



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

**CAMILLE FEITOZA FRANÇA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE RIBOFLAVINA NOS FATORES DE RISCO  
DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE) EM RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COM PROPENSÃO  
À ISQUEMIA CEREBRAL (SHR-SP)**

RIO DE JANEIRO  
2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**CAMILLE FEITOZA FRANÇA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE RIBOFLAVINA NOS FATORES DE RISCO  
DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE) EM RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COM PROPENSÃO  
À ISQUEMIA CEREBRAL (SHR-SP)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucia Marques Alves  
Vianna

RIO DE JANEIRO  
2010

616.8  
F814e

França, Camille Feitoza,  
Efeitos da Suplementação de Riboflavina nos Fatores de Risco do Acidente Vascular Encefálico (AVE) em Ratos Espontaneamente Hipertensos com Propensão à Isquemia Cerebral (SHR-sp). / Camille Feitoza França - Rio de Janeiro, 2010.

51 f.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Marques Alves Vianna.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Mestrado em Neurologia, 2010.

1. SHR-sp. 2. Hipertensão. 3. Acidente vascular encefálico (AVE). 4. Riboflavina (B<sub>2</sub>). 5. Homocisteína. I. Vianna, Lucia Marques Alves. II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. III. Título.

**CAMILLE FEITOZA FRANÇA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE RIBOFLAVINA NOS FATORES DE RISCO  
DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE) EM RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COM PROPENSÃO  
À ISQUEMIA CEREBRAL (SHR-SP)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências

Aprovada em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Marques Alves Vianna  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Lugarinho da Fonseca  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Montes Alto Costa  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

## **DEDICATÓRIA**

Tudo o que aparece em nosso caminho faz parte do processo evolutivo de cada indivíduo, nada acontece por acaso. A vida não faz nada sem finalidade. Todos os fatos que ocorrem, a cada momento, independente da situação, são porque temos condições de aproveitar e amadurecer. Tudo tem sua hora certa. E é com muita felicidade que eu dedico com carinho esta dissertação a todos que me acompanharam nessa jornada.

## AGRADECIMENTOS

Fruto de muito estudo, dedicação e persistência, este trabalho contou com o apoio e a colaboração de muitas pessoas, as quais dedico os meus agradecimentos especiais:

Primeiramente, a Deus pelo dom da vida, renovado a cada provação que se apresenta e nos sonhos que se concretizam, como este que agora se torna realidade.

À minha mãe, por todo o amor, dedicação, educação, paciência, confiança e pelo apoio incondicional durante todas as etapas de minha vida. À ela, minha eterna gratidão.

Ao meu pai e minha avó, Maria Rosa, *in memoriam*, pelo amor, carinho e ensinamentos a mim transmitidos durante o tempo em que passamos juntos.

À minha irmã, minha sobrinha e meu sobrinho, por momentos tão alegres e felizes em família.

Ao meu namorado, Victor Agati, por ter acreditado em meu potencial, pela colaboração, compreensão e por ser um verdadeiro amigo e companheiro em todos os momentos que passamos juntos.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Lucia Marques Vianna, que me acompanhou nesta trajetória acadêmica desde o início da minha graduação em Nutrição, além da amizade e confiança que depositou em mim durante todos esses anos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em neurologia da UNIRIO, em especial, a Prof<sup>a</sup> Regina Alvarenga, por todo seu idealismo e perseverança na construção de um curso de mestrado de tão alta qualidade.

Aos professores que compõem essa banca examinadora por aceitarem, gentilmente, meu convite e, assim, me ajudarem a enriquecer esse trabalho.

Aos meus amigos e colegas que me apoiaram na confecção desta dissertação e, também, me incentivaram nos momentos difíceis dessa caminhada, em especial, Rafael Braune de Castro.

A todos aqueles que me ajudaram de forma direta e indireta na concretização deste trabalho, no entanto, em agradecimento especial a Rosalia e Henrique Camello.

A todos, meu sincero obrigada.

“Só aqueles que têm coragem de caminhar podem viver todos os dias na certeza de chegar.”

(autor desconhecido)

## RESUMO

A linhagem de ratos SHR-sp é um modelo de animal reconhecido para estudo de hipertensão grave e acidente vascular encefálico (AVE), que apresenta no tecido níveis elevados de radicais livres e as consequências de um estresse oxidativo, tais como dano mitocondrial, lesão endotelial, entre outros fatores. Este estudo tem como principal objetivo identificar os efeitos da vitamina B<sub>2</sub>, em ratos SHR-sp, intimamente envolvida na fosforilação oxidativa e, também, no metabolismo da homocisteína. Depois de 10 dias de período basal, os animais, 12 ratos SHR-sp com 11 semanas de idade, foram divididos em dois grupos: suplementado com riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) e controle, sendo n=6. Diariamente foram determinados o peso corporal, ingestão hídrica e alimentar, diurese; aspectos físicos observados em todo o corpo dos ratos (distribuição e coloração de pêlo, hemorragia, manchas, rachaduras, opacificação, coloração da mucosa nasal e oral, comportamento dócil ou agressivo, desequilíbrio, ataxia nos parâmetros motores) resposta sensório-motor e pressão arterial sistólica. Os dados foram avaliados pela análise de variância ANOVA *two-way* e considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ . As doses supra-fisiológicas não provocaram efeitos tóxicos. Houve uma diminuição significativa da pressão arterial sistólica, e, também, uma redução nos níveis de homocisteína (Hcy) e de dialdeído malônico (MDA) nos animais sob suplementação com a vitamina B<sub>2</sub>. Quanto ao efeito anti-hipertensivo aqui relatado, estes resultados sugerem que a terapia de vitaminas B<sub>2</sub> foi eficaz no controle da pressão arterial sistólica e o estresse oxidativo no modelo SHR-sp, por conseguinte, pode se tornar no futuro uma alternativa terapêutica para prevenir acidente vascular cerebral.

Palavras-Chave: SHR-sp. Hipertensão. Acidente vascular encefálico (AVE). Riboflavina (B<sub>2</sub>). Homocisteína.

## ABSTRACT

The *stroke prone rat* SHR-sp is a recognized animal model for study of severe hypertension and stroke, presenting an elevated tissue levels of free radicals and the consequences of an oxidative stress, such as mitochondrial damage, endothelial injury, among others factors. This study has as main goal to identify the effect of B<sub>2</sub> vitamin on SHR-sp rats, closely involved on oxidative phosphorylation and homocysteine metabolism as well. After 10 days of baseline period, the animals, 12 SHR-sp rats at 11 weeks of age, were divided in two groups of 6 rats: treated with riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) and control. Were daily determined the body weight, water and food intake, diuresis; physical aspects observed in the whole body of rats (distribution and coloring of hair; bleeding, stains, cracks, opacification, coloring of mucousnasal and oral; docile or aggressive behavior, imbalance, ataxia in motor parameters), sensory-motor responses and systolic blood pressure. The data was evaluated by ANOVA two-way considering statistically significant when  $p < 0,05$ . The supraphysiologic doses did not cause toxic effects. There were a significant decrease of systolic blood pressure, blood homocysteine (Hcy) and malondialdehyde (MDA) levels on those animals under B<sub>2</sub> vitamin supplementation. Regarding the antihypertensive effect here reported, these findings suggest that B<sub>2</sub> vitamin therapy was effective on the control of systolic blood pressure and the oxidative stress, therefore in the future it should be thought of as one alternative therapy to prevent stroke.

Key-words: SHR-sp. Hypertension. Stroke. Riboflavin (B<sub>2</sub>). Homocysteine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Metabolismo da homocisteína .....	17
Figura 2	Estrutura da riboflavina .....	22
Figura 3	Estrutura molecular das coenzimas .....	23
Figura 4	Gaiola metabólica .....	27
Figura 5	Caixa de aquecimento .....	28
Figura 6	Plestimógrafo .....	29
Figura 7	Gavagem orogástrica .....	29
Figura 8	Plano inclinado .....	30
Figura 9	Termo-sensório-motor .....	31
Figura 10	Labirinto .....	31
Figura 11	Barra de equilíbrio .....	32
Figura 12	Viga de equilíbrio .....	33
Gráfico 1	Efeitos da suplementação de riboflavina sobre a pressão arterial sistólica em ratos SHR-sp. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais (controle) 12 animais (tratados) . * p <0,05 em relação ao grupo controle .....	37

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Representa a média  $\pm$  DP do peso corporal, diurese e ingestão de água, ração e peso hepático (g) / 100g de peso corporal, de ratos SHR-sp tratados (n=6) com riboflavina (10mg/Kg de peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6) ..... 36
- Tabela 2 Representa a média  $\pm$  DP dos testes neurológicos (memória, viga e barra de equilíbrio e sensório-motor) dos ratos SHR-sp tratados (n=6) com riboflavina (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6) ..... 38
- Tabela 3 Representa a média  $\pm$  DP das dosagens de homocisteína (Hcy) e de dialdeído malônico (MDA) dos ratos SHR-sp tratados (n=6) com riboflavina (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle(n=6) ..... 38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVEI	Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
B <sub>2</sub>	Riboflavina
CβS	Enzima Cistationina β Sintase
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FMN	Flavina Mononucleotídeo
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água Oxigenada
Hcy	Homocisteína
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performace
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LINDCD	Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico Degenerativos
MDA	Dialdeído Malônico
MTHF	Metil 5-Metiltetraidrofolato Redutase
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
RDA	Recomendação Diária Alimentar
RfBP	Proteína Ligante da Riboflavina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SHR-sp	Ratos Espontaneamente Hipertensos com Propensão ao AVE
SNC	Sistema Nervoso Central
TxA <sub>2</sub>	Tromboxanos
WKY	Wistar Kyoto Rat

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1	HOMOCISTEÍNA .....	15
3.1.1	<b>A Relação entre o AVE e a homocisteína</b> .....	15
3.1.2	<b>Metabolismo da Homocistena</b> .....	17
3.1.3	<b>Associação entre a Hiper-Homocisteinemia e Doenças Cardiovasculares</b> .....	18
3.2	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL .....	21
3.2.1	<b>Disfunção Endotelial e Estresse Oxidativo</b> .....	21
3.3	RIBOFLAVINA .....	22
3.4	MODELO SHR-sp.....	25
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	ANIMAIS .....	27
4.2	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS GERAIS .....	27
4.3	SUPLEMENTAÇÃO .....	29
4.4	PARÂMETROS NEUROLÓGICOS .....	30
4.5	TOXICIDADE .....	33
4.6	DOSAGEM DE HOMOCISTEÍNA (Hcy) .....	34
4.7	DOSAGEM DE DIALDEÍDO MALÔNICO (MDA) .....	34
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
5	<b>RESULTADO</b> .....	36
5.1	PARÂMETRO BIOLÓGICO GERAL .....	36
5.2	PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	36
5.3	PARÂMETRO NEUROLÓGICO .....	37
5.4	DOSAGEM DE HOMOCISTEÍNA (Hcy) e DIALDEÍDO MALÔNICO (MDA) .....	38
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	39
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	42
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

Os acidentes vasculares encefálicos (AVE) têm pico de incidência entre a 7ª e 8ª décadas de vida quando se somam às alterações cardiovasculares e metabólicas relacionadas à idade (SACCO; HAUSER; MOHR, 1991; LENO et al., 1993). Entretanto, o AVE pode ocorrer mais precocemente e ser relacionado a outros fatores de risco, tais como diabetes, hipertensão, obesidade, doenças inflamatórias e imunológicas (SIQUEIRA; SANTOS; SAKAMOTO, 1996). Estudos prévios demonstram incidência de 10% em indivíduos com idade inferior a 55 anos (NENCINI et al., 1988) e de 3,9% naqueles com idade inferior a 45 anos (KRISTENSEN et al., 1997).

Outro problema relacionado ao AVE é a deficiência motora adquirida, pois ela é responsável por até 80% das incapacidades e a terceira causa de morte em adultos (ODDERSON; KEATON; MCKENNA, 1995). Está descrita a ocorrência de 700.000 casos de AVE anuais, sendo 500.000 novos e 200.000 recorrentes, totalizando, na população mundial, aproximadamente 3,89 milhões de indivíduos sobreviventes a esta afecção (ROTH; HARVEY, 2000).

Segundo referem Lawrence e colaboradores (2001), 50,6% dos pacientes têm entre seis e dez tipos de incapacidade, sendo a mais prevalente a fraqueza muscular, presente em 77,4% dos pacientes, seguida dos distúrbios da comunicação e linguagem (58%) e da disfagia, esta última figurando em terceiro lugar, com 44,7% das incapacidades encontradas.

Atualmente, há fortes evidências da implicação do estresse oxidativo na etiopatogenia das disfunções vasculares em geral, pois a reação dos radicais livres com macromoléculas (lipídios) inicia um processo de oxidação desencadeando reação inflamatória com injúria endotelial e diminuição da elasticidade de pequenos e grandes vasos provocando a hipertensão arterial (PAWLAR; PAWLAW; MYSLIWIEEC, 2005; VIANNA, 2009). Por isso, destacamos a hipertensão arterial e a aterosclerose como os principais influenciadores do AVE isquêmico (ADMS; VICTOR, 1996), dentre os fatores de risco já citados.

Assim, uma série de estudos tem sido realizada com a finalidade de identificar terapias alternativas para o tratamento dessas doenças (hipertensão e aterosclerose), que incluem a possível ação de nutrientes protetores do endotélio vascular, dentre os quais destacamos as vitaminas (BORGES, 1999, 2002).

Ensaio prévios em nosso laboratório confirmaram a ação protetora do  $\alpha$ -tocoferol *in vivo*, reconhecido agente de ação antioxidante. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com essa vitamina tiveram uma redução da pressão arterial sistólica, após duas semanas de tratamento, que foi acompanhado de redução da viscosidade sanguínea e melhora da morfologia de cardiomiócitos (COSTA et al., 2005).

A utilização de piridoxina (vitamina B6) em ratos SHR e ratos sujeitos ao acidente vascular encefálