentes, apesar de desenvolverem HHcy não mostraram nenhuma alteração vascular microscópica, sugerindo que o tempo de exposição possa ser um fator relevante. Adicionalmente, camundongos *knockout* heterozigotos podem apresentar outras alterações que podem ter uma interferência sobre outros parâmetros da lesão arterial. Da mesma forma, nosso modelo também tem variações que podem interferir sobre a análise final.

Recentemente, uma tese de doutorado desenvolvida em nosso laboratório (FABRI, 2008), avaliou o papel do FIX da coagulação no desenvolvimento da aterosclerose. Para isso, foi realizado cruzamento entre os camundongos hemofílicos B e modelos animais murinos de aterosclerose, incluindo camundongos apoE^{-/-} e LDLR^{-/-}. Esses animais foram alimentados com dieta rica em colesterol por 22 e 37 semanas. Os resultados deste estudo demonstraram que a deficiência do FIX da coagulação foi um fator de piora na evolução da doença aterosclerótica nos dois modelos de aterosclerose. Uma possível explicação para esse fenômeno pode ser a ausência do papel protetor do fator IX na regulação de processos inflamatórios das células endoteliais mediante sua ligação ao colágeno.

Assim, decidimos incluir os camundongos hemofílicos B neste trabalho, para verificar se o mesmo papel protetor estaria presente, diante da HHcy leve induzida pelas diversas dietas. Nossos resultados demonstraram que os camundongos hemofílicos B alimentados com dietas B, C e D por 8 semanas apresentaram HHcy leve mas sem formação de lesão aterosclerótica no seio aórtico. Contudo, infelizmente não pudemos prolongar o período de observação, pois a gavage levou à morte precoce, secundária a hematomas e obstrução respiratória.

É importante enfatizar que um ponto relevante do nosso estudo foi o controle estrito da metionina por gavage para obter uma HHcy leve. Isto é diferente dos outros estudos, nos quais se observa uma HHcy moderada ou grave. Pacientes assintomáticos sob

esta condição (HHcy leve) são os mais beneficiados com avanços neste conhecimento.

Concluindo, nossos resultados demonstraram que camundongos normais sob dieta que induziu HHcy leve mostraram apenas alterações vasculares funcionais, quando vários dos fatores de risco estavam presentes, isto é, na dieta B. A suplementação com ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ teve um efeito protetor no desenvolvimento das alterações ateroscleróticas, nos animais apoE^{-/-}, tempo dependente. Há indícios que o mesmo fenômeno está presente nos animais LDLR^{-/-}. Finalmente, a metionina parece ter um efeito tóxico direto sobre a vasculatura arterial nos camundongos apoE^{-/-} e LDLR^{-/-}.



6- CONCLUSÃO

- 1- A presença de vários fatores de risco para HHcy leve, incluindo o excesso na ingestão de metionina e/ou deficiência de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆, aceleram progressivamente a aterosclerose, tanto nos camundongos apoE^{-/-} como nos camundongos LDLR^{-/-}.
- 2- Nossos resultados sugerem que a suplementação com ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ é importante como fator protetor para a doença vascular, independente da concentração da Hcy no plasma, particularmente a longo prazo.
- 3- A metionina parece ter um efeito tóxico direto sobre o endotélio, contribuindo para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas.
- 4- A HHcy leve por até 24 semanas, em modelos murinos normais (C57BL/6), não induziu a aterosclerose.
- 5- Os camundongos normais expostos a maior número de fatores de risco para doença aterosclerótica apresentaram alterações no estresse do RE, que pode predispor a lesões arteriais futuras.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALÉSSIO, A.C.M.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; BYDLOWSKI, S.P.; EBERLIN, M.N.; VELLASCO, A.P.; HÖEHR, N.F. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. **Am J Med Genet Part A**, 128A: 256-260, 2004.

ALÉSSIO, A.C.M.; SIQUEIRA, L.H.; BYDLOWSKI, S.P.; HÖEHR, N.F.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Polymorphisms in the CBS gene and homocysteine, folate and vitamin B₁₂ levels: association with polymorphisms in the MTHFR and MTRR genes in Brazilian children. **Am J Med Genet Part A**, 2008, *in press*.

AMBROSI, P.; ROLLAND, P.H.; BODARD, H.; BARLATIER, A.; CHARPIOT, P.; GUISGAND, G.; FRIGGI, A.; GHIRINGHELLI, O.; HABIB, G.; BOUVENOT, G.; GARÇON, D.; LUCCIONI, R. Effects of folate supplementation in hyperhomocysteinemic pigs. **J Am Coll Cardiol**, 34: 274-279, 1999.

ANDERSON, J.L.; HORNE, B.D.; CARLQUIST, J.F.; BAIR, T.L.; HABASHI, J.; HART, N.I.; JONES, S.K.; MUHLESTEIN, J.B. Intermountain Heart Collaborative Study Group. Effect of implementation of folic acid fortification of food on homocysteine concentrations in subjects with coronary artery disease. **Am J Cardiol**, 90: 536-539, 2002.

ARONOW, W.S.; AHN, C.; GUTSTEIN, H. Increased plasma homocysteine is an independent predictor of new atherothrombotic brain infarction in older persons. **Am J Cardiol**, 86: 585-586, 2000.

BØNAA, K.H.; NJØLSTAD, I.; UELAND, P.M.; SCHIRMER, H.; TVERDAL, A.; STEIGEN, T.; WANG, H.; NORDREHAUG, J.E.; ARNESEN, E.; RASMUSSEN, K. NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. **N Engl J Med**, 354: 1578-1588, 2006.

BOSTOM, A.G.; JACQUES, P.F.; LIAUGAUDAS, G.; ROGERS, G.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J. Total homocysteine lowering treatment among coronary artery disease patients in the era of folic acid-fortified cereal grain flour. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 22: 488-491, 2002.

BOUSHEY, C.J.; BERESFORD, S.A.; OMENN, G.S.; MOTULSKY, A.G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. **JAMA**, 274: 1049-1057, 1995.

BRATTSTROM, L.; WILCKEN, D.E.L. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? **Am J Clin Nutr**, 72: 315-323, 2000.

BRESLOW, J.L. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 8314-8318, 1993.

CHEN, Z.; KARAPLIS, A.C.; ACKERMAN, S.L.; POGRIBNY, I.P.; MELNYK, S.; LUSSIER-CACAN, S.; CHEN, M.F.; PAI, A.; JOHN, S.W.M.; SMITH, R.S.; BOTTIGLIERI, T.; BAGLEY, P.; SELHUB, J.; RUDNICKI, M.A.; JAMES, S.J.; ROZEN, R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. **Hum Mol Genet**, 10:433-443, 2001.

COLLINS, T.; CYBULSKY, M.I. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? **J Clin Invest**, 107: 255-264, 2001.

DOSHI, S.N.; MCDOWELL, I.F.; MOAT, S.J.; LANG, D.; NEWCOMBE, R.G.; KREDAN, M.B.; LEWIS, M.J.; GOODFELLOW, J. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 21:1196-1202, 2001.

DURAND, P.; LUSSIER-CACAN, S.; BLACHE, D. Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor. **FASEB J**, 11: 1157-1168, 1997.

EBERHARDT, R.T.; FORGIONE, M.A.; CAP, A.; LEOPOLD, J.A.; RUDD, M.A.; TROLLIET, M.; HEYDRICK, S.; STARK, R.; KLINGS, E.S.; MOLDOVAN, N.I.; YAGHOUBI, M.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J.; FARBER, H.W.; COHEN, R.; LOSCALZO, J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. **J Clin Invest**, 106: 483-491, 2000.

EIKELBOOM, J.W.; LONN, E.; GENEST, J.; HANKEY, G.; YUSUF, S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease. **Ann Intern Med**, 131:363-375, 1999.

FABRI, D.R. A interação dos fatores VIII e IX da coagulação no desenvolvimento da doença aterosclerótica. Campinas, 2008 (tese de doutorado-Universidade Estadual de Campinas).

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS, G.J.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L.A.; VAN DEN HEUVEL, L.P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet**, 10: 111-113, 1995.

FUJIMOTO, S.; TOGANE, Y.; MATSUZAKI, C.; YAMASHINA, S.; NAKANO, H.; YAMAZAKI, J.; YOSHINO, G. Effects of long-term administration of methionine on vascular endothelium in rabbits. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 13: 20-27, 2003.

GHISELLI, G.; SCHAEFFER, E.J.; GASCON, P.; BREWER, H.B. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. **Science**, 214: 1239-1241, 1981.

GRAHAM, I.M.; DALY, L.E.; REFSUM, H.M.; ROBINSON, K.; BRATTSTROM, L.E.; UELAND, P.M.; PALMA-REIS, R.J.; BOERS, G.H.; SHEAHAN, R.G.; ISRAELSSON, B.; UITERWAAL, C.S. et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. **JAMA**, 277: 1775-1781, 1997.

HARPER, A.E.; BENEVENGA, N.J.; WOHLHUETER, R.M. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. **Physiol Rev**, 50: 428-557, 1970.

HIRANO, K.; OGIHARA, T.; MIKI, M.; YASUDA, H.; TAMAI, H.; KAWAMURA, N.; MIMO, M. Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. **Free Radic Res**, 21: 267-276, 1994.

HOFMANN, M.A.; LALLA, E.; LU, Y.; GLEASON, M.R.; WOLF, B.M.; TANJI, N.; FERRAN, L.J. JR; KOHL, B.; RAO, V.; KISIEL, W.; STERN, D.M.; SCHMIDT, A.M. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. **J Clin Invest**, 107:675-683, 2001.

HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine. **Am J Clin Nutr**, 82: 806-812, 2005.

HORTON, J.D.; SHIMANO, H.; HAMILTON, R.L.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. **J Clin Invest**, 103: 1067-1076, 1999.

ISHIBASHI, S.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; HERZ, J.; BURNS, D.K. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. **J Clin Invest**, 93: 1885-1893, 1994.

JAMES, D.; FINKELSTEIN, M.D. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. **Sem Thomb Hemost**, 26: 219-225, 2000.

KAUFMAN, R.J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **J Clin Invest**, 110: 1389-1398, 2002.

KAUFMAN, R.J. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. **Trends Biochem Sci**, 3: 152-158, 2004.

KANANI, P.M.; SINKEY, C.A.; BROWNING, R.L.; ALLAMAN, M.; KNAPP, H.R.; HAYNES, W.G. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. **Circulation**, 100: 1161-1168, 1999.

LANG, D.; KREDAN, M.B.; MOAT, S.J.; HUSSAIN, S.A.; POWELL, C.A.; BELLAMY, M.F.; POWERS, H.J.; LEWIS, M.J. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20: 422-427, 2000.

LAWRENCE DE KONING, A.B.; WERSTUCK, G.H.; ZHOU, J.; AUSTIN, R.C. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. **Clinical Biochemistry**, 36: 431-441, 2003.

LEE, A.S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. **Trends Biochem Sci**, 26: 504-510, 2001.

LEE, H.; KIM, H.J.; KIM, J.M.; CHANG, N. Effects of dietary folic acid supplementation on cerebrovascular endothelial dysfunction in rats with induced hyperhomocysteinemia. **Brain Res**, 2: 139-147, 2004.

LENTZ, S.R.; SADLER, J.E. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. **J Clin Invest**, 88: 1906-1914, 1991.

LENTZ, S.R.; ERGER, R.A.; DAYAL, S.; MAEDA, N.; MALINOW, M.R.; HEISTAD, D.D.; FARACI, F.M. Folate dependence of hyperhomocysteinemia and vascular dysfunction in cystathionine beta-synthase-deficient mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 279: H970-H975, 2000.

LENTZ, S.R. Does homocysteine promote atherosclerosis? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 21: 1385-1386, 2001a.

LENTZ, S.R.; PIEGORS, D.J.; MALINOW, M.R.; HEISTAD, D.D. Supplementation of atherogenic diet with B vitamins does not prevent atherosclerosis or vascular dysfunction in monkeys. **Circulation**, 103: 1006-1011, 2001b.

LIN, H.F.; MAEDA, N.; SMITHIES, O.; STRAIGHT, D.L.; STAFFORD, D.W. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. **Blood**, 90: 3962-3966, 1997.

LONN, E.; YUSUF, S.; ARNOLD, M.J.; et al. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. **N Engl J Med**, 354: 1567-1577, 2006.

LOSCALZO, J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. **J Clin Invest**, 98: 5-7, 1996.

- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, 407: 233-241, 2000.
- LUBEC, B.; LABUDOVA, O.; HOEGER, H.; MUEHL, A.; FANG-KIRCHER, S.; MARX, M.; MOSGOELLER, W.; GIALAMAS, J. Homocysteine increases cyclin-dependent kinase in aortic rat tissue. **Circulation**, 94: 2620-2625, 1996.
- MAJORS, A.; EHRHART, L.A.; PEZACKA, E.H. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17: 2074-2081, 1997.
- MAJORS, A.K.; SENGUPTA, S.; JACOBSEN, D.W.; PYERITZ, R.E. Upregulation of smooth muscle cell collagen production by homocysteine-insight into the pathogenesis of homocystinuria. **Mol Genet Metab**, 76: 92-99, 2002.
- MCCULLY, K.S. & WILSON, R.B. **Atherosclerosis**, 22:215-227, 1975.
- MCCULLY, K.S. Homocysteine and vascular disease. **Nat Med**, 2: 386-389, 1996.
- MOAT, S.J.; LANG, D.; MCDOWELL, I.F.; CLARKE, Z.L.; MADHAVAN, A.K.; LEWIS, M.J.; GOODFELLOW, J. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. **J Nutr Biochem**, 15:64-79, 2004.
- MORITA, H.; KURIHARA, H.; YOSHIDA, S.; SAITO, Y.; SHINDO, T.; OH-HASHI, Y.; KURIHARA, Y.; YAZAKI, Y.; NAGAI, R. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury. **Circulation**, 103: 133-139, 2001.
- OUTINEN, P.A.; SOOD, S.K.; LIAW, P.C.Y.; SARGE, K.D.; MAEDA, N.; HIRSH, J.; RIBAU, J.; PODOR, T.J.; WEITZ, J.I.; AUSTIN, R.C. Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. **Biochem J**, 332: 213-221, 1998.
- OUTINEN, P.A.; SOOD, S.K.; PFEIFER, S.I.; PAMIDI, S.; PODOR, T.J.; LI, J.; WEITZ, J.I.; AUSTIN, R.C. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. **Blood**, 94: 959-967, 1999.

PAHL, H.L.; BAEUERLE, P.A. Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. **J Virol**, 69: 1480-1484, 1995a.

PAHL, H.L.; BAEUERLE, P.A. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. **EMBO J**, 14: 2580-2588, 1995b.

PAHL, H.L.; SESTER, M.; BURGERT, H.G.; BAEUERLE, P.A. Activation of transcription factor NF-kappa B by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. **J Cell Biol**, 132: 511-522, 1996.

PAIGEN, B.; MORROW, A.; HOLMES, P.A.; MITCHELL, D.; WILLIAMS, R.A. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis**, 68: 231-240, 1987.

PESONEN, E.; KAPRIO, J.; MARTIMO, P.; RUISMAKI, A. Topography of intimal thickening in the left coronary artery of children compared with the topography of atherosclerosis. **Coron Artery Dis**, 7:459-465, 1996.

PLUMP, A.S.; SMITH, J.D.; HAYEK, T.; AALTO, K.S.; WALSH, A.; VERSTUYFT, J.G.; RUBIN, E.M.; BRESLOW, J.L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice created by homologous in ES cells. **Cell**, 71: 343-353, 1992.

POCKLEY, A.G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. **Lancet**, 362: 469-476, 2003.

PODDAR, R.; SIVASUBRAMANIAN, N.; DIBELLO, P.M.; ROBINSON, K.; JACOBSEN, D.W. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. **Circulation**, 103: 2717-2723, 2001.

RADER, J.I. Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine. **J Nutr**, 132: 2466S-2470S, 2002.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, 11: 1939-1951, 1993.

REFSUM, H.; UELAND, P.M.; NYGARD, O.; VOLLSET, S.E. Homocysteine and cardiovascular disease. **Annu Rev Med**, 49: 31-62, 1998.

ROBINSON, K.; ARHEART, K.; REFSUM, H.; BRATTSTRÖM, L.; BOERS, G.; UELAND, P.; RUBBA, P.; PALMA-REIS, R.; MELEADY, R.; DALY, L.; WITTEMAN, J.; GRAHAM, I. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. **Circulation**, 97:437-443, 1998.

RON, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest*, 110: 1383-1388, 2001.

ROSENDAAL, F.R.; VAREKAMP, I.; SMIT, C.; BROCKER-VRIENDS, A.H.; VAN DIJCK, H.; VANDENBROUCKE, J.P.; HERMANS, J.; SUURMEIJER, T.P.; BRIET, E. Mortality and causes of death in Dutch haemophiliacs. **Br J Haematol**, 71: 71-76, 1989.

ROSENDAAL, F.R.; BRIËT, E.; STIBBE, J.; VAN HERPEN, G.; GEVERS LEUVEN, J.A.; HOFMAN, A.; VANDENROUCKE, J.P. Haemophilia protects against ischaemic heart disease: a study of risk factors. **Br J of Haem**, 75: 525-530, 1990.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **N Engl J Med**, 340: 115-126, 1999.

RUBIN, E.M.; KRAUSS, R.M.; SPANGLER, E.A.; VERSTUYFT, J.G.; CLIFT, S.M. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. **Nature**, 353: 265-267, 1991.

RUTKOWSKI, D.T.; MILLER, C.N.; ARNOLD, S.M.; WU, J.; GUNNISON, K.M.; KAUFMAN, R.J. Selective posttranscriptional and posttranslational attenuation of gene expression produces adaptation to ER stress. **Plos Biol**, 4: 2024-2041, 2006.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R.J. The mammalian unfolded protein response. **Ann Rev Biochem**, 74:739-789, 2005.

SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; WILSON, P.W.F.; RUSH, D.; ROSENBERG, I.H. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **JAMA**, 270: 2693-2698, 1993.

SHIMANO, H.; HORTON, J.D.; HAMMER, R.E.; SHIMOMURA, I.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. **J Clin Invest**, 98: 1575-1584, 1996.

SPADY, D.K. Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. **Circulation**, 100: 576-578, 1999.

STARY, H.C. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. **Atherosclerosis**, 64: 91-108, 1987.

STARY, H.C.; CHANDLER, A.B.; GLAGOV, S. GUYTON, J.R.; INSULL, W.JR.; ROSENFELD, M.E.; SCHAFFER, S.A.; SCHWARTZ, C.J.; WAGNER, W.D.; WISSLER, R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, Am Heart Association. **Circulation**, 89: 2462-2478, 1994.

STARY, H.C.; CHANDLER, A.B.; DINSMORE, R.E.; FUSTER, V.; GLAGOV, S.; INSULL, W.JR.; ROSENFELD, M.E.; SCHWARTZ, C.J.; WAGNER, W.D.; WISSLER, R.W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, Am Heart Association. **Circulation**, 92: 1355-1374, 1995.

SITIA, R.; BRAAKMAN, I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. **Nature**, 426: 891-894, 2003.

SUARNA, C.; DEAN, R.T.; MAY, J.; STOCKER, R. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of alpha-tocopherol and ascorbate. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 15: 1616-1624, 1995.

THE HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta analysis. **JAMA**, 288: 2015-2022, 2002.

TOBOREK M.; KOPIECZNAGRZEBIENIAK, E.; DROZDZ, M.; WIECZOREK, M. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, 115: 217-224, 1995.

TOOLE, J.F.; MALINOW, M.R.; CHAMBLESS, L.E.; SPENCE, J.D.; PETTIGREW, L.C.; HOWARD, V.J.; SIDES, E.G.; WANG, C.H.; STAMPFER, M. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death. **JAMA**, 291:565-575, 2004.

TROEN, A.M.; LUTGENS, E.; SMITH, D.E.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J. The atherogenic effect of excess methionine intake. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100:15089-15094, 2003.

UELAND, P.M.; REFSUM, H.; BERESFORD, S.A.; VOLLSET, S.E. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. **Am J Clin Nutr**, 72: 324-332, 2000.

URANO, F.; WANG, X.; BERTOLOTTI, A.; ZHANG, Y.; CHUNG, P.; HARDING, H.P.; RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science**, 287: 664-666, 2000.

VERHAAR, M.C.; WEVER, R.M.; KASTELEIN, J.J.; VAN DAM, T.; KOOMANS, H.A.; RABELINK, T.J. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. **Circulation**, 97: 237-241, 1998.

YLA-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; ROSENFELD, M.E.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; BUTLER, S.; WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J Clin Invest**, 84: 1086-1095, 1989.

ZHANG, S.H.; REDDICK, R.L.; PIEDRAHITA, J.A.; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science**, 258: 468-471, 1992.

ZHOU, J.; MOLLER, J.; RITSKES-HOITINGA, M.; LARSEN, M.L.; AUSTIN, R.C.; FALK, E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. **Atherosclerosis**, 168: 255-262, 2003.

ZHOU, J.; MOLLER, J.; DANIELSEN, C.C.; BENTZON, J.; RAVN, H.B.; AUSTIN, R.C.; FALK, E. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in apoE-deficient mice. **Arterioscler Thromb Biol**, 21: 1470-1476, 2001.

WATANABE, M.; OSADA, J.; ARATAMI, Y.; KLUCKMAN, K.; REDDICK, R.; MALINOW, M.R.; MAEDA, N. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, 92: 1585-1589, 1995.

WEISS, N.; HEYDRICK, S.; ZHANG, Y.Y.; BIERL, C.; CAP, A. et al. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 22: 34-41, 2002.

WELCH, G.N.; LOSCALZO, J.N. Homocysteine and atherothrombosis. **N Engl J Med**, 338: 1042-1050, 1998.

WERSTUCK, G.H.; LENTZ, S.R.; DAYAL, S.; HOSSAIN, G.S.; SOOD, S.K.; SHI, Y.Y.; ZHOU, J.; NOBUYO, M.; KRISANS, S.K.; MALINOW, M.R.; AUSTIN, R.C. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. **J Clin Invest**, 107: 1263-1273, 2001.

WILCKEN, D.E.L.; DUDMAN, N.P.B. Homocystinuria and atherosclerosis. In: LUSIS, A.J.; ROTTER, J.I.; SPARKES, R.S., editors. Molecular genetics of coronary artery disease; candidate genes and process in atherosclerosis. Monographs in human genetics. New York, NY: Karger, 1992. p. 311.



8- ANEXOS

Evaluation of Mild Hyperhomocysteinemia during the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient and Normal Mice

Ana C. M. Aléssio,^{1*} Laurione C. Oliveira,² Célio X. C. Santos,³ Victor Debbas,³ Renato Haddad,⁴ and Joyce M. Annichino-Bizzacchi¹

¹*Hematology-Hemotherapy Center, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil*

²*Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil*

³*Heart Institute, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil*

⁴*Institute of Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil*

Short title: Mild HHcy in apoE^{-/-} and normal mice. Aléssio et al.

* Correspondence to Ana Claudia Morandi Aléssio

Hematology-Hemotherapy Center / State University of Campinas (UNICAMP)

P.O. Box 6198, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Tel.: +55-19-3521-8755; FAX: +55-19-3289-1089

e-mail: alessio@fcm.unicamp.br

Objective- We focused on the effect of mild HHcy on the development of atherosclerosis, using apoE^{-/-} and normal mice.

Methods and Results- Eight-week-old male normal and apoE^{-/-} mice were fed on diet-induced mild HHcy. Normal mice that presented mild HHcy did not develop atherosclerotic lesions. However, increased endoplasmic reticulum stress was present in normal mice fed on diet B (diet with deficiency of B-vitamins and excess of methionine). ApoE^{-/-} mice fed on diet B for 20 weeks presented the greatest atherosclerotic lesion area at the aortic sinus than other groups. These results suggest that the methionine may have a toxic effect on endothelium, and the B-vitamins addition on diet may have a protective effect in the long term, despite the increase on Hcy levels.

Conclusions- Mild HHcy accelerated the development of atherosclerosis in apoE^{-/-} mice, and suggest that supplementation with B-vitamins is important for prevention of vascular disease, principally in the long term.

Key Words: HHcy; atherosclerosis; apoE^{-/-} mice; normal mice (C57BL/6); folate

Epidemiological studies have shown that even mild hyperhomocysteinemia (HHcy) is associated with an increased risk of atherosclerosis, including peripheral arterial occlusive disease, coronary artery disease and cerebrovascular disease (Boushey et al., 1995). Subsequent large prospective cohort studies in general supported the earlier findings, although the magnitude of the observed associations was significantly lower, especially for coronary heart disease (CHD) (THE HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION, 2002). In addition, epidemiological studies suggested a graded and independent association between homocysteine (Hcy) levels and CVD risk extending to mild and even normal Hcy levels (Eikelboom et al., 1999). This is important because mild HHcy is common and frequently caused by dietary folate and other B vitamin deficiencies. So it was attractive to consider therapeutically altering Hcy levels by folic acid and vitamin B₁₂, which raises the prospect that simple and inexpensive dietary supplementation with B vitamins could lower CVD risk. (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 2005). Several large trials that randomized tens of thousands of participants, most with preexistent vascular disease, completed to date do not provide clear evidence of any beneficial effects of B vitamin supplementation in CVD risk reduction (Toole et al., 2004; Lonn et al., 2006; Bønaa et al., 2006). One possible reason for the failure of the initial trials of Hcy lowering to demonstrate clinical benefits is that the individuals included had already a chronic Hcy elevation with vascular alterations not reversed by vitamin supplementation.

Endothelial dysfunction is an early and persistent vascular abnormality in the evolution of atherothrombotic disease. In patients with atherosclerotic risk factors, impaired endothelial vasodilator function is notable early in the process of atherogenesis, even prior to the development of frank atherosclerotic lesions. Its extent is related to the intensity and duration of risk factor exposure and suggest that the endothelium is both a target and a mediator of atherothrombosis (Weiss et al., 2002; Worthley et al., 2001).

Several hypotheses have been proposed to explain the cellular mechanism by which HHcy promotes cardiovascular disease, including oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and the activation of pro-inflammatory factors (Lawrence de Koning et al., 2003). A proposed mechanism of vascular injury involves the ability of Hcy to cause ER stress by disrupting disulphide bond formation and causing misfolding of proteins

traversing the ER (Outinen et al., 1998; Outinen et al., 1999; Kokane et al., 2000; Ron, 2001). Transient and chronic ER stress elicited by Hcy has been shown to adversely affect several cellular functions involved in the development and progression of atherosclerosis, including lipid dysregulation, programmed cell death and inflammation (Lawrence de Koning et al., 2003).

Genetic- and diet-induced animal models of HHcy demonstrated a relationship between HHcy, endothelial dysfunction and accelerated atherosclerosis. Mild HHcy due to reduced cystathionine β -synthase (*CBS*) expression impairs endothelium-dependent vasodilation, likely due to impaired nitric oxide bioactivity, and increased oxidative stress apparently contributes to inactivating nitric oxide in chronic, mild HHcy (Eberhardt et al., 2000).

Two studies demonstrated that a moderate elevation of plasma Hcy (36 to 47 μ mol/L) accelerates the development of atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice (Hofmann et al., 2001; Zhou et al., 2001). Hofmann et al (2001) found that, when apoE^{-/-} mice were fed on a hyperhomocysteinemic diet for 8 weeks, they developed atherosclerotic lesions in the aorta of greater size and complexity than those seen in apoE^{-/-} mice fed on normal chow. Furthermore, diet-induced HHcy promoted NF- κ B activation in aortic tissue, leading to the increased expression of the pro-inflammatory adhesion molecule VCAM-1, as well as the pro-inflammatory mediators RAGE and EN-RAGE. The ability of Hcy to activate NF- κ B and enhance vascular inflammatory processes may in part be related to its ability to cause ER stress (Pahl et al., 1995; Pahl et al., 1996). Zhou et al (2001) fed apoE^{-/-} mice a high-fat diet, and some mice received supplemental methionine or Hcy to produce moderate HHcy. After 3 months, the mice fed on hyperhomocysteinemic diets had significantly larger mean aortic lesion areas, compared with apoE^{-/-} mice fed on a control diet. These studies represent a major advance in the understanding of the pathophysiology of HHcy, since they demonstrated that HHcy is atherogenic, at least in the presence of another potent risk factor (Hofmann et al., 2001; Zhou et al., 2001).

In the present study, we sought to test the effects of early and late mild HHcy induced by different diets on the development of atherosclerosis using apoE^{-/-} and normal (C57BL/6) mice. In addition, we measured the expression of protein related to ER stress.

Materials and Methods

Animals and Diet

The animal protocols were approved by the University's Committee for Ethics in Animal Experimentation and followed the "Principles of Laboratory Animal Care". Normal mice (C57BL/6) were obtained from CEMIB (Bioterism Center at the State University of Campinas) at 3-5 weeks of age, and apoE^{-/-} mice (C57BL/6), from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA), and maintained at our laboratory (Hematology and Hemotherapy Center Biosafety Certificate: CQB 0072/98, published on September 30th, 1998). Male normal and apoE^{-/-} mice were maintained on standard rodent chow (diet A) until 8 weeks of age. Mice were divided into four groups, receiving specific diets: diet A; diet enriched in methionine with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆ (diet B); diet enriched in methionine and folate, vitamins B₁₂ and B₆ (diet C), and diet with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆ (diet D). The diet enriched in folate, vitamins B₁₂ and B₆, and the diet with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆ were acquired from HN&C Consultory, linked to the ITAL (Food Technology Institute). These diets were formulated on basis of the AIN93M diet (Reeves et al., 1993) with modifications in levels of folate, vitamin B₁₂ and B₆ (Table 1) (Troen et al., 2003). Mice received L-Methionine (Ajinomoto) by gavage (0.5 g/Kg body weight per day) and body weights were evaluated weekly to control methionine ingestion.

Collection of blood

Blood was collected twice. The first blood sample was collected before starting the treatment of the mice. The second sample was taken after receiving the diets. Blood was collected into EDTA-containing eppendorfs, and centrifuged at 3 000 rpm for 15 minutes. Plasma was stored at -80°C until further analysis.

Plasma analysis for Hcy, B₁₂ and folic acid

The plasma Hcy level was analyzed by the HPLC/MS/MS, using Q-Trap equipment (Applied-Biosystems-QqQTrap). The plasma vitamin B₁₂ and folic acid levels were measured with the ⁵⁷Co vitamin B₁₂ and ¹²⁵I folic acid Dualcount solid phase, no boiling radioassay (Diagnostic Products, Los Angeles, CA) (Lee et al., 2004).

Extraction of DNA and genotyping of the apolipoprotein E alleles

Extraction of DNA in apoE^{-/-} mice was performed using the GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ). The polymerase chain reaction (PCR) was performed using 2 µl (5-20 ng) of the DNA per reaction, and the primers oIMR0180 (5'-gCCTAgCCgAgggAgAgCCg-3'), oIMR0181 (5'-TgTgACTTgggAgCTCTgCAgC-3'), and oIMR0182 (5'-gCCgCCCCgATgCATCT-3'). The product of the PCR for the normal allele presents a fragment of 155 pb and the mutant allele presents a fragment of 245 pb.

Histological analysis of atherosclerotic lesions

Hearts from anesthetized mice were perfused with isotonic saline solution (0.9%) followed by buffered neutral formalin (10%), after which they were excised and fixed in formalin (10%) for at least two days. The hearts were then embedded sequentially in 5%, 10% and 25% gelatin. Processing and staining were carried out, according to Paigen et al (1987). The lipid stained lesions were quantified as described by Rubin et al (1991), using the Image Pro Plus software (version 3.0) for image analysis (Media Cybernetics, Silver Spring, MD; USA). The slides were analyzed without identification of the diet and genotypes. The area of the lesions was expressed as the sum of the lesions in six 10 µm-sections, at a distance of 80 µm from each other, along 480 µm of the aorta. Since several studies have revealed a predilection for the development of lesions in the aortic root (Rubin

et al., 1991), the segment that was chosen for analysis extended from beyond the aortic sinus up to the point where the aorta first becomes rounded.

Western blot

Carotids were triturated in liquid nitrogen and submitted to protein extraction with a lysis buffer containing 20mM HEPES, 150mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton, 1mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptine and 1mM PMSF. The extracts (30µg) were submitted to electrophoresis in 10% polyacrilamide gel at an electric current of 25mA per gel. Semi-dry transfer was used to transfer proteins to the nitrocellulose membrane for 1 hour with a 50mA electric current. Transfer efficiency was analyzed by membrane protein detection using Ponceau reagent. The membrane was blocked with TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% skim med milk for 2 hours. After TBS-T washing, the membrane was incubated with anti-KDEL antibody (1:1000) (Stressgen) overnight at 4°C. After this period, the membrane was washed with TBS-T, incubated with secondary anti-mouse-HRP antibody (1:2000) (Calbiochem) for 1 hour, and submitted to quimiluminescent reaction with ECL and exposed to autoradiographic film.

The expression of the Grp78 and Grp94 proteins were analyzed in the apoE^{-/-} mice at three time points: 2 weeks, 8 weeks and 20 weeks; and in the normal mice these protein expressions were measured at two time points: 2 weeks and 24 weeks.

Statistical Analysis

Data are reported as median and range measurements. The Mann-Whitney test was used to compare continuous variables between the two groups. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Normal mice (C57BL/6)

Table 2 shows the plasma Hcy, folate, and vitamin B₁₂ levels in normal mice according to diets. Normal mice fed with diets B, C, and D presented a mild increase in Hcy levels when compared to mice treated with diet A (diet B *vs.* diet A, $P=0.009$; diet C *vs.* diet A, $P=0.002$; diet D *vs.* diet A, $P=0.02$). Vitamin B₁₂ levels were statistically increased in mice treated with the diet C compared to mice treated with the other diets (diet A *vs.* diet C, $P=0.003$; diet B *vs.* diet C, $P=0.0004$; diet D *vs.* diet C, $P=0.001$). Mice fed on diets B and D presented decreased vitamin B₁₂ levels, when compared to mice fed on diet A (diet B *vs.* diet A, $P=0.009$; diet D *vs.* diet A, $P=0.01$). Folate levels were decreased in mice fed on diets B and D, compared to mice fed on diets A and C (diet A *vs.* diet B, $P=0.009$; diet A *vs.* diet D, $P=0.01$; diet C *vs.* diet B $P=0.0002$; diet C *vs.* diet D, $P=0.0007$). The histological analysis demonstrated that normal mice fed on four specific diets for 24 weeks did not develop atherosclerotic lesions in the aortic root.

ApoE^{-/-} mice

Genotyping of the apolipoprotein E alleles was performed in all apoE^{-/-} mice to confirm the presence of the mutation. Table 3 demonstrates the plasma Hcy levels, and values of the atherosclerotic lesion in the apoE^{-/-} mice treated for 8 and 20 weeks, according to diets. ApoE^{-/-} mice, fed on diets B and C for 8 weeks, presented a statistically significant increase in Hcy levels, when compared to the apoE^{-/-} mice fed on the diet A ($P=0.0001$ and $P=0.0004$, respectively). The same increase was observed in the apoE^{-/-} mice treated for 20 weeks with diets B, C and D (diet A *vs.* diet B, $P<0.0001$; diet A *vs.* diet C, $P<0.0001$; diet A *vs.* diet D, $P=0.0004$).

Statistical analysis showed that apoE^{-/-} mice fed on diets B, C and D for 20 weeks presented a significant increase in atherosclerotic lesion, compared to apoE^{-/-} mice fed on diet A ($P<0.0001$). However, the increase in the atherosclerotic lesion in apoE^{-/-} mice fed on diets C and D for 20 weeks was lower than in mice fed on diet B, and this difference

was statistically significant ($P=0.05$ and $P=0.04$, respectively). ApoE^{-/-} mice fed on diets B, C, and D for 8 weeks presented a statistically significant increase in atherosclerotic lesion, compared to mice fed on diet A ($P=0.001$, $P=0.009$, and $P=0.01$, respectively).

Folate and vitamin B₁₂ levels were decreased in mice that fed on diets B and D, compared to mice that fed on diets A and C ($P<0.05$). Mice fed on diet C presented higher vitamin B₁₂ levels than mice fed on diet A ($P<0.05$), however, the folate level did not demonstrate any statistically significant difference between these groups (Table 4).

Western blot

Possible vascular alterations were assessed at the physiological level by Western blotting. Due to the lower number of animals, pool of carotid samples from apoE^{-/-} and normal mice fed on diets A, B and D were assessed. The results of this analysis demonstrated that normal mice fed on diet B for 24 weeks presented a mild increase in ER stress, in relation to the control. However, in normal mice treated for 2 weeks no difference was observed in ER stress, compared to mice fed on the other diets. The apoE^{-/-} mice fed on diet B for 20 weeks presented an increase in ER stress, compared to the other diets. However, apoE^{-/-} mice fed on diets to induce HHcy for 2 and 8 weeks did not demonstrate any difference in ER stress, compared to the other diets.

Discussion

A model of chronic mild HHcy due to vitamin-deficient diet is very useful for mimicking and assessing the specific adverse vascular effects of Hcy, as vitamin-B deficiency is the more common cause of HHcy in human. Although vitamin-deficient diet studies in primates may be accompanied by other effects of vitamin deficiency states that modulate arterial function, this represents a very common finding in humans (Lentz et al., 2001a). Indeed, the analysis of association between mild HHcy and other risk factors for arterial disease is also very interesting.

In this study, we focused on the effect of controlled mild HHcy on the development of atherosclerosis using apoE^{-/-} and normal mice. Mice received diets enriched in methionine with low or high levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆, and diet only with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆.

It should be emphasized that one relevant point of our study is the strict control of the oral methionine intake by gavage and different chows to obtain a mild HHcy. Plasma Hcy levels of about 3 to 5 fold the concentration found in wild-type mice represents the same proportional increase of mild HHcy defined in human.

Asymptomatic patients with this condition (mild HHcy) are the most benefited by advancing knowledge. Our study differs from other controlled diet studies, in which a moderate or severe HHcy was observed. The only previous study investigating the effect of mild HHcy on atherosclerotic lesion of the aortic root used mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) (Chen et al., 2001). Heterozygous knockout mice showed mild HHcy with lipid deposition only after 14 months of age. In our study wild-type mice fed for 6 months with four different diets despite showing mild HHcy, presented no histological vascular lesion, suggesting that time of exposition could be an important factor to be considered. Indeed, heterozygous knockout mice presented other alterations, not excluding the intervention of other parameters in arterial lesion. In our study, despite strict control of mild HHcy, there was always an association with other factors that may or may not favor an effect, such as the increased methionine intake and deficiency of B-vitamins. These observations show the difficult to find a model that contemplates all variables for this analysis.

Atherosclerosis is a progressive condition that begins early in life. Fatty streaks and intimal thickenings, the initial lesions of atherogenesis, have been found in the coronary arteries of infants and children, suggesting a role for the prenatal and childhood environment in the pathogenesis of atherosclerosis (Personel et al., 1996; Stary et al., 1987). Previously we analyzed C677T *MTHFR* mutation and Hcy levels in children and adults healthy Brazilian individuals (Aléssio et al., 2004). We showed that even less common, HHcy can be present at infancy and that B-vitamin status is the more important determinant factor. So, we could speculate that asymptomatic mild HHcy starting at infancy

could induce histological or functional vascular alterations, contributing to atherosclerotic disease in adulthood. This could explain, in part, the negative results observed on prospective studies regarding arterial disease after grain enrichment with B-vitamin, besides normalization of Hcy levels. Maybe, micro or macroscopic vascular lesions already present since childhood could not be reversed, in spite of Hcy normalization. So, the final results of B-vitamin enrichment only will be concluded in 4 to 5 decades, when the children that received this enriched diet since birth will be adults.

Studies have demonstrated that HHcy accelerates atherosclerosis in apoE^{-/-} mice (Zhou et al., 2001; Zhou et al., 2003). Although these studies showed that HHcy is atherogenic, at least in the presence of hyperlipidemia, the pathogenic pathways responsible for this effect are not clearly defined (Lentz, 2001b).

In our study, ApoE^{-/-} mice fed for 8 weeks on diets supplemented in methionine with or without B-vitamin (diets B and C, respectively), or only by B-vitamin deficiency (diet D) showed mild HHcy and a significant increase in the atherosclerotic lesion size of the aortic root.

Furthermore, mild HHcy was associated with acceleration of atherosclerosis in apoE^{-/-} mice fed on these diets for a period of 20 weeks. However, the increase in atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice fed on diet B was significantly higher than that in mice fed on diets C and D. These results emphasize the interaction of factors on the development of atherosclerosis. The synergism of a decreased folate, vitamin B₁₂ and B₆ levels, increased methionine intake, and mild HHcy associated with dislipidemia represents the most important association, present in group B.

McCully et al (1975) demonstrated that rare congenital defects in Hcy metabolism are associated with premature thrombotic and atherosclerotic disease, whether the defects occur in the genes of the transsulfuration pathway (which are associated with elevated methionine) or of the methylation pathway (which are associated with low methionine). This observation has often been cited as key evidence supporting the view that vascular disease in HHcy and particularly atherosclerosis is due to Hcy *per se* rather than an effect

of its metabolic determinants. However, Hcy levels are so high in those individuals that methionine could be considered a secondary factor in this context.

The literature reports discrepant results regarding the effect of an excess of methionine intake on artery plaque formation and HHcy (Hofmann et al., 2001; Troen et al., 2003). As such, we included normal and apoE^{-/-} mice fed on diet C with increased methionine and normal B-vitamin for 8 and 20 weeks, to investigate the role of methionine about this aspect. Unexpectedly, as observed by Hofmann et al (2001), we found increased Hcy levels in normal and apoE^{-/-} mice. However, increased atherosclerotic lesions were observed only in apoE^{-/-} mice, at both times of observation. Maybe, the time of exposition could explain absence of vascular lesions on normal mice.

When comparing apoE^{-/-} mice fed on diets B and D, which differ only by the presence of methionine, results support the hypothesis of a toxic effect of this amino acid on vasculature, associated with an increase in Hcy levels. HHcy was higher in the group B, and this may be the consequence of both B-vitamin deficiency and vascular lesion.

Studies have demonstrated that total plasma Hcy, plasma folate and vitamin B₆ levels correlate inversely (Selhub et al., 1993), and that low folate and vitamin B₆ levels are more frequent among patients with athero-thrombosis than among control subjects (Graham et al., 1997; Robinson et al., 1998). Moreover, previous studies have shown that folic acid is capable of reversing endothelial dysfunction both *in vitro* and *in vivo* (Moat et al., 2004). More recently, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate have been shown to have direct effects on the vasculature that are independent of changes in Hcy concentrations (Doshi et al., 2001; Verhaar et al., 1998). In our study, apoE^{-/-} mice fed on a diet enriched in folate, vitamins B₁₂ and B₆ (group C) showed a decreased development of atherosclerotic lesions than mice treated with diet deficient in these vitamins (diet B), both subjected to an overload of methionine. These results suggest a protective time-dependent effect of B-vitamins on vascular disease.

A causal relationship between diet-induced HHcy and accelerated atherosclerosis has been established in the apoE^{-/-} mice. However, it is not known whether the proatherogenic effect of HHcy in apoE^{-/-} mice is independent of hyperlipidemia and/or

deficiency of apoE. The inclusion of normal mice (C57BL/6) submitted to the same regimens of apoE^{-/-} mice for 24 weeks showed that mild HHcy was not associated with atherosclerotic lesions, even in the presence of increased methionine intake, or decreased folate, vitamins B₁₂ and B₆ levels. However, a functional abnormality, demonstrated by increased ER stress, was present only in the group B, in which mice were maintained on a diet that associated all deleterious factors predisposing to atherosclerosis. As such, we could suggest that this is an initial alteration that could contribute to future atherosclerotic lesions.

In conclusion, normal mice fed on diet-induced mild HHcy showed functional vascular alteration only when various risk factors are present. Furthermore, our results suggested that in a time-dependency, supplementation with folate, vitamin B₁₂ and B₆ can protect arterial vascular disease even in the presence of mild HHcy. Finally, methionine overload induced atherosclerotic lesions on apoE^{-/-} mice.

Acknowledgments

We thank David A. Silva for technical assistance in the plasma analysis of vitamin B₁₂ and folate levels.

Sources of Funding

This study was supported by the FAPESP.

References

- Aléssio ACM, Annichino-Bizzacchi JM, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Höehr NF. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *Am J Med Genet A*. 2004;128A:256-260.
- Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM; et al. NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;354:1578-1588.
- Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA*. 1995; 274:1049-1057.
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SWM, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet*. 2001;10:433-443.
- Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, Lewis MJ, Goodfellow J. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1196-1202.
- Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A et al. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 2000;106: 483–491.
- Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease. *Ann Intern Med*. 1999;131:363-375.
- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*. 1997;277:1775-1781.

- Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ Jr, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest.* 2001;107:675-683.
- Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:806-812.
- Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2000;275:32846-32853.
- Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem.* 2003;36:431-441.
- Lee H, Kim HJ, Kim JM, Chang N. Effects of dietary folic acid supplementation on cerebrovascular endothelial dysfunction in rats with induced hyperhomocysteinemia. *Brain Res.* 2004;2:139-147.
- Lentz SR, Piegors DJ, Malinow RM, Heistad DD. Supplementation of atherogenic diet with B vitamins does not prevent atherosclerosis or vascular dysfunction in monkeys. *Circulation.* 2001a;103:1006-1011.
- Lentz SR. Does homocysteine promote atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001b;21:1385-1386.
- Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ; et al. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1567-1577.
- McCully KS & Wilson RB. *Atherosclerosis.* 1975; 22:215-227.
- Moat SJ, Lang D, McDowell IF, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, Goodfellow J. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *J Nutr Biochem.* 2004;15:64-79.

- Outinen PA, Sood SK, Liaw PCY, Sarge KD, Maeda N, Hirsh J, Ribau J, Podor TJ, Weitz JI, Austin RC. Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochem J*. 1998;332:213-221.
- Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC. Outinen et al., Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*. 1999;94:959-967.
- Pahl HL, Baeuerle PA. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J*. 1995;14:2580-2588.
- Pahl HL, Sester M, Burgert HG, Baeuerle PA. Activation of transcription factor NF-kappaB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J Cell Biol*. 1996;132:511-522.
- Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987;68:231-240.
- Pesonen E, Kaprio J, Martimo P, Ruismaki A. Topography of intimal thickening in the left coronary artery of children compared with the topography of atherosclerosis. *Coron Artery Dis*. 1996;7:459-465.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;11:1939-1951.
- Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Wittman J, Graham I. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation*. 1998;97:437-443.
- Ron D. Hyperhomocysteinemia and function of the endoplasmic reticulum. *J Clin Invest*. 2001;107:1221-1222.

- Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*. 1991;353:265-267.
- Stary HC. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*. 1987;64:91–108.
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA*. 1993;270:2693-2698.
- THE HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta analysis. *JAMA*. 2002;288:2015-2022.
- Toole JF, Malinow MR, Chambless LE; et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death. *JAMA*. 2004;291:565-575.
- Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15089-15094.
- Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;97:237-241.
- Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Losclazo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med*. 2002;7:227-239.
- Worthley SG, Osende JJ, Helft G, Badimon JJ, Fuster V. Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes. *Mt Sinai J Med*. 2001;68:167-181.
- Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2003;168:255-262.

Zhou J, Moller J, Danielsen CC, Bentzon J, Ravn HB, Austin RC, Falk E. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1470-1476.

Table 1. Folate, B₁₂, and B₆ levels in diets

Nutrient content per Kg diet			
Diet	Folate, mg	B ₁₂ , µg	B ₆ , mg
Diet A	2	30	8
Diet B	0.11	1.8	0.15
Diet C	6	75	21
Diet D	0.11	1.8	0.15

Table 2. Hcy, folate, and vitamin B₁₂ levels in normal mice after 24 weeks on diet

	n	Hcy (μmol/L)	Folate (ng/mL)	B ₁₂ (pmol/L)
Diet A	4	3.4 (2.1-4.0)	87.1 (56.7-102.9)	19 026 (14 719-23 086)
Diet B	6	15.7 (11.6-32.1)	8.6 (5.5-17.6)	7 448 (5 566-8 489)
Diet C	10	13.3 (6.1-20.7)	62.1 (36.0-84.6)	31 744 (25 575-37 464)
Diet D	5	9.4 (5.3-12.5)	9.5 (6.8-16.5)	8 382 (7 502-10 648)

Values are median (min-max)

Legend:

Diet A: standard rodent chow

Diet B: diet enriched in methionine with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆

Diet C: diet enriched in methionine and folate, vitamins B₁₂ and B₆

Diet D: diet with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆

Table 3. Plasma Hcy, and atherosclerotic lesion in apoE^{-/-} mice, according to diets

Diet	8 weeks on diet		20 weeks on diet	
	Lesion area (μm ²)	Hcy (μmol/L)	Lesion area (μm ²)	Hcy (μmol/L)
A	42 945 (6 500-165 300) n=12	3.1 (1.2-6.4) n=10	291 250 (46 200-1 261 800) n=10	3.0 (1.7-5.0) n=10
B	150 400 (59 000-364 600) n=10	11.4 (9.9-43.1) n=7	2 089 500 (1 431 000-3 587 100) n=10	13.8 (11.5-29.2) n=10
C	146 630 (55 400-541 600) n=10	11.1 (5.6-17.3) n=7	1 500 600 (1 270 800-2 374 500) n=11	9.3 (5.6-32.2) n=11
D	161 430 (20 100-499 700) n=10	9.6 (1.0-15.6) n=7	1 662 600 (743 600-2 014 000) n=10	7.3 (2.3-14.5) n=11

Values are median (min-max)

Legend:

Diet A: standard rodent chow

Diet B: diet enriched in methionine with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆

Diet C: diet enriched in methionine and folate, vitamins B₁₂ and B₆

Diet D: diet with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆

Table 4. Vitamin B₁₂ and folate levels in ApoE^{-/-} mice after 20 weeks on diet

	n	Folate (ng/mL)	B ₁₂ (pmol/L)
Diet A	8	101.8 (75.6-117.6)	12 860 (10 086-18 329)
Diet B	12	7.7 (4.4-13.2)	4 748 (2 451-7 467)
Diet C	12	89.9 (65.1-96.1)	34 948 (28 613-48 465)
Diet D	8	14.3 (8.8-26.4)	3 084 (1 785-4 058)

Values are median (min-max)

Legend:

Diet A: standard rodent chow

Diet B: diet enriched in methionine with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆

Diet C: diet enriched in methionine and folate, vitamins B₁₂ and B₆

Diet D: diet with low levels of folate, vitamins B₁₂, and B₆



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **624-1**, sobre **"AVALIAÇÃO DA HIPERHOMOCISTEINEMIA NA EVOLUÇÃO DA ATHEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS COM HEMOFILIA B, DEFICIÊNCIA DA APOLIPOPROTEÍNA E E/OU DOS RECEPTORES PARA LDL"** sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi/Ana Claudia Morandi Aléssio** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05 de Dezembro de 2003.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **624-1**, entitled **"EVALUATION OF HIPERHOMOCISTEINEMIA IN THE DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS IN HEMOPHILIA B, APOLIPOPROTEIN E-DEFFICIENT AND/OR LDL RECEPTOR-DEFICIENT MICE"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 5, 2003.

Campinas, 05 de Dezembro de 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3788-6359
FAX 55 19 32893124

ANEXO 2 - 05-12-2003 - 13-08-2003 - 13-08-2003 - 13-08-2003 - 13-08-2003