

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**EFEITOS FISIOLÓGICOS DA SUPLEMENTAÇÃO  
ASSOCIADA DAS VITAMINAS B6 E B9 EM RATOS  
SHR-SP**

**SAMANTA CORREA PEREZ**

**Profa. Dra. Lucia Marques Vianna**  
ORIENTADORA

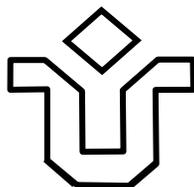
**Rio de Janeiro, RJ – Brasil**

**2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

Dissertação apresentada ao término do Curso de Pós-Graduação Stricto-Sensu em Neurologia, Área de Concentração Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2005

**PEREZ, Samanta Corrêa**

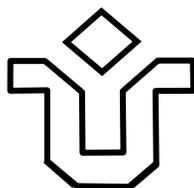
**Efeitos fisiológicos da suplementação associada das vitaminas B6 e B9 em ratos SHR-sp / Samanta Corrêa Perez – Rio de Janeiro (s.n), 2005**

**XI, 61f**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Neurologia.**

**Orientador: Profa.Dra. Lucia Marques Vianna**

**1. Piridoxina 2. ácido fólico 3. AVE 4. SHR-sp**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**EFEITOS FISIOLÓGICOS DA SUPLEMENTAÇÃO  
ASSOCIADA DAS VITAMINAS B6 E B9 EM RATOS  
SHR-SP**

Por

**SAMANTA CORREA PEREZ**

Dissertação de Mestrado

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Lucia Marques Vianna

Prof.Dr. Gilson Teles Boaventura

Prof.Dr. Rossano Kepler Alvim Fiorelli

Conceito:.....

Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2005

“Faça de sua mente um reino, não uma jaula!  
Deixe que os seus pensamentos sejam livres  
como os pássaros voando, não os censure,  
nem se maldiga se eles não afinarem com  
a opinião da maioria!”

Dr. Maxwell Maltz (1899-1975)

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, agradeço por permitir que eu conquiste mais uma vitória em minha vida.*

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Marques Vianna, quero agradecer a credibilidade, o apoio, os inúmeros conselhos e a revisão exaustiva desse texto, bem como o entusiasmo que sempre demonstrou por esse trabalho.*

*Ao meu companheiro Paulo Sergio Vieira Carneiro, agradeço o apoio dado durante essa jornada, principalmente nos finais de semana, por estar sempre presente no laboratório, me ajudando a desenvolver esse ensaio.*

*Aos meus amigos, cuja presença é por si fator motivador; quero agradecer o incentivo.*

*Este trabalho nunca seria possível sem o apoio da minha mãe e do meu pai, principalmente nos momentos difíceis. A eles não somente agradeço a paciência e o carinho, como também dedico esse trabalho, simbolizando mais uma conquista em minha vida.*

## RESUMO

O estresse oxidativo vem sendo associado ao Acidente Vascular Encefálico (AVE), o que suscita o interesse pela investigação acerca da provável ação dos agentes anti-oxidantes naturais envolvidos no metabolismo da homocisteína. Assim, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) stroke – prone, machos (n=12), foram mantidos em gaiolas metabólicas, em biotério com condições de temperatura, umidade e exaustão controladas, recebendo ração Nuvilab e água ad libitum. Após o período basal de 10 dias, os animais foram subdivididos em grupos: suplementado e controle. O grupo suplementado recebeu por gavagem orogástrica: piridoxina e ácido fólico, em doses equivalentes a 5, 10 e 20 vezes suas necessidades nutricionais, sendo cada dose administrada num período de quatro semanas. A Pressão Sistólica foi determinada por pletismografia. Procedemos a análise diária dos parâmetros biológicos gerais e de interesse neurológico. Após a determinação da curva dose-efeito, outro grupo (n=12) controle e tratado com 10 vezes as necessidades de piridoxina e ácido fólico durante quatro semanas, mantidos sob as mesmas condições ambientais descritas, foram avaliados quanto aos níveis plasmáticos de homocisteína, MDA e PCR. Os dados foram tratados pelo teste t – student. Nossos resultados revelaram que o tratamento tem efeito hipotensor dose- dependente; levando à redução de aproximadamente 25mmHg com doses equivalentes a 10 e 20 vezes a RDA. A suplementação com doses equivalentes a 5 vezes a RDA não provocou qualquer efeito. Da mesma forma, com 32 semanas de idade, 83,3% dos animais sob tratamento não apresentaram sinais de AVE, naturalmente detectados nessa linhagem. Além disso, o tratamento foi capaz de reduzir a homocisteína e MDA, apresentando forte correlação com a hipertensão arterial. Não houve diferença de PCR entre os grupos. Nossos resultados sugerem que as vitaminas hidrossolúveis B6 e B9 poderiam ser coadjuvantes da terapia preventiva do AVE.

## ABSTRACT

The oxidative stress has been associated to the stroke, which enhances the interest for the investigation about the role of natural antioxidants involved on homocysteine metabolism. Then, 12 male Spontaneously Hypertensive Rats Stroke Prone (SHR-SP) were maintained in metabolic cages, in bioterium with controlled conditions: temperature, humidity, exhaustion, received Nuvilab rat chow and water *ad libitum*. After 10 days of basal period, the animals were subdivided into two groups: supplemented and control. The supplemented group received pyridoxine and folic acid at doses correspondent to 5, 10 and 20 times their nutritional needs by orogastric gavage. The systolic blood pressure was determined by pletismography. The general biological and neurological parameters were analyzed daily. After the dose-effect curve determination, another group (n=12) was maintained under the same environmental conditions and subdivided into two groups: control and supplemented. The supplemented group received pyridoxine and folate at dose correspondent to 10 times their nutritional needs. After 4 weeks, the blood sample was collected to determine homocysteine, MDA and PCR levels. The data was treated by t- student test. Our results showed that the treatment had a dose dependent hypotensive effect promoting a reduction of 25 mmHg with 10 and 20 times doses correspondents RDA. The supplementation with 5 times doses correspondents did not have any effect. At the same way, at 32 weeks of age, 83,3% of the animals under treatment did not present signs of stroke naturally detected in that linkage. Furthermore, the treatment was able to reduce the plasma levels of homocysteine and MDA, showing high correlation with hypertension. Our results suggest that hidrossoluble vitamins B6 and B9 could be beneficial for preventive therapy of stroke.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
1.1. Metabolismo da homocisteína .....	<b>05</b>
1.2. Homocisteína, lesão vascular e AVE: possíveis mecanismos de ação.....	<b>08</b>
1.3. O modelo SHR-SP .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>18</b>
3.1. Animais e Dieta .....	<b>18</b>
3.2. Parâmetros Biológicos Gerais .....	<b>19</b>
3.3. Parâmetros biológicos específicos .....	<b>19</b>
3.3.1. Parâmetros Neurológicos .....	<b>19</b>
3.3.2. Estudo da pressão arterial sistólica: Plestismografia .....	<b>20</b>
3.4. Suplementação das vitaminas B6 e B9 e determinação da curva dose-efeito	<b>21</b>
3.5. Suplementação com as vitaminas B6 e B9 em dose correspondente a 10 vezes as necessidades nutricionais e determinação dos parâmetros bioquímicos.....	<b>22</b>
3.5.1. Dosagem de Homocisteína .....	<b>24</b>
3.5.2. Dosagem de Dialdeído Malônico .....	<b>24</b>
3.5.3. Dosagem de Proteína C Reativa (PCR) .....	<b>25</b>
3.6. Análise dos resultados .....	<b>25</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
4.1. Pressão Arterial .....	<b>26</b>
4.2. Parâmetros gerais e neurológicos .....	<b>30</b>
4.3. Parâmetros bioquímicos .....	<b>32</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

<b>Figura 1</b>	Metabolismo da homocisteína.....	<b>07</b>
<b>Figura 2</b>	Pressão Sistólica de SHR-SP controles e tratados com a primeira dose (0,6mg de piridoxina e 0,1mg de ácido fólico)..	<b>27</b>
<b>Figura 3</b>	Pressão sistólica de SHR-SP controles e tratados com a segunda dose (1,2mg de piridoxina e 0,2mg de ácido fólico).	<b>28</b>
<b>Figura 4</b>	Pressão sistólica de SHR-SP controles e tratados com a terceira dose (2,4mg de piridoxina e 0,4mg de ácido fólico)...	<b>29</b>
<b>Figura 5</b>	Teste cognitivo: labirinto.....	<b>31</b>
<b>Figura 6</b>	Níveis de MDA de ratos SHR-SP controles e tratados com dose equivalente a 10 vezes as necessidades nutricionais. (1,2mg de B6 e 0,2mg de B9).....	<b>33</b>
<b>Figura 7</b>	Níveis de Homocisteína de ratos SHR-SP controles e tratados com dose equivalente a 10 vezes as necessidades nutricionais. (1,2mg de B6 e 0,2mg de B9).....	<b>34</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS.

AVE	Acidente Vascular Encefálico
B6	Vitamina piridoxina
B9	Vitamina ácido fólico
HPLC	high performance liquid chromatography
MDA	Malondyaldeide
mg	Miligramas
mmHg	Milímetros de mercúrio
PCR	Proteína C Reativa
RDA	Recommended Dietary Allowances
Rpm	Rotações por minuto
SHR-SP	Spontaneously Hypertensive Rat Stroke-Prone
VISP	The vitamin intervention for stroke prevention

## 1. INTRODUÇÃO.

Entre todas as doenças neurológicas da vida adulta, as vasculopatias cerebrais ocupam claramente o primeiro lugar em freqüência e importância. O acidente vascular encefálico (AVE) é considerado a primeira causa de incapacidade motora, sensitiva e cognitiva no mundo atual (American Heart Association 1998), a primeira causa de morte no Brasil (Lessa 1999) e segunda causa de morte na maioria dos países desenvolvidos (Murray e Lopez 1997).

O termo acidente vascular encefálico significa o comprometimento súbito da função cerebral causado por inúmeras alterações histopatológicas, resultantes de oclusão da luz dos vasos sanguíneos por um trombo ou êmbolo, ruptura, lesão ou alteração da permeabilidade da parede do vaso e aumento da viscosidade ou outra modificação na qualidade do sangue.

Aproximadamente 70 a 80% dos AVE são causados por isquemia, ou seja, um baixo fluxo sanguíneo cerebral, sendo os de natureza hemorrágica menos freqüentes, mas que se associam a maior fatalidade.

Por existirem limitadas opções de tratamento, nos últimos anos estudos têm sido dedicados à identificação de fatores de risco para essa doença de grande impacto social, com o objetivo de prevenir a sua ocorrência.

Dentre os principais fatores de risco modificáveis a hipertensão arterial, como uma causa isolada, vem sendo há vinte anos a mais importante morbidade nas grandes cidades e o mais potente dentre os fatores de risco conhecidos para as doenças cerebrovasculares, (DAS 2001; Joing National

Committee 1997) estando presente em mais da metade dos casos de AVE agudo. (Andre 1994; Britton *et al* 1986; Sandercock 1989)

Um estudo de causas múltiplas de óbito, realizado no Estado de São Paulo, identificou que a notificação da doença cerebrovascular correlaciona-se muito mais com o diagnóstico secundário de hipertensão arterial do que o observado entre doença coronária e hipertensão. (Santo 2000). Essa correlação também foi observada no estudo de Staessen *et al* (1997)

A hipertensão tem sido considerada um fator preditivo tanto para o evento hemorrágico quanto para o isquêmico, (Lessa 1999, Radanovic 1999) sendo a maior causa de infarto lacunar, com papel menos relevante no infarto aterotrombótico. (Ribeiro 2003 ;Pinto *et al* 2004).

Apesar de parecer óbvio a relação entre controle medicamentoso da hipertensão e redução da ocorrência de AVE, estudos epidemiológicos como os de Dahlof *et al* (1991) e Brown *et al* (2000) não mostraram essa relação. Paralelamente, os achados de Richter *et al* (2001) mostraram que o uso de alguns agentes anti-hipertensivos além de onerosos, podem causar efeitos colaterais indesejáveis, tornando-se necessária a identificação de novas terapias alternativas menos agressivas.

A integridade do endotélio é fundamental para a manutenção dos níveis pressóricos, visto que muitos casos de hipertensão estão associados ao aumento da resistência vascular periférica causada por lesão endotelial e formação de ateroma. Embora qualquer artéria possa ser afetada, a aorta e os sistemas cerebral e coronário são os alvos principais, sendo a isquemia cerebral uma das conseqüências da doença.

O estresse oxidativo, ou seja, o desequilíbrio entre os radicais livres pró oxidantes e os antioxidantes, tem sido apontado como principal agente causal de lesão por ter ação direta nas células endoteliais, resultando em dano estrutural e funcional. Em vista disso, existem fortes evidências de que os radicais livres têm importante papel na alteração dos níveis pressóricos e na lesão cerebral durante a isquemia e reperfusão sanguínea. (Traystman *et al* 1991).

Recentemente estudos em humanos vêm mostrando a associação entre marcadores de estresse oxidativo, em especial o dialdeído malônico (MDA), acidente vascular encefálico e baixos níveis séricos de vitaminas antioxidantes: alfa tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e beta caroteno, (Leinonen 2000; Polidori 2002) sendo crescente o interesse pela investigação sobre a possível ação neuroprotetora desses nutrientes. (Cherubini *et al* 2000) Modelos roedores vêm mostrando que nutrientes como a vitamina E, ginkgo biloba (Noguchi *et al* 2004) extrato de chá verde, e resveratrol apresentam efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido durante a isquemia-reperfusão sanguínea.

Entretanto as manobras com esses antioxidantes ainda apresentam controvérsias entre resultados epidemiológicos, clínicos e experimentais. (Ascherio 1999; Asplund 2002)

Por outro lado, baixos níveis séricos de folato (B9) e piridoxina (B6), estão presentes em pacientes vítimas de AVE, podendo existir um possível efeito protetor dessas vitaminas contra a doença vascular. (Kelly 2004)

O estudo do NHANES mostrou relação inversa entre ingestão dietética de folato e risco de AVE, independente do sexo. (Bazzano *et al* 2002) Além disso, Beccia *et al* (2004) relataram que o status nutricional subótimo de folato, mesmo que assintomático, pode contribuir para o início da lesão vascular, levando a eventos isquêmicos.

Os mecanismos não foram completamente elucidados, porém tem sido proposto que o folato age como um antioxidante, atuando diretamente no seqüestro de radicais peróxidos, exercendo efeito protetor contra modificações oxidativas do LDL humano (Nakano *et al* 2001). Henning *et al* (1997) acrescentaram que a deficiência de folato poderia reduzir as reservas antioxidantes de vitaminas A, C e E, em múltiplos níveis, comprometendo ainda mais os mecanismos pré-oxidantes.

Ademais, o folato aumenta a disponibilidade de tetrahydrobiopterina, um cofator para o óxido nítrico sintase (Kaufman 1991; Loscalzo 2001) além de reduzir a geração de peróxidos, favorecendo a manutenção dos níveis de óxido nítrico (NO) endotelial. (Stroes *et al* 2000) O NO é um vasodilatador produzido pelo endotélio vascular, responsável pelo controle da pressão sanguínea e do fluxo cerebral (Iadecola 1993). Logo, baixos níveis séricos de folato podem comprometer os níveis pressóricos, seja por estresse oxidativo, seja por comprometimento da síntese de NO.

A relação entre piridoxina e lesão vascular vem sendo estudada desde 1949, quando Rinchart e Greenberg observaram que a deficiência de piridoxal fosfato (B6) estava associada à aterosclerose precoce em macacos. Uma vez que a aterosclerose é um processo inflamatório, estudos investigaram a

possível associação entre os níveis plasmáticos de B6 e marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa (PCR), encontrando relação inversa entre os níveis dessa vitamina e o processo inflamatório, confirmando o seu possível efeito protetor na aterogênese. (Friso *et al* 2001; Kelly *et al* 2004)

Atualmente as vitaminas piridoxina e ácido fólico vêm merecendo destaque uma vez que participam no metabolismo da homocisteína, um composto sulfurado presente em altas concentrações em pacientes vítimas de doenças cardiovasculares (Ford *et al* 2002; Bautista *et al* 2002) e cerebrovasculares (The homocysteine Studies Collaboration 2002), e que ultimamente tem sido apontado como agente causal de lesão vascular. (Hankey e Eikelboom 1999)

### **1.1. Metabolismo da homocisteína.**

A homocisteína é produzida pela demetilação do aminoácido essencial metionina. A manutenção dos níveis normais deste metabólito se dá por dois mecanismos (fig1): Primeiro, a homocisteína é remetilada para formar metionina, reação essa controlada pela enzima metionina sintase (MS), que tem como coenzima a vitamina B12; e pela metil tetrahidrofolato redutase (MTHFR), onde o doador do grupo metila é o 5'- metil- tetrahidrofolato, um derivado do ácido fólico.

O segundo mecanismo é pela via de transsulfuração da homocisteína em cistationa, sendo essa reação mediada pela enzima cistationa B sintase (CBS), que tem como cofator a piridoxina.

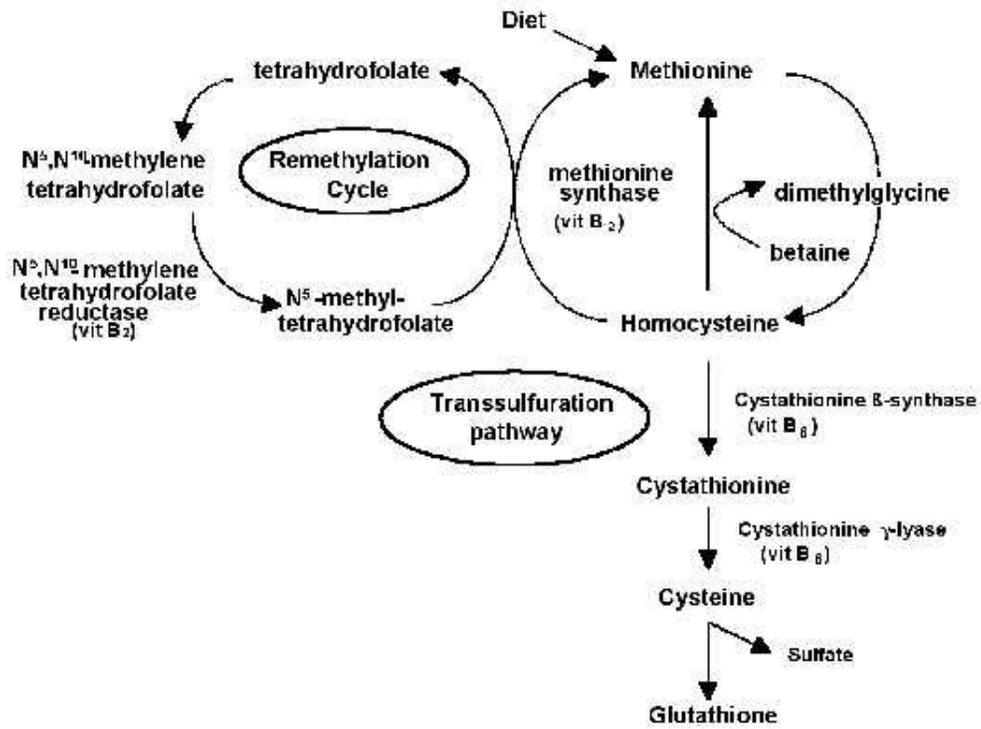
Conseqüentemente, alterações nos níveis de expressão gênica ou atividade funcional da metionina sintase, MTHFR e CBS (Kelly *et al* 2002), bem como deficiência das vitaminas que participam como cofatores: B6, B12 e folato, podem promover a hiperhomocisteinemia e homocisteinúria. (Scriver, 1989).

Confirmando esta proposição, Cardo *et al* (2000) e Tsai (1999) observaram que a hiperhomocisteinemia em crianças é causada pela mutação do gene C677T MTHFR, ao passo que Hultberg *et al* (1997) e Selhub (1993) atribuíram o distúrbio desse metabólito à deficiências vitamínicas de B6, B12 e folato, quando ocorre em pacientes idosos. Além disso, Moriyama (2002) e Naurath (1995) observaram que deficiências dietéticas dessas vitaminas, mesmo que subclínicas, podem levar à descompensação dos níveis plasmáticos de homocisteína.

Em humanos, a média normal de homocisteína é de 5 a 15micromoles/L. Níveis de homocisteína de 16 a 30, 31 a 100 e superior a 100micromoles/L são classificados como leve, moderada e severa hiperhomocisteinemia. (Ueland e Refsum 1989).

A hiperhomocisteinemia também pode ser induzida pela suplementação com metionina, uma manobra conhecida como “methionine load test”, muito utilizada em ensaios experimentais.

## METABOLISM OF HOMOCYST(E)INE



*Fig 1. Metabolismo da homocisteína.*

## 1.2. Homocisteína, lesão vascular e AVE: Possíveis mecanismos de ação.

A hipótese de que os níveis aumentados de homocisteína alterariam as propriedades do vaso surgiu em 1969, quando McCully relatou evidências de associação entre aterosclerose prematura e concentrações elevadas de homocisteína plasmática. Esses achados foram confirmados posteriormente, em estudos epidemiológicos, reforçando o conceito de que moderada hiperhomocisteinemia pode ser considerada fator de risco independente para o desenvolvimento da aterosclerose nas vasculaturas coronariana, periférica e cerebral. (Clarke *et al*, 1991; Stampfer 1992; Boers *et al* 1985) Além disso, Chambers *et al* (1999) relataram ainda que mesmo o incremento fisiológico de 2-3 $\mu$ mol/L de homocisteína plasmática, induzida pela administração de metionina dietética, pode levar à disfunção endotelial em indivíduos saudáveis, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose.

Partindo do pressuposto de que a aterogênese é um processo inflamatório e monócitos circulantes migram e invadem o espaço subendotelial durante a fase inicial da aterosclerose (Gerrity 1981), Su *et al* (2002) verificaram que a homocisteína, mesmo em concentrações fisiológicas, aumentou a proliferação de monócitos e que doses fisiopatológicas induziram a secreção de citocinas inflamatórias, levando a crer que tal metabólito, independente da concentração, poderia estar relacionado com a exacerbação da resposta inflamatória.

Alguns autores têm sugerido que a resposta inflamatória que segue o AVE está envolvida na patogênese da isquemia cerebral. (Barone e Feuerstein 1999). As citocinas sintetizadas localmente durante o desenvolvimento das

lesões cerebrais podem exacerbar a lesão isquêmica cerebral ativando a síntese de reagentes de fase aguda. (Vila *et al* 1999) Pouco se sabe sobre os valores prognósticos dos marcadores inflamatórios nessa condição patológica, entretanto os níveis de proteína C reativa têm sido considerados preditores de doença cardiovascular (Ridker *et al* 2000) e de doença cerebral isquêmica. (Muir *et al* 1999), apesar de ainda existirem controvérsias.

O principal mecanismo sugerido para o efeito adverso da homocisteína na função endotelial envolve o estresse oxidativo. A homocisteína, como todo amino ácido sulfurado, sofre auto-oxidação gerando espécies reativas de oxigênio. (Heinecke 1987) Estudos experimentais mostraram que mesmo a elevação moderada dos níveis de homocisteína pode aumentar a produção de peróxidos de hidrogênio, promovendo a peroxidação do LDL. (Olszewski e McCully 1993; Stamler e Slivka 1996; Voutilainen 1999) A peroxidação lipídica altera a permeabilidade das membranas celulares, causando consequentemente, danos estruturais às células endoteliais.

Além disso, tem sido proposto que a homocisteína pode alterar a produção e/ ou bioatividade de mediadores vasoreguladores, incluindo o óxido nítrico (Upchurch 1997), uma vez que espécies reativas de oxigênio como os anions superóxido podem interagir com esse composto formando peróxido nítrico, depletando sua atividade biológica (Gryglewski 1986; Loscalzo 1996) comprometendo assim a regulação vasomotora dependente do endotélio (Hankey e Eikelboom, 2001), e regulação do fluxo de sangue (Quéré *et al* 1997). Esses efeitos são apontados na patogênese dos eventos isquêmicos. (Zhang *et al* 1998)

Outros mecanismos de ação propostos para justificar a influência da homocisteína nas respostas vasculares incluem: alterações nas propriedades de coagulação do sangue e na função plaquetária, contribuindo para o desenvolvimento da doença tromboembólica (den Heijer 1996) e espessamento das camadas íntima e média dos vasos. (Tsai *et al* 1994)

Uma vez que alterações nas propriedades do vaso e na qualidade do sangue levam à hipertensão, investigou-se a possível relação entre os níveis plasmáticos de homocisteína na ocorrência de Hipertensão arterial.

Kahleová (2002), em um estudo caso-controle, mostrou que pacientes com hipertensão exibem maiores níveis plasmáticos de homocisteína e menores níveis de folato, podendo ter papel nos estágios iniciais da hipertensão essencial. Sutton-Tyrrel *et al* (1997) acrescentam que os valores de homocisteína estão diretamente relacionados com a pressão sistólica. Além disso, os níveis de homocisteína aumentados são encontrados em hipertensos com e sem doença arterial coronária. (Seshadri 2003)

Lim e Cassano (2002) também encontraram forte associação entre elevados níveis plasmáticos de homocisteína e aumento do risco de hipertensão, onde a frequência de hipertensão era significativamente maior em níveis de homocisteína acima de 15micromol/L. Esses achados foram confirmados em estudo transversal feito por Mizrahi *et al* (2003).

Estudos experimentais em linhagem hipertensa (SHR) também mostraram que a hiperhomocisteinemia potencializa o desenvolvimento da pressão sanguínea sistólica e causa efeitos adversos nas respostas vasculares em ratos machos. (Yen e Lau 2002)

Entretanto ainda existem controvérsias em relação a correlação entre níveis séricos de homocisteína e pressão arterial, uma vez que outros estudos apontaram fraca (Nygard, 1995) ou nenhuma correlação (Lussier-Cancan 1996, Dinavahi 2003) Um estudo de coorte que acompanhou indivíduos inicialmente normotensos durante 4 anos, revelou que os níveis de homocisteína plasmática estariam positivamente associados com a incidência de hipertensão e progressão da pressão sanguínea. Entretanto, após ajustes dos dados em relação à idade e sexo, a associação não foi estatisticamente significativa, mostrando que diante dessas observações, é provável que o aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína previamente descrito em indivíduos hipertensos é mais concomitante do que precursor da hipertensão, não sendo a causa da elevação da pressão sanguínea. Sundstrom (2003)

Além disso, um estudo realizado em pacientes vítimas de AVE, um ano após a ocorrência do evento isquêmico, mostrou que apesar de não haver diferença significativa entre os níveis basais de homocisteína dos casos e controles, a elevação das concentrações plasmática após administração de metionina foi significativamente maior nos casos, mostrando um possível comprometimento nas vias metabólicas. Ademais, foi observada diferença significativa para os níveis de folato, fortalecendo a relação entre os níveis séricos ótimos dessa vitamina e proteção contra os possíveis efeitos da homocisteína. (Beccia 2004)

Tais achados sugerem que a suplementação de vitaminas envolvidas no metabolismo da homocisteína poderiam ter efeito protetor contra o dano

oxidativo, seja reduzindo os níveis de homocisteína, seja atuando diretamente como antioxidantes.

Os resultados epidemiológicos em relação à suplementação vitamínica ainda são muito controversos. O grande estudo VISP (The vitamin intervention for stroke prevention), que comparou pacientes vítimas de AVE submetidos a diferentes doses de vitaminas B6, B9 e B12, mostrou que a redução da homocisteína total não protegeu de um novo evento cerebrovascular, sugerindo que a elevação dos níveis de homocisteína seriam um marcador e não a causa do acidente vascular. Entretanto não se descartou a hipótese de que as vitaminas poderiam ter um efeito protetor. (Toole *et al* 2004)

Além disso, o outro grande estudo VITATOPS, mostrou que 6 meses de tratamento com essas vitaminas, em pacientes vítimas de AVE, não alterou as concentrações sanguíneas de marcadores inflamatórios ou de hipercoagulabilidade, mesmo reduzindo significativamente os níveis de homocisteína plasmática, mostrando que possivelmente tais marcadores bioquímicos não são sensíveis à redução de homocisteína ou tal substância não é um marcador causal do aumento de risco do dano vascular. (Dusitanond *et al* 2005)

Por outro lado, a suplementação dessas vitaminas pode reduzir a pressão arterial, principal fator de risco do AVE. Vasdev *et al* (1999) observou que a suplementação com piridoxina em doses equivalentes a 20 vezes as necessidades nutricionais teve efeito hipotensor em ratos espontaneamente hipertensos. Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que a suplementação combinada de ácido fólico e piridoxina a ratos geneticamente

hipertensos (SHR) e normotensos (WKY), reduziram a pressão arterial desses animais, (Vianna, 2003) sugerindo-se a hipótese de que essas vitaminas poderiam ter um efeito protetor em modelos experimentais geneticamente suscetíveis ao AVE.

Entretanto até o presente momento não foram encontrados estudos experimentais que comprovassem o efeito benéfico das vitaminas B6 e B9 no modelo stroke prone, além do fato de que relação dessas vitaminas com o AVE ainda apresentar-se bastante controversa. (KELLY, 2003)

Com o objetivo de melhor estudar o efeito fisiológico da administração combinada das vitaminas piridoxina e ácido fólico sobre a pressão arterial e AVE, escolhemos a linhagem SHR-SP.

### **1.3 O Modelo SHR-SP.**

O modelo SHR-SP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat) originou-se do SHR por reprodução seletiva e tem sido usado em ensaios experimentais de doença cerebrovascular por ser um modelo adequado para análise do papel da pressão arterial severa no desenvolvimento do AVE. (Okamoto 1974, Yamori 1991).

A hipertensão nessa linhagem ocorre em torno na oitava semana de idade, e vai se acentuando à medida que os animais se tornam adultos, chegando os machos a atingir aproximadamente 250mmHg de pressão sistólica (Noguchi *et al.* 2003), sendo mais hipertensa do que o SHR.

Além disso, estudos têm mostrado que a suscetibilidade ao AVE nesse modelo também está associada a fatores genéticos independentes da pressão sistólica, motivo pelo qual usa-se essa linhagem preferencialmente ao SHR na investigação da doença cerebral. (Ikeda e Yamori, 1999, Nakiba 2003)

O SHR-SP apresenta grande incidência de AVE, tanto hemorrágico quanto isquêmico (Yamori 1984,1991), chegando a atingir nos machos 100% da causa de óbito (Okamoto *et al*, 1974). Tais eventos neurológicos são observados nesses animais a partir da 43-52 semanas de idade. Consequentemente a sobrevida nessa linhagem é considerada reduzida, o que faz com que o SHR-SP seja o modelo adequado para avaliar intervenções profiláticas.

O AVE no SHR-SP ocorre de forma espontânea, resultante de lesões cerebrais similares às observadas em humanos (Okamoto *et al* 1974; Yamori *et al* 1976), tornando-o o melhor modelo experimental para estudar alterações cerebrais vasculares e teciduais, tanto estruturalmente quanto funcionalmente. (Fredriksson *et al* 1985 e 1987; Volpe *et al* 1996) Da mesma maneira, a relação entre achados histopatológicos e comportamentais ou anormalidades metabólicas, como por exemplo: agressividade, hipocinesia, hipercinesia, dano da barreira hematoencefálica, proteinúria, perda de peso súbita; também tem sido extensivamente investigado. (Gratton *et al* 1998; Blezer *et al* 1998; Sironi *et al* 2001).

Vários mecanismos têm sido propostos na fisiopatologia do AVE nessa linhagem. Ogata *et al* (1981) relataram que o AVE nesses animais não se dá devido a lesões ateromatosas, mas sim a necrose fibrinóide das pequenas

artérias e edema severo, similar às lesões observadas em humanos com hipertensão maligna, sugerindo que este modelo é útil para estudos de fatores genéticos que são a causa comum para hemorragia intracerebral e infarto lacunar.

Em nível microscópico, Arribas *et al* (1996) observaram que o arranjo morfológico das células do músculo liso vascular estava desorganizado na artéria basilar dos SHR-SP quando comparada com os Wistar. Essa alteração estrutural no sistema vascular cerebral de SHR-SP pode contribuir para a suscetibilidade ao AVE influenciando a circulação colateral, modificações na reologia do fluxo sanguíneo ou vulnerabilidade da parede arterial a alta pressão arterial.

Por outro lado, Yamagata *et al* (1997) demonstraram que leves alterações genéticas nos astrócitos causam ruptura na função da barreira hematoencefálica quando submetidos a hipóxia, resultando em lesão cerebral generalizada no SHR-SP, especulando-se portanto que a variabilidade genética entre as linhagens SHR-SP e WKY, em resposta ao dano do AVE isquêmico pode ser um dos fatores que contribuem para a suscetibilidade a doença cerebrovascular, independente da hipertensão. (Ikeda 1999).

O estresse oxidativo também tem sido observado nessa linhagem. O aumento das espécies reativas de oxigênio, geradas após a reperfusão sanguínea, (Negishi *et al* 2001) tem mostrado papel importante na perpetuação da hipertensão e morte neuronal em SHR-SP. Ademais a peroxidação lipídica no córtex cerebral é mais intensa em SHR-SP após o estabelecimento da hipertensão severa nesses animais. (Sui *et al* 2005)

Tagami *et al* (1998) relataram que as células cerebrais neuronais do SHR-SP apresentaram-se mais suscetíveis a hipoxia/reoxigenação sob condições de cultura. Além disso a isquemia acompanhada de reperfusão sanguínea induz a apoptose nos neurônios localizados no hipocampo. (Tagami *et al* 1999)

Embora o SHR-SP seja geneticamente hipertenso e suscetível ao AVE, uma série de fatores nutricionais, especialmente nutrientes antioxidantes, tem mostrado efeitos preventivos na hipertensão, no distúrbio do fluxo sanguíneo cerebral, formação de trombos e morte de células neurais, indicando que tais nutrientes podem ser benéficos na prevenção da hipertensão e AVE. (Noguchi 2003)

Assim esse trabalho teve como objetivo principal investigar o efeito da administração combinada das vitaminas piridoxina e ácido fólico sobre a pressão arterial de ratos SHR-SP, bem como os possíveis efeitos dessa suplementação sobre os parâmetros biológicos gerais e neurológicos, marcadores de estresse oxidativo e de processo inflamatório.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve o objetivo de:

- ✓ Investigar o efeito da administração crônica de B6 (piridoxal- fosfato) e B9 (ácido fólico) associadas sobre parâmetros biológicos gerais e específicos do rato SHR-SP.
- ✓ Investigar o efeito dessa suplementação sobre a Pressão Arterial.
- ✓ Investigar o efeito dessa suplementação sobre a longevidade desses animais.
- ✓ Investigar o efeito dessa suplementação sobre os níveis plasmáticos de homocisteína.
- ✓ Investigar o efeito dessa suplementação sobre os marcadores de inflamação e estresse oxidativo.

### **3. METODOLOGIA**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com o guia convencional para experimentos com animais (NIH Publication No. 85-23, revisada em 1996). O protocolo experimental usado neste estudo deriva do Projeto: Estudo Experimental de Vitaminas no AVE, e foi aprovado pelo Departamento de Pesquisa (Propg-DPq) da UNIRIO e pelo CNPq.

#### **3.1 Animais e Dieta.**

Foram estudados 24 ratos machos adultos geneticamente hipertensos e suscetíveis ao AVE (SHR-SP), oriundos da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) e ambientados no biotério da Escola de Nutrição (UNIRIO) sendo estes divididos em dois experimentos:

1º experimento: Determinação da curva dose-efeito.

2º experimento: Determinação dos parâmetros bioquímicos.

Os ratos foram mantidos no biotério em gaiolas metabólicas, com temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade ( $60\pm 10\%$ ) controladas, submetido a ciclo claro/escuro (luz artificial, 7-19h) e ciclo de exaustão de ar (15min/h), recebendo ração Nuvilab da Nuvital® e água *ad libitum*.

### **3.2 Parâmetros Biológicos Gerais.**

Durante todo o ensaio foram avaliados os parâmetros biológicos gerais e específicos dos animais, seguindo o protocolo adotado pelo Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico- Degenerativas. (Vianna LM, 2005) Os ratos foram pesados duas vezes por semana durante o ensaio. A ingestão hídrica e consumo de ração foram medidos diariamente, bem como a diurese.

Rotineiramente foram avaliadas possíveis alterações na coloração e distribuição dos pelos: zonas de alopecia, eriçamento dos pelos, esfoliação, edema; e alteração de mucosas: sangramento, secreção, opacificação da córnea, tumefação das articulações, hiperemia gengival, fissura labial, palatina.

### **3.3 Parâmetros Biológicos Específicos.**

#### **3.3.1 Parâmetros Neurológicos.**

Diariamente os parâmetros neurológicos gerais foram avaliados:

- Comportamento alterado: pânico, ansiedade, nervosismo, agressividade, tremores.

- Locomoção: a mobilidade espontânea foi avaliada observando o animal andar livremente sobre a bancada durante 60 segundos. Sob essas condições, foram dados escores que variaram de zero (locomoção normal) a 1 (mobilidade alterada). Sinais de ataxia frequentemente são observados nesse teste.

- Equilíbrio: o equilíbrio foi testado avaliando a deambulação do animal em estreita passarela inclinada à 45° e 75°. O animal é colocado numa passarela e observa-se a hesitação, ocorrência de queda, cambaleio.

- Teste de sensibilidade ao calor: O teste sensorio motor foi realizado medindo a sensibilidade do animal a dor em resposta a aplicação de calor (água a 70°C) na extremidade da cauda do animal onde o tempo de resposta ao estímulo é cronometrado, utilizando o cronômetro Sport Timer da marca Miky. (adaptação do método SDI Tail Flick Analgesia Meter, da San Diego Instruments - USA ).

- Cognição: Teste de labirinto. Caixa com dimensões 70X70cm, dividida em 6 compartimentos, apresentando percurso simples, com uma única zona de erro (1 compartimento sem saída). Os animais foram treinados previamente no labirinto, antes de iniciar o experimento, a partir de 6 semanas de idade. Quando os animais já estavam familiarizados com o percurso, foi cronometrado o tempo gasto do ponto de partida até a saída do labirinto. (Vianna 2005)

### **3.3.2 Estudo da Pressão Arterial Sistólica – Pletismografia.**

A medição da pressão arterial sistólica dos animais foi feita duas vezes por semana, pela manhã, utilizando o aparelho pletismógrafo (bio-oficina) como descrito por William e cols (1939), modificado por Vianna (1992)

O rato é previamente aquecido numa caixa com temperatura controlada em torno de 35° C durante 10 minutos com a finalidade de se obter uma vasodilatação dos vasos da cauda, o que facilita a medida da pressão arterial.

O tempo e temperatura de aquecimento devem ser precisamente controlados para evitar alterações dos níveis tensionais. Em seguida, o animal é colocado numa pequena gaiola de contenção e sua cauda, passando por um orifício da gaiola, é introduzida no pletismógrafo de paredes duplas, cheio de água já aquecida a 35°C. Comprime-se então a cauda dentro do aparelho, com a finalidade de expulsar o máximo de sangue. Aguarda-se aproximadamente 5 segundos e insulfla-se o manguito até 260mmHg. Afrouxa-se a pressão do pletismógrafo e gradua-se o nível líquido do tubo indicador ligado ao pletismógrafo, a 15 cm de altura. Reduz-se lentamente a pressão no manômetro de mercúrio. Quando é alcançado o nível sistólico, o sangue passa para o interior da cauda, aumentando seu volume, e o tubo indicador registra a subida da coluna de água, quando procedemos à leitura da pressão sistólica. A média de 3 medidas foi considerada como a pressão sistólica do animal.

### **3.4 Suplementação das Vitaminas Piridoxina e Ácido Fólico e Determinação da Curva Dose-Efeito.**

Após o período basal de 10 dias, machos da linhagem SHR-SP, apresentando 18 semanas de idade e peso médio de 216 ±6,47g, foram subdivididos em dois grupos: controle (n=6) que recebeu somente o veículo (água) e o grupo tratado (n=6) que foi submetido à suplementação associada de vitaminas B6 (cloridrato de piridoxina - Sigma<sup>®</sup>) e B9 (ácido fólico - Vertec<sup>®</sup>), em três diferentes doses: 0,6mg, 1,2mg e 2,4mg de B6 e 0,1mg, 0,2mg e 0,4mg de B9. As doses foram estabelecidas de acordo com as necessidades

nutricionais, determinadas pelo Comitê de Nutrição para animais de laboratório do National Academy of Sciences (Newberne et al. 1978), e correspondem a 5, 10 e 20 vezes as necessidades nutricionais. A duração de cada dose foi de 4 semanas, havendo entre as doses um intervalo de 5 dias (*washout*). Os animais receberam o veículo ou a solução vitamínica por gavagem orogástrica através de sonda de polietileno (PE 190). A pressão arterial sistólica foi aferida por pletismografia, já descrito anteriormente.

Após o término da primeira etapa, foi suspensa a suplementação e avaliada a longevidade dos animais.

### **3.5 Suplementação com as Vitaminas Piridoxina e Ácido Fólico em Dose Correspondente a 10 Vezes as Necessidades Nutricionais e Determinação dos Parâmetros Bioquímicos.**

Após a determinação da curva dose efeito, a dose correspondente a 10 vezes as necessidades nutricionais foi considerada a de melhor resposta fisiológica, sendo esta elegida para ser administrada em um novo grupo para a dosagem dos parâmetros bioquímicos: MDA, PCR e Homocisteína.

Após o período basal de 10 dias, ratos SHR-SP com 23 semanas de idade (mesma idade em que foi iniciada a segunda dose no experimento anterior) foram sub-divididos em dois grupos: tratado (n=6) e controle (n=6). O grupo tratado foi submetido à suplementação diária de vitaminas B6 (cloridrato de piridoxina) e B9 (ácido fólico) em doses correspondentes a 10 vezes as necessidades nutricionais, num período de 4 semanas, utilizando o mesmo

processo descrito anteriormente. A pressão arterial sistólica também foi aferida durante esse experimento, por pletismografia. Nesse grupo só foi realizado os testes de locomoção e equilíbrio.

Ao término do experimento, os animais foram mantidos em jejum de 24 horas, para coleta de amostra de sangue. Os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico (40mg/1000g peso), via intraperitoneal: os ratos foram mantidos com o ventre para cima e com a cabeça ligeiramente inclinada para baixo, aplicando a injeção no quadrante inferior esquerdo do abdômen, em um ângulo de 20-45° com a parede abdominal.

Após a redução da resposta reflexa, iniciou-se o procedimento de punção cardíaca: Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito. Após localização do coração (posicionando o dedo indicador sobre o tórax, entre a quarta e a sexta costela), foi introduzida a agulha, perpendicularmente à parede torácica, aplicando sucção leve até conseguir aspirar o sangue. Durante o procedimento, os animais foram mantidos sob efeito do Éter.

Foi colhido em média 6ml de sangue, com utilização de seringa não heparinizada e agulha calibre 23G. O volume de sangue coletado foi dividido em dois tubos descartáveis: um contendo anticoagulante EDTA, para dosagem de Homocisteína (Hcy) e em tubo seco com soro gel, para dosagem do MDA e PCR.

### **3.5.1 Dosagem de homocisteína.**

O material utilizado para a dosagem da homocisteína foi o plasma congelado, obtido a partir da centrifugação do sangue contido no tubo descartável com anticoagulante EDTA. O sangue foi centrifugado em centrífuga CELM modelo Kombat (aferição e calibração Control-Lab), a 3500rpm por 15 minutos. O plasma, separado das células pela centrifugação, foi retirado do tubo primário por pipetagem com ponteiros descartáveis e acondicionado em tubo secundário, identificado e estéril. O plasma foi conservado congelado em freezer com temperatura controlada abaixo de -20°C.

O método utilizado para dosagem foi HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), utilizando o equipamento Shimadzu com coluna Novapac C18, leitura por fluorescência nos comprimentos de onda 385 e 515nm.

### **3.5.2 Dosagem de Dialdeído Malônico (MDA).**

O material utilizado para a dosagem de dialdeído malônico foi o soro, obtido a partir da centrifugação do sangue colhido em tubo descartável sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado em centrífuga CELM modelo Kombat (aferição e calibração Control-Lab), a 3500rpm por 15 minutos. O soro, separado dos componentes celulares pela centrifugação, foi retirado do tubo primário por pipetagem com ponteiros descartáveis e acondicionado em tubo secundário, identificado e estéril. O soro foi conservado em refrigerador com temperatura controlada de 8°C.

Foi utilizado o método colorimétrico para dosagem de MDA, utilizando o equipamento Micronal B442 e o ácido Tiobarbitúrico como reagente.

### 3.5.3 Dosagem de Proteína C Reativa. (PCR)

O material utilizado para a dosagem de proteína C reativa de alta sensibilidade foi o soro, obtido pelo mesmo método descrito acima para dialdeído malônico. O método adotado para determinação da PCR foi Nefelometria, utilizando o equipamento Dade Behring BN-2.

### 3.6 Análise dos Resultados.

As diferenças nos parâmetros biométricos foram testados com test t student, atribuindo-se significância estatística para valores de  $p < 0.05$ . (Zar 1999).

Para determinação de possível correlação entre as variáveis estudadas: PA, Hcy e MDA, foi utilizado o método de Pearson, atribuindo-se os seguintes critérios de interpretação dos resultados:

Valor de $\rho$ (+ ou -)	Interpretação
0.00 a 0.19	Uma correlação bem fraca
0.20 a 0.39	Uma correlação fraca
0.40 a 0.69	Uma correlação moderada
0.70 a 0.89	Uma correlação forte
0.90 a 1.00	Uma correlação muito forte

Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism® versão 4.0 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 4 RESULTADOS.

### 4.1 Pressão Arterial.

Os ratos espontaneamente hipertensos suscetíveis ao AVE (SHR-SP) apresentaram-se resistentes à primeira dose (600mg de piridoxina e 100mg de ácido fólico), uma vez que não demonstraram alteração significativa da pressão sistólica durante as 4 semanas de tratamento, quando comparados com o grupo controle. (fig.2)

Os animais só apresentaram resposta a partir da segunda semana de tratamento com a segunda dose (1,2mg de B6 e 0,2mg de B9), sendo observado significativo ( $p < 0,05$ ) decréscimo da pressão sistólica, que diminuiu de um valor inicial de  $226 \pm 4,8$ mmHg para  $210 \pm 5,0$ mmHg ( $p < 0,05$ ). Ao fim de quatro semanas de tratamento, a pressão atingiu  $204 \pm 5,7$ mmHg contra  $230 \pm 4,8$ mmHg nos SHR-SP não tratados ( $p < 0,05$ ). (fig.3)

Resultados similares foram obtidos com a terceira dose, onde o grupo tratado apresentou no fim do tratamento, pressão sistólica de  $208,4 \pm 7$ mmHg contra  $235 \pm 8$ mmHg do grupo controle. (fig4) Uma vez que a diferença entre o efeito hipotensor da segunda e terceira dose não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,37$ ), por questões operacionais optou-se pela dose equivalente a 10 vezes as necessidades nutricionais para uso nos protocolos subsequentes.

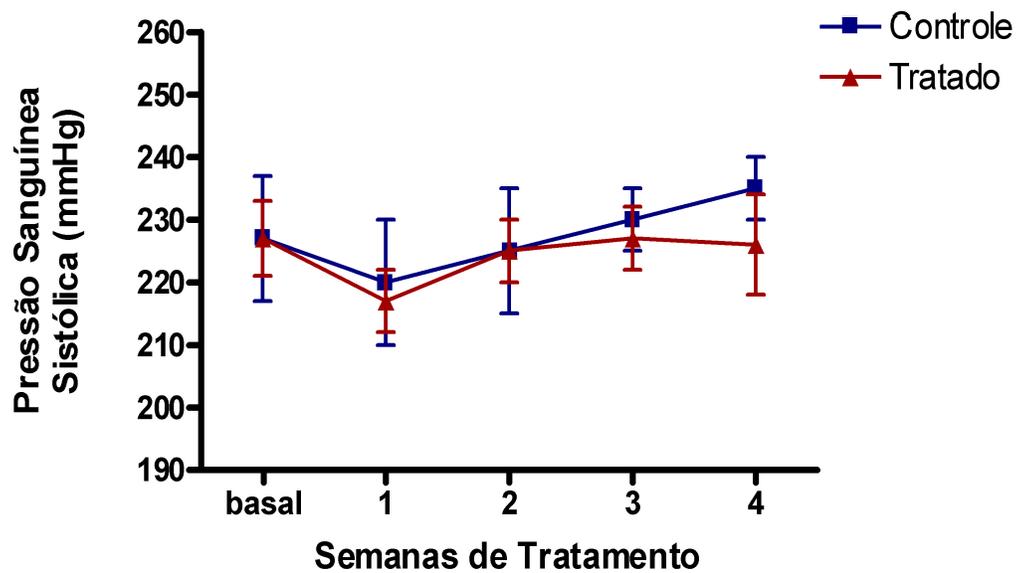


Fig 2: Valores médios  $\pm$  SD da pressão sistólica de SHR-SP (n=12) submetidos a 0,6mg de piridoxina + 0,1mg de ácido fólico. Valor de significância:  $P < 0,05$

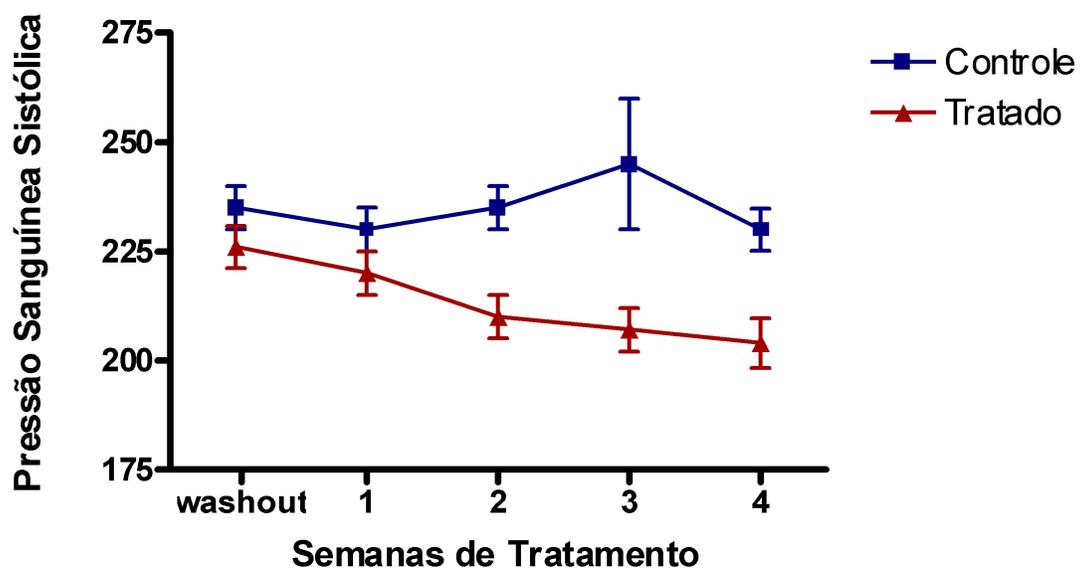


Fig 3: Valores médios  $\pm$  SD da pressão sistólica de SHR-SP (n=12) submetidos a 1,2mg de piridoxina + 0,2mg de ácido fólico. Valor de significância:  $P < 0,05$

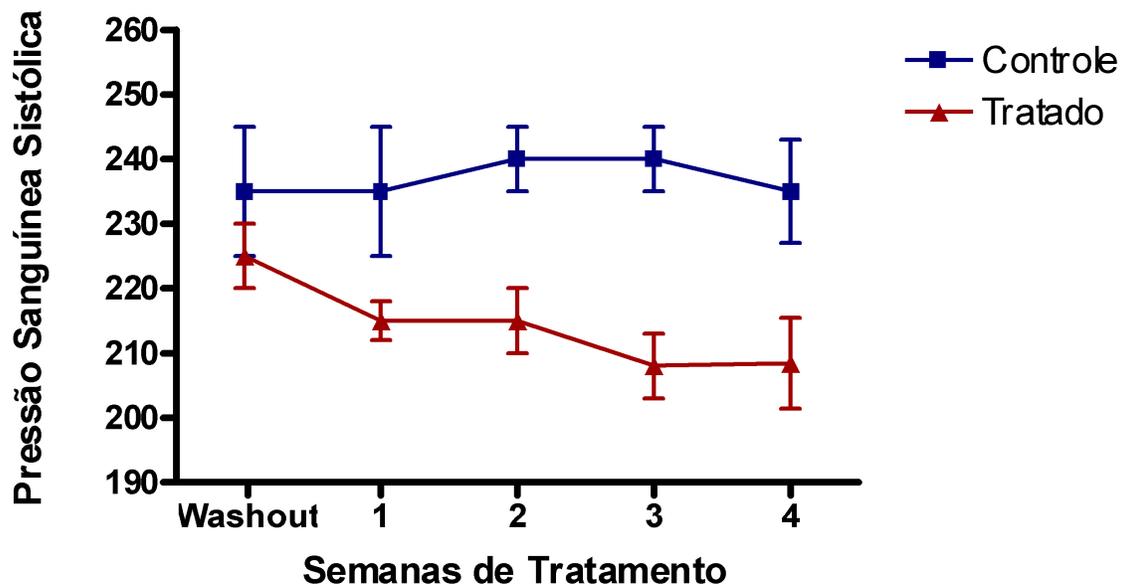


Fig 4: Valores médios  $\pm$  SD da pressão sistólica de SHR-SP (n=12) submetidos a 2,4mg de piridoxina + 0,4mg de ácido fólico. Valor de significância:  $P < 0,05$

## **4.2 Parâmetros gerais e neurológicos.**

Não foram observadas alterações no padrão alimentar (ingestão hídrica e de ração) e no peso corpóreo no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle (dados não apresentados). Da mesma forma, a excreção urinária e fecal foi normal em ambos os grupos. Os animais tratados não apresentaram sinais de toxicidade como dermatites e convulsões, mesmo durante a dose máxima equivalente a 20 vezes as necessidades de piridoxina e ácido fólico.

Não houve diferença na resposta aos estímulos sensório-motores entre os grupos. A utilização do labirinto (fig.5) para identificar possíveis sinais de alteração na capacidade cognitiva também não acrescentou resultados importantes no que se refere à suplementação vitamínica e redução de pressão arterial. Entretanto, foi efetivo na detecção de perda cognitiva relacionada com a idade avançada do animal, onde foi observado que à medida que o animal envelhecia, aumentava o tempo de finalização do percurso.

Por outro lado, a observação do comportamento associada aos testes de locomoção e equilíbrio foram eficazes na detecção de alterações neurológicas, apresentando dados interessantes: no grupo tratado um animal apresentou alterações neurológicas (ataxia) que ocorreu com 23 semanas de idade. A ataxia durou menos de 24 horas, caracterizando um possível ataque isquêmico transitório, comum nessa linhagem. Nesse grupo não houve caso de óbito durante as 14 semanas do experimento. Já no grupo controle foi observado alterações neurológicas em 3 animais, sendo 2 casos fatais.



**Fig.5. Teste cognitivo: Labirinto.**

Após o término da suplementação, os animais foram observados até seu óbito. Curiosamente, mesmo com a suspensão das vitaminas, os animais que receberam tratamento tiveram uma sobrevida maior do que o grupo não tratado, apesar de, após três semanas sem suplementação, atingirem a pressão sistólica do grupo controle. A média de sobrevida do grupo tratado foi de  $63 \pm 10$  semanas contra  $42 \pm 16$  semanas do grupo controle.

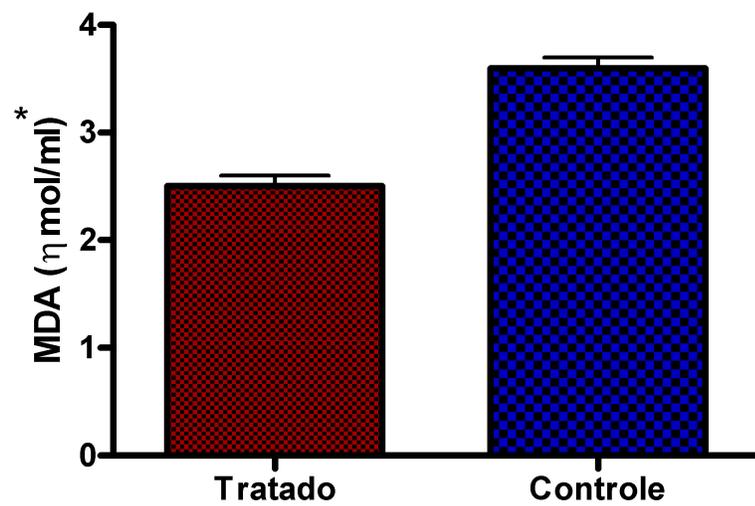
#### **4.3 Parâmetros bioquímicos.**

As concentrações plasmáticas de MDA apresentaram-se reduzidas no grupo tratado, obtendo-se uma média de  $2,5 \eta\text{mol/ml}$  contra  $3,6 \eta\text{mol/ml}$  para o grupo controle, sendo estatisticamente diferente ( $p < 0.05$ ) (fig.6)

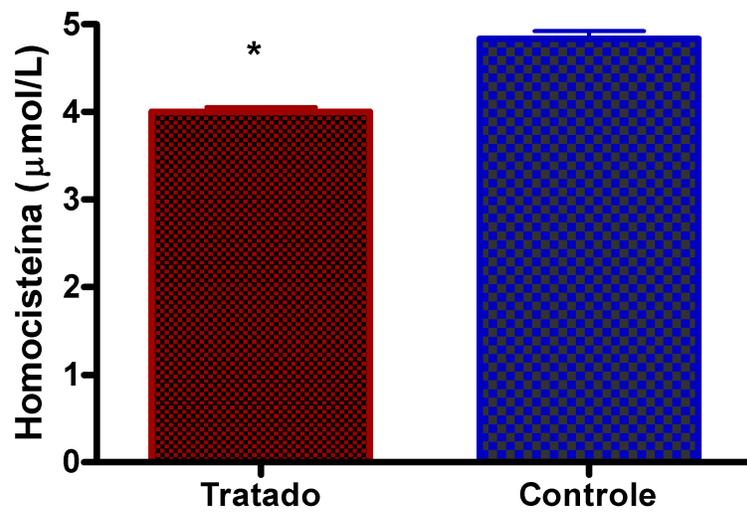
Houve uma pequena, porém significativa ( $p < 0.05$ ) redução da homocisteína plasmática no grupo tratado, comparado com o controle. (fig7) As concentrações de PCR não apresentaram diferenças entre os grupos, atingindo os valores mínimos detectáveis pelo método aplicado.

Nessa etapa, como era esperado, houve redução significativa ( $p < 0.05$ ) da pressão sistólica durante o tratamento. Durante esse experimento, não foram observados alterações neurológicas em ambos os grupos.

Foi observada uma forte correlação positiva entre homocisteína e pressão arterial, entre MDA e pressão arterial, e também entre a homocisteína e o MDA.



**Fig 6: Valores médios  $\pm$ SD de níveis de MDA de ratos SHR-SP (n=12) submetidos a 1,2mg de B6 + 0,2mg de B9. Valor de significância:  $P < 0,05$**



**Fig 7: Valores médios  $\pm$  SD de níveis séricos de Homocisteína de ratos SHR-SP (n=12) submetidos a 1,2mg de B6 associada a 0,2mg de B9.**

## 5. DISCUSSÃO.

O acidente vascular encefálico (AVE) é a principal causa de morte, incapacidade motora e cognitiva. Por não existir um tratamento comprovadamente eficaz no AVE agudo, a detecção e controle dos fatores de risco cerebrovascular tornam-se tarefas prioritárias para a redução da incidência e recidiva da doença.

Vários mecanismos são apontados por contribuir na gênese do dano cerebral após sua exposição à isquemia e reperfusão, merecendo destaque a produção exacerbada de radicais livres associada à incompetência dos fatores antioxidantes, (Kimuta 1989; Traystman *et al* 1991) e/ou inativação dos sistemas de desintoxicação, resultando em lesão endotelial, alteração da permeabilidade do vaso e comprometendo a microcirculação cerebral. (Chan 1996)

O dano estrutural e funcional no endotélio vascular, causado pelo estresse oxidativo, também está implicado na patogênese da hipertensão (Kerr *et al* 1999; Nakazono *et al* 1991), uma vez que foi observado que linhagens geneticamente hipertensas, como o SHR e o SHR-SP apresentaram produção de ânions superóxidos aumentados nos vasos aórticos (Zalba *et al* 2000; Wu *et al* 2001) e no centro vasomotor, (Kishi *et al* 2004) e que a inibição desses radicais livres reduziu a pressão sanguínea desses animais. (Schnackenberg *et al* 1998; Parkjb *et al* 2002; Kishi *et al* 2004).

Adicionalmente, Kimoto-Kinoshita *et al* (1999) observaram que entre os órgãos-alvos da doença vascular hipertensiva, o cérebro do SHR-SP é o mais

afetado pelo processo de envelhecimento e estresse oxidativo, por apresentar níveis aumentados de marcadores de peroxidação lipídica. Ito *et al* (1993) acrescentaram que os níveis de dialdeído malônico (MDA), produto final da peroxidação lipídica, encontraram-se aumentados no córtex cerebral de ratos SHR-SP a partir da vigésima semana de idade, comparados com a linhagem normotensa WKY.

A elevação dos níveis séricos de MDA parecem ter evidência direta na implicação da peroxidação lipídica na clínica do AVE (Demirkaya *et al* 2001) sendo reconhecido como potente marcador de estresse oxidativo em pacientes com isquemia cerebral (Polidori *et al* 2002)

Paralelamente, níveis alterados de homocisteína têm sido observados em pacientes vítimas de doença cerebrovascular (Perry *et al* 1995), sendo considerado fator de risco independente para o AVE. (Bostom *et al* 1999)

O mecanismo pelo qual a homocisteína aumenta o risco de doença vascular não é bem compreendido, porém seu efeito pró-oxidante tem sido o mais cogitado. Estudos *in vitro* têm mostrado que a homocisteína exerce efeito citotóxico nas células por sofrer auto-oxidação, gerando espécies reativas de oxigênio:  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , (Heinecke 1987; Wall *et al* 1980) afetando os sistemas de defesa antioxidante (Blundell *et al* 1996) e promovendo a peroxidação lipídica. (Jones *et al* 1994; Farace e Lentz 2004). Assim é crescente o interesse pelas vitaminas que participam do seu metabolismo: Piridoxina e Ácido fólico.

Estudos mostram que de fato a suplementação de B6 e B9 reduz os níveis plasmáticos de homocisteína. Entretanto, a real implicação dessas vitaminas na prevenção do acidente vascular encefálico em humanos ainda

gera grande polêmica, uma vez que os resultados demonstrados nos grandes estudos populacionais VITATOPS (Toole *et al* 2004) e VISP (Dusitanond *et al* 2005) não foram elucidativos, o que provavelmente se deva a procedimentos metodológicos. (Hankey e Eikelboom 2004)

Por outro lado ensaios experimentais em animais que são modelo experimental do estudo do AVE, suportam a relação causa-efeito entre níveis elevados de homocisteína, patologia vascular e AVE, onde ratos com hiperhomocisteinemia induzida por dieta rica em metionina exibiram aumento de lesão na neo-íntima da artéria carótida, sendo este efeito amenizado pela suplementação com folato. (Morita *et al* 2001)

Além disso, a suplementação de piridoxina e ácido fólico, de forma isolada ou combinada, em animais geneticamente hipertensos (SHR), mostrou-se eficaz na redução da pressão sanguínea, (Vianna *et al* 2003) potente fator de risco para as doenças cerebrovasculares, sugerindo-se que tais vitaminas poderiam ter efeito protetor em ratos espontaneamente hipertensos e geneticamente suscetíveis ao AVE.

No presente estudo, a linhagem SHR-SP não foi responsiva a terapia com doses correspondentes a 5 vezes suas necessidades nutricionais (0,6mg de B6 e 0,1mg de B9) como observado na linhagem SHR, (Vianna *et al* 2003) o que sugere ser o SHR-SP mais resistente à terapia. Adicionalmente, Okamoto *et al* (1974) também demonstraram diferentes suscetibilidades entre essas linhagens.

Por outro lado, o SHR-SP foi responsivo a doses correspondentes a 10 e 20 vezes as necessidades nutricionais, sendo observada significativa redução da pressão sistólica. (Perez e Vianna 2005)

A contribuição dos níveis da pressão arterial é de tal importância para a determinação da doença cerebrovascular que, de há muito, reconhece-se que a magnitude da incidência é diretamente proporcional aos níveis de pressão arterial, independente da presença da hipertensão. Portanto, a redução dos níveis pressóricos de hipertensos, mesmo sem atingir os valores desejáveis de normalidade, é capaz de influenciar favoravelmente o declínio da incidência da doença cerebrovascular e, por conseguinte, da letalidade e da mortalidade. (Kannel, 1992)

Essa proposição foi confirmada nesse estudo, onde se observa que a redução da pressão sistólica no grupo que recebeu tratamento, foi capaz de aumentar a sobrevivência desses animais, quando comparados ao grupo controle.

Acrescenta-se também que a suplementação preveniu o ataque isquêmico transitório em 83,3% dos ratos, uma vez que durante o tratamento não foram observados sinais de ataxia, perda de equilíbrio ou paralisia parcial. Ao mesmo tempo esse experimento mostrou que os testes neurológicos sensório-motores, aqui empregados, foram eficazes no diagnóstico durante o evento, não sendo, entretanto, preditivos de ataque isquêmico transitório imediatamente antes de sua ocorrência. (Perez e Vianna 2005)

Em humanos, infartos múltiplos cerebrais estão relacionados com a maior incidência de demência vascular. Achados histopatológicos no SHR-SP também revelam múltiplos infartos. Além disso, a hipertensão a longo prazo

nessa linhagem produz um comprometimento no sistema de neurotransmissão cerebral, levando conseqüentemente a perda da função de memória-aprendizado e alterações comportamentais. (Kimura *et al* 2000).

Por outro lado, o teste de cognição realizado no presente estudo, não foi capaz de detectar diferenças significativas entre o grupo tratado e controle, mesmo após redução da pressão arterial. Entretanto observou-se que a perda cognitiva estava diretamente relacionada com a idade, uma vez que os ratos, a medida que envelheciam, apresentavam dificuldades na finalização do percurso.

No que se refere ao efeito tóxico das vitaminas, nossos resultados mostraram que os ratos tratados não apresentaram sinais de toxicidade, mesmo sendo suplementados com doses equivalentes a 20 vezes as necessidades nutricionais, contrastando relatos prévios encontrados por Vianna *et al* (2001) em ratos SHR, onde a suplementação isolada de ácido fólico ou piridoxal fosfato provocou respectivamente dermatite, redução da ingestão de ração e de peso, alterações neurológicas caracterizadas por prostração e ausência de resposta a estímulos e ataxia evoluindo para convulsão e morte entre a terceira e quarta semana de tratamento. Por outro lado, nessa mesma linhagem, a suplementação associada de piridoxina e ácido fólico resultou em significativa redução da pressão sistólica, sem relato de sinais tóxicos (Vianna 2003). Portanto a associação de vitaminas parece ser mais benéfica evitando o uso isolado de doses maiores e os riscos de efeitos colaterais.

Os presentes achados confirmam a importância da suplementação vitamínica associada e revelam que a magnitude do efeito hipotensor não foi dose-dependente para os ratos SHR-SP quando comparadas as doses equivalentes a 10 e 20 vezes as necessidades nutricionais.

A suplementação com 1,2mg de piridoxina e 0,2mg de ácido fólico foi eficaz na redução da homocisteína, e foi observada forte correlação positiva entre os níveis séricos desse metabólito com a pressão sistólica, reforçando a hipótese de que esse metabólito possa estar relacionado com a hipertensão arterial. Comprovando essa proposição, Yen e Lau (2002) relataram que a hiperhomocisteinemia induzida por metionina aumentou a pressão arterial nos ratos tratados, além de acelerar os efeitos adversos nas respostas vasculares em ratos machos.

Além disso, o dialdeído malônico (MDA), também apresentou correlação direta com a homocisteína, corroborando prévios estudos. (Diez *et al* 2005)

Esses achados reforçam a hipótese de que os níveis plasmáticos de homocisteína podem ter efeito pro-oxidante, causando dano endotelial e que a suplementação com as vitaminas piridoxina e ácido fólico protege contra o estresse oxidativo, uma vez que reduziram os níveis séricos desse metabólito.

Da mesma forma, vale ressaltar que o ácido fólico parece ter efeito antioxidante independente da sua participação na redução de homocisteína, (Nakano *et al* 2001; Doshi *et al* 2001; Bunout *et al* 2000; Shea 2002).

No que se refere aos níveis séricos de proteína C reativa (PCR), estes são preditivos para doença cardiovascular (Ridker *et al* 2000), estando fortemente associados ao processo inflamatório aterosclerótico. Embora a inflamação

possa ser um mecanismo secundário da lesão que acompanha o AVE isquêmico, existem controvérsias quanto seu papel na doença cerebrovascular. (Lindsberg *et al* 1996; Canova *et al* 1999).

Os achados do presente estudo não demonstraram relação entre níveis de homocisteína e PCR, confirmando os resultados relatados por Kelly *et al* (2003 e 2004). Esses autores encontraram forte relação inversa dose-dependente entre a PCR e o piridoxal fosfato em pacientes com AVE e controles, não encontrando, por outro lado, associação entre PCR e Homocisteína, apesar da significativa correlação entre homocisteína e níveis de piridoxal fosfato, sugerindo que a homocisteína prediz o risco vascular independente de mecanismos relacionados com o processo inflamatório. (Kelly *et al* 2004)

Entretanto os valores encontrados foram os mínimos detectáveis pelo método utilizado, não se descartando, portanto, a hipótese de que o grupo suplementado poderia apresentar níveis de proteína C reativa inferiores ao grupo tratado, uma vez que níveis séricos de piridoxina estão inversamente correlacionados com marcadores inflamatórios como a PCR. (Friso 2001) Outra interessante justificativa pode estar associada ao fato dessa linhagem não desenvolver aterosclerose espontaneamente. (Ogata *et al* 1981)

Em relação ao efeito hipotensor aqui relatado, nossos achados sugerem que a suplementação combinada de piridoxina e ácido fólico foi efetiva no controle da pressão sistólica e redução do estresse oxidativo mediado pela homocisteína e dialdeído malônico, podendo ser indicada como terapia preventiva ou coadjuvante.

## **6. CONCLUSÃO.**

A suplementação associada de B6 e B9 tem efeito hipotensor no modelo SHR-SP.

O tratamento concorre para o aumento da longevidade.

O tratamento protege contra alterações neurológicas.

O tratamento reduziu a homocisteína.

A suplementação é capaz de reduzir a MDA.

Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação das vitaminas B6 e B9 está associado a inibição do processo de estresse oxidativo.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ✓ AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart and stroke statistical update. Dallas, Tex: American Heart Association; 1998.
- ✓ ANDRE C. Hipertensão arterial na fase aguda do infarto cerebral: inquérito sobre a prática corrente em um hospital universitário. *Arq Neuropsiquiatr* 1994; 52:339-342
- ✓ ARRIBAS SM, GORDON JF, DALY CJ, DOMINICZAK AF, McGRATH JC. Confocal microscopic characterization of a lesion in a cerebral vessel of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Stroke* 1996; 27: 1118-1123.
- ✓ ASCHERIO A, RIMM EB, HERNÁN MA, GIOVANNUCCI E, KAWACHI I, STAMPFER MJ, WILLETT, WC. Relation of consumption of vitamin E, Vitamin C and carotenoids to risk for stroke among men in the United States. *Ann Intern Med* 1999; 130: 963-970.
- ✓ ASPLUND K. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Intern Med* 2002; 251(5):372-392
- ✓ BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 819-834.
- ✓ BAUTISTA LE, ARENAS IA, PENUELA A, MARTINEZ LX. Total plasma homocysteine level and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Clin Epidemiol* 2002; 55:882-887.

- ✓ BAZZANO LA, HE J, OGDEN LG, LORIA C, VUPPUTURI S, MYERS L, WHELTON PK. Dietary intake of folate and risk of stroke in US men and women: NHANES I Epidemiologic follow-up study. *Stroke* 2002; 33:1183-1189.
- ✓ BECCIA M, MELE MC, FERRARI M, RANIERI M, BARINI A, RASURA M. Young stroke and basal plasma and post-methionine load homocysteine and cysteine levels 1 year after the acute event: do plasma folates make the difference? *Eur J Neurol* 2004; 11:269-275.
- ✓ BLEZER ELA, SCHURINK M, NICOLAY K, DOPBAR PR, JANSEN GH, KOOMANS HA, JOLES JA. Proteinuria precedes cerebral edema in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: a magnetic resonance imaging study. *Stroke* 1998;29:167-174
- ✓ BLUNDELL G, JONES BG, ROSE FA, TUDBALL N. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atheroscler* 1996; 122:163-172
- ✓ BOERS GH, SMALS AG, TRIJBELS FJ, FOWLER B, BAKKEREN JA. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 1985; 313:709-715
- ✓ BOSTOM AG, ROSENBERG IH, SILBERSHATZ H, JACQUES PF, SELHUB J, D'AGOSTINO RB *et al.* Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly person: The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1999; 131:352-355.

- ✓ BRITTON M, CARLSSON A, DEFAIRE U. Blood pressure course in patients with acute stroke and matched controls. *Stroke* 1986; 17:861-864.
- ✓ BROWN MJ, PALMER CR, CASTAIGNE A, de LEEUW PW, MANCIA G, ROSENTHAL T, *et al.* Morbidity and mortality in patients randomized to double-blind treatment with a long-acting calcium-channel blocker or diuretic in the International Nifedipine GITS study: Intervention as a goal in hypertension treatment (INSIGHT). *Lancet* 2000; 356:366-372.
- ✓ BUNOUT D, PETERMANN M, HIRSCH S, MAZA PL, SUAZO M, BARRERA G, KAUFFMAN R. Low serum folate but normal homocysteine levels in patients with atherosclerotic vascular disease and matched healthy controls. *Nutrition* 2000; 16: 434-438.
- ✓ CANOVA CR, COURTIN C, REINHARDT WH. C-reactive protein (CRP) in cerebro-vascular events. *Atheroscler* 1999; 147:49-53
- ✓ CARDO E, MOROS E, COLONE C, ARTUCH R, CAMPISTOL J, PINEDA M, VILASECA MA. Children with stroke: polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia and vitamins status. *J Child Neurol* 2000; 15(5):295-298
- ✓ CHAMBERS JC, OBEID OA, KOONER JS. Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2922-2927.
- ✓ CHAN PK. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27:1124-1129.

- ✓ CHERUBINI A, POLIDORI MC, BREGNOCCHI M, PREZZUTO S, CECCHETTI R, INGEGNI T, di IORIO A, SENIN U, MECOCCHI P. Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke* 2000; 31:2295-2300.
- ✓ CLARKE R, DALY L, ROBINSON K, NAUGHTEN E, CAHALANE S, FOWLER B, GRAHAM I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1149-1155
- ✓ DAHLOF B, LINDHOLM LH, HANSSON L, SCHERSTEN B, EKBOM T. Morbidity and mortality in the Swedish trial in old patients with hypertension. *Lancet* 1991; 338:1281-1285.
- ✓ DAS UM. Nutritional factors in the pathobiology of human essential hypertension. *Nutrition* 2001; 17:337-46.
- ✓ DEN HEIJER M, KOSTER T, BLOM HJ, BOS GMJ, BRIET E, REITSMA PH *et al.* Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med.* 1996; 334:759-762.
- ✓ DERMIRKAYA S, TOPCUOGLU MA, AYDIN A, ULAS VH, ISIMER AI, VURAL O. Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia. *Eur J Neurol* 2001;8:43-51.
- ✓ DÍEZ N, PÉREZ R, HURTADO V, SANTIDRIÁN S. Hyperhomocysteinaemia induced by dietary folate restriction causes kidney oxidative stress in rats. *Br J Nutr* 2005; 94(2):204-10,

- ✓ DINAHAHI R, COSSROW N, KUSHNER H, FALKNER B. Plasma homocysteine concentration and blood pressure in young adult african americans. *AJH* 2003; 16:767-770
- ✓ DOSHI SN, MCDOWELL IFW, 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.
- ✓ DUSITANOND P, EIKELBOOM JW, HANKEY GJ, THOM J, GILMORE G, YI Q, KLIJN CJM, LANGTON P, van BOCKXMEER FM, BAKER R, JAMROZIK K. Homocysteine-lowering treatment with folic acid, cobalamin and pyridoxine does not reduce blood markers of inflammation, endothelial dysfunction or hypercoagulability in patients with previous transient ischemic attack or stroke. *Stroke* 2005;36:144-46.
- ✓ FARACE FM; LENTZ SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cerebrovascular dysfunction. *Stroke* 2004; 35: 345-47
- ✓ FORD ES, SMITH SH, STROUP DF, STEINBERG KK, MUELLER PW, THACKER SB. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies. *Int J Epidemiol* 2002; 31:59-70.
- ✓ FREDRIKSSON K, AUER RN, KALIMO H, NORDBORG C, OLSSON Y, JOHANSSON BB. Cerebrovascular lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Acta Neuropathol* 1985; 68:284-294.

- ✓ FREDRIKSSON K, KALIMO H, WESTERGREN I, KARHSTROM J, JOHANSSON BB. Blood-brain barrier leakage and brain edema in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Acta Neuropathol* 1987; 74:259-268.
- ✓ FRISO S, JACQUES PF, WILSON PWF, ROSEMBERG IH, SELHUB J. Low circulating vitamin B6 is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation* 2001; 130: 2788-91.
- ✓ GERRETY RG. The role of the monocyte in atherogenesis: Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981; 103:181-90.
- ✓ GRATTON JA, SAUTER A, RUDIN M, LEES KR, McCOLL J, REED JL, DOMINICZAK AF, MACRAE IM. Susceptibility to cerebral infarction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats is inherited as a dominant trait. *Stroke* 1998; 29:690-694
- ✓ GRYGLEWSKI RJ, PALMER RM, MONCADA S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320: 454-456
- ✓ HANKEY GJ, EIKELBOOM JW. Folic acid-based multivitamin Therapy to prevent stroke: The jury is still out. *Stroke* 2004;35:1995-98.
- ✓ HANKEY GJ, EIKELBOOM JW. Homocysteine and stroke. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 95-102.
- ✓ HANKEY GJ, EIKELBOOM JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354:407-413

- ✓ HEINECKE JW, ROSEN H, SUZUKI LA, CHAIT A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 10098-103
- ✓ HENNING SM, SWENDSEID ME, IVANDIC BT, LIAO F. Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radic Biol Med* 1997; 23:936-42.
- ✓ HULTBERG B, ANDERSSON A, LINDGREN A. Marginal folate deficiency as a possible cause of hyperhomocystinaemia in stroke patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35(1):25-28
- ✓ IADECOLA C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: Is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 1993; 16: 206-14.
- ✓ IKEDA K, YAMORI Y. Gene related to stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 566-67
- ✓ ITO H, TORII M, SUZUKI T. A comparative study on lipid peroxidation in cerebral cortex of stroke prone spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Int J Biochem* 1993;25(12):1801-5.
- ✓ JONES BG, ROSE FA, TUDBALL N. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. *Atheroscler* 1994; 105:165-170
- ✓ KAHLEOVA R, PALYZOVA D, ZVARA K, ZVAROVA J, HRACH K, NOVAKOVA I, HYANEK J, BENDLOVA B, KOZICH V. Essential

hypertension in adolescents: association with insulin resistance and with metabolism of homocysteine and vitamins. *AJH* 2002; 15:857-864.

- ✓ KANNEL WB. Epidemiology of cardiovascular disease in the elderly: an assessment of risk factors. *Cardiovasc Clin* 1992; 22(2):9-22
- ✓ KAUFMAN S. Some metabolic relationships between bipterine and folate: implication for the "methyl trap hypothesis." *Neurochem Res* 1991; 16: 1031-36.
- ✓ KELLY PJ, KISTLER JP, BARRON M, LEE H, MANDELL R, FURIE KL. Low vitamin B6, but not homocysteine, is associated with increased risk of stroke and transient ischemic attack in the era of folic acid grain fortification. *Stroke* 2003; 34:51-54.
- ✓ KELLY PJ, KISTLER JP, SHIH VE, R MANDELL, ATASSI N, BARRON M, LEE H, SILVEIRA S, FURIE KL. Inflammation, homocysteine and vitamin B6 status after ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35:12-15.
- ✓ KELLY PJ, ROSAND J, KISTLER JP, SHIH VE, SILVEIRA S, PLOMARITOGLOU A, FURIE KL. Homocysteine, MTHFR C677-T polymorphism, and risk of ischemic stroke. Results of a meta-analysis. *Neurology* 2002; 288: 2015-22.
- ✓ KERR S, BROSNAN JM, MCINTYRE M, REID JL, DOMINICZAK AF, HAMILTON CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension. *Hypertension* 1999; 33:1353-1358
- ✓ KIMOTO-KINOSHITA S, NISHIDA S, TOMURA TT. Age-related change of antioxidant capacities in the cerebral cortex and hippocampus of

- stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 1999; 273:41-44.
- ✓ KIMURA S, SAITO H, MINAMI M, TOGASHI H, NAKAMURA N, NEMOTO M, PARVEZ H. Pathogenesis of vascular dementia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Toxicology* 2000; 153:167-178.
  - ✓ KISHI T, HIROOKA Y, KIMURA Y, ITO K, SHIMOKAWA H, TAKESHITA A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2004; 109:2357-2362.
  - ✓ LEINONEN JS, AHONEN JP, LONNROT K, JEHKONEN M, DASTIDAR P, MOLNÁR G, ALHO H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke* 2000;31:33
  - ✓ LESSA I. Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1999; 4: 509 – 18.
  - ✓ LIM U, CASSANO PA. Homocysteine and Blood Pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Epidemiol* 2002; 156(12):1105-1113
  - ✓ LINDSBERG PJ, CARPEN O, PAETAU A, KARJALAINEN- LINDSBERG ML, KASTE M. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 1996; 94:939-45.

- ✓ LOSCALZO J. Folate and nitrate-induced endothelial dysfunction: a simple treatment for a complex pathobiology. *Circulation* 2001; 104: 1086-88.
- ✓ LOSCALZO J. The antioxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 5-7.
- ✓ LUSSIER-CACAN S, XHIGNESSE M, PIOLOT A, SELHUB J, DAVIGNON J, GENEST JR J. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996;64:587-93.
- ✓ MAURATH HJ, JOOSTEN E, RIEZLER R, STABLER SP, ALLEN RH, LINDENBAUM J. Effects of vitamin B12, Folate and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* 1995; 346(8975):635
- ✓ McCULLY KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
- ✓ MIZRAHI EH, NOY S, SELA BA, FLEISSING Y, ARAD M, ADUNSKY A. Further evidence of interrelation between homocysteine and hypertension in stroke patients: a cross-sectional study. *IMAJ* 2003; 5:791-794.
- ✓ 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* 2001; 103:133-39.

- ✓ MORIYAMA Y, OKAMURA T, KAJINAMI K, ISO H, INAZU A, KAWASHIRI M, *et al.* Effects of serum B vitamins on elevated plasma homocysteine levels associated with the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese. *Atheroscler* 2002; 164: 321-328.
- ✓ MUIR KW, WEIR CJ, ALWAN W, SQUIRE IB, LEES KR. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30: 981-85.
- ✓ MURRAY CJ, LOPEZ AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 49: 1269 – 1276.
- ✓ NAKANO E, HIGGINS JA, POWERS HJ. Folate protects against oxidative modification of human LDL. *Br J Nutr* 2001; 86: 637-39.
- ✓ NAKAZONO K, WATANABE N, MATSUNO K, SASAKI J, SATO T, IROUE M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:10045-10048.
- ✓ NEGISHI H, IKEDA K, NARA Y, YAMORI Y. Increased hydroxyl radicals in hippocampus of stroke-prone spontaneously hypertensive rats during transient ischemia and recirculation. *Neurosci Lett* 2001; 306:206-8
- ✓ NEWBERNE PM, BIERT JG, BRIGGS MG, NESHEIM ML. Control of diets in laboratory animal experimentation. *National Academy of Sciences, Washington DC*, nº 1, A5-A12, 1978.
- ✓ NOGUCHI T, IKEDA K, SASAKI Y, YAMORI Y. Nutritional prevention on hypertension, cerebral hemodynamics and thrombosis in Stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* 2004, 24(5):599-638

- ✓ NYGARD O, VOLLSET SE, REFSUM H, STENSVOLD I, TVERDAL A, NORDREHAUG JE, UELAND M, KVALE G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274:1526-1533
- ✓ OGATA J, FUJISHIMA M, TAMAKI K, NAKATOMI Y, ISHITSUKA T, OMAE T. Vascular changes underlying cerebral lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Acta Neuropathol* 1981; 54: 183-188.
- ✓ OKAMOTO K, YAMORI Y, NAGAOKA A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 1974; 33/34: 1143-1153.
- ✓ OLSZEWSKI AJ, MCCULLY KS. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Rad Biol Med* 1993; 14:683-693.
- ✓ PARK JB, TOUYZ RM, CHEN X, SCHIFFRIN EL. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertension* 2002; 15:78-84
- ✓ PEREZ SC, VIANNA LM. Hypotensive effect of pyridoxine and folic acid supplementation of stroke prone rats. *Arch Neurocienc Mex* 2005; 10(3): 146-49
- ✓ PERRY IJ, REFSUM H, MORRIS RW, EBRAHIM SB, UELAND PM, SHAPER AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346: 1395-1398.

- ✓ PINTO A, TUTTOLOMONDO A, DI RAIMONDO D, FERNANDEZ P, LICATA G. Cerebrovascular risk factors and clinical classification of strokes. *Semin Vasc Med* 2004; 4: 287– 303.
- ✓ POLIDORI MC, CHERUBINI A, STAHL W, SENIN Y, SIES H, MECOCCHI P. Plasma carotenoid and malondialdehyde levels in ischemic stroke patients: relationship to early outcome. *Free Rad Res* 2002; 36(3):265-68.
- ✓ POSNER HB, TANG MX, LUCHSINGER J, LANTIGUA R, STERN Y, MAYEUX R. The relationship of hypertension in the elderly to AD, vascular dementia, and cognitive function. *Neurology* 2002; 58: 1175–1181.
- ✓ QUERE I, HILLAIRE-BUYS D, BRUNSCHWIG C, CHAPAL J, JANBON C, BLAYAC JP, PETIT P, LOUBATIERES-MARIANI MM. Effects of homocysteine on acetylcholine and adenosine-induced vasodilatation of pancreatic vascular bed in rats. *Br J Pharmacol* 1997; 122:351-57
- ✓ RADANOVIC M. Características do atendimento em pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário. *Arq Neuropsiquiatr* 1999; 58: 99-106.
- ✓ RIBEIRO JM. Prevenção secundária do acidente vascular encefálico. *Rev. Bras. Hipertens.* 2003; 10(2): 142-44
- ✓ RICHTER A, GONDEK K, OSTROWSKI C, DOMBECK M, LAMB S. Mild-to- moderate uncomplicated hypertension: further analysis of a cost-effectiveness study of five drugs. *Manag care interface* 2001; 14: 61-69.

- ✓ RIDKER PM, HENNEKENS CH, BURING JE, RIFAI N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342: 836-43.
- ✓ RINCHART JF, GREENBERG LD. Arteriosclerotic lesions in pyridoxine-deficient monkeys. *In: KELLY PJ, KISTLER JP, SHIH VE, R MANDELL, ATASSI N, BARRON M, LEE H, SILVEIRA S, FURIE KL. Inflammation, homocysteine and vitamin B6 status after ischemic stroke. Stroke* 2004; 35:12-15.
- ✓ SANDERCOCK P, WARLOW CP, JOHNS LN, STARKEY IR. Predisposing factors for cerebral infarction: The Oxfordshire Community Stroke Project. *Br Med J* 1989; 298: 75-80.
- ✓ SANTO AH. Causas múltiplas de morte: formas de apresentação e métodos de análise. *In: LOTUFO PA. Mortalidade pela doença cerebrovascular no Brasil. Rev Brás Hipertens* 2000; 4: 387-91.
- ✓ SCHNACKENBERG GG, WELCH WJ, WILCOX CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 1998; 32:59-64
- ✓ SELHUB J, JACQUES PF, WILSON PW, RUSH D, ROSENBERG IH. Vitamin status in intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693-98.
- ✓ SESHADRI N, MESSERLI AW, PEARCE GL, JACOBSEN DW, ROBINSON K, SPRECHER DL. Association of elevated plasma total homocysteine levels with hypertension. *AJH* 2003; 16: 248A (Abstract)

- ✓ SHEA TB, ROGERS E. Folate quenches oxidative damage in brains of apolipoprotein E-deficient mice: augmentation by vitamin E. *Mol Brain Res* 2002; 108:1-6.
- ✓ SIRONI L, TREMOLI E, MILLER I, GUERRINI U, CALVUO AM, EBIRINI I, GEIMEINER M, ASDENTE M, PAOLETTI R, GIANAZZA E. Acute-phase proteins before cerebral ischemia in stroke-prone rats: identification by proteomics. *Stroke* 2001; 32:753-756
- ✓ STAESSEN JA, FAGARD R, THIJS L, CELIS H, ARABIDZE GG, BIRKENHAGER WH, *et al.* Randomized double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet* 1997; 350:757-64.
- ✓ STAMLER JS, SLIVKA A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev* 1996; 54:1-30.
- ✓ STAMPFER MJ MALINOW R, WILLETT WC, NEWCOMER LM, UPSON B, ULLMANN D, *et al.* A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268:877-81
- ✓ STROES ES, VAN FAASSEN EE, YO M, MARTASEK P, BOER P, GOVERS R, RABELINK TJ. Folic acid reverts dysfunction on endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86: 1129-1134.
- ✓ SU SJ, HUANG LW, PAI LS, LIU HW, CHANG LK. Homocysteine at pathophysiologic concentrations activates human monocyte and induces cytokine expression and inhibits macrophage migration inhibitory factor expression. *Nutrition* 2005; 21:994-1002

- ✓ SUI H, WANG W, WANG PH, LUI LS. Protective effect of antioxidant ebselen (PZS1) on the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2005; 28(3):249-54. (Abstract)
- ✓ SUNDSTROM J, SULLIVAN L, D'AGOSTINO RB, JACQUES PF, SELHUB J, ROSENBERG IH, WILSON PWF, LEVY D, VASAN RS. Plasma homocysteine, hypertension incidence and blood pressure tracking. The Framingham Heart Study. *Hypertension* 2003; 42:1100-1105.
- ✓ SUTTON-TYRRELL K, BOSTOM A, SELHUB J, ZEIGLER-JOHNSON C. High homocysteine levels are independently related to isolated systolic hypertension in older adults. *Circulation* 1997; 96:1745-49.
- ✓ TAGAMI M, IKEDA K, YAMAGATA K, NARA Y, FUJINO H, KUBOTA A, NUMANO F, YAMORI Y. Vitamin E prevents apoptosis in hippocampal neurons caused by cerebral ischemia and reperfusion in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest* 1999; 79: 609-615.
- ✓ TAGAMI M, YAMAGATA K, IKEDA K, NARA Y, FUJINO H, KUBOTA A, NUMANO F, YAMORI Y. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion. *Lab Invest* 1998; 78:1415-1429
- ✓ THE HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta analysis. *JAMA* 2002; 288:2015-22.
- ✓ TOOLE JF, MALINOW MR, CHAMBLESS LE, SPENCE JD, CREED PL, HOWARD MD, SIDES VJ, WANG EG, STAMPFER CH. Lowering

homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction and death. The vitamin intervention for stroke prevention (VISP) Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2004; 291(5):565-75.

- ✓ TRAYSTMAN RJ, KIRSCH JR, KOEHLER RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71:1185-95.
- ✓ TSAI J-C, PERRELLA MA, YOSHIZUMI M, HSIEH C-M, HABER E, SCHLEGEL R, LEE M-E. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:6369-6373.
- ✓ TSAI MY, WELGE BG, HANSON NQ, BIGNELL MK, VESSEY J, SCHWICHTENBERG K, YANG F, BULLEMER PE, RASMUSSEN R, GRAHAM KJ. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. *Atheroscler* 1999; 143: 163-170.
- ✓ UELAND PM, REFSUM H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 47 –501.
- ✓ UPCHURCH GR JR, WELCH GN, FABIAN AJ, PIGAZZI A, KEANEY JF JR, LOSCALZO J. Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. *Atheroscler* 1997; 132:177-85

- ✓ VASDEV S, FORD CA, PARAI S, LOGERICH L, GADAG V. Dietary vitamin B6 supplementation attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 1999; 200:155-162
- ✓ VIANNA LM, VANDENBOER H, BATISTA KM, SILVA F, MIZURINNI D. Toxicidade da piridoxina observada em SHR idosos. *Rev Cient Univ Barra Mansa* 2001;3(6):34-38
- ✓ VIANNA LM. Efeito da administração crônica da vitamina D3 em ratos espontaneamente hipertensos. Tese de doutorado apresentada à Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1992. 107p.
- ✓ VIANNA LM. Manual de Nutrofisiologia Experimental. Ed. Difusão, Rio de Janeiro, 2005 (*In Press*)
- ✓ VIANNA LM; MIZURI D; TEIXEIRA F. Pyridoxine and folic acid combined therapy provides the best physiological response. *Ann Nutr Metab* 2003; 47: 319.
- ✓ VILA N, FILELLE X, DEULOFEU R, ASCASO C, ABELLANA R, CHAMORRO A. Cytokine-induced inflammation and long-term stroke functional outcome. *J Neurol Sci* 1999; 162:185-88.
- ✓ VOLPE M, IACCARINO G, VECCHIONE C, RIZZOLI D, RUSSO R, RUBATTU S, CONDORELLI G, GANTEN U, GANTEN D, TRIMARCO B, LINDPAINNER K. Association and cosegregation of stroke with impaired endothelium-dependent vasorelaxation in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1996; 98:256-261
- ✓ VOUTILAINEN S, MORROW JD, ROBERTS LJ, ALFTHAN G, ALHO H, NYSSONEN K, SALONEN JT. Enhanced in vivo lipid peroxidation at

elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thrombos Vasc Biol* 1999; 19:1263-1266

- ✓ WALL RT, HARLAN JM, HARKER LA, STRIKER GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; 18:113-21.
- ✓ WILLIAM JR, HARRISON TR, GROLLMAN A. A simple method for determining the systolic blood pressure of unanesthetized rat. *J.Clin.Invest* 1939, 18: 373.
- ✓ WU R, MILLET E, WU L. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from Spontaneously Hypertensive and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; 741-748.
- ✓ YAMAGATA K, TAGAMI M, NARA Y, FUJINO H, KUBOTA A, NUMANO F, KATO T, YAMORI Y. Faulty induction of blood-brain barrier functions by astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24: 686-91
- ✓ YAMORI Y, HORIE R, SATO M, HANDA H. Pathogenetic similarity of stroke in stroke-prone SHR and human. *Stroke* 7:46-53
- ✓ YAMORI Y. Studies on spontaneously hypertension –development from animal models toward man. *Clin Exp Hypertens* 1991; 13:631-644
- ✓ YAMORI Y. The stroke-prone spontaneously hypertensive rats: Contribution to risk factor analysis and prevention of hypertensive diseases. In: NOGUCHI T, IKEDA K, SASAKI Y, YAMORI Y. Nutritional prevention on hypertension, cerebral hemodynamics and thrombosis in

Stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* 2004, 24(5):599-638

- ✓ YEN CH, LAU YT. Vascular responses in male and female hypertensive rats with hyperhomocysteinemia. *Hypertens* 2002; 40:322-28.
- ✓ ZALBA G, BEAUMONT FJ, SAN JOSE G, FORTUÑO A, FORTUÑO MA, ETAYO JC; DÍEZ J. Vascular NADH/NADPH oxidative is involved in enhanced superoxide production in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens* 2000; 35:1055-1061
- ✓ ZHANG F, SLUNGAARD A, VERCELLOTTI GM, IADECOLA C. Super-oxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine. *Am J Physiol* 1998; 274: 1704-11.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)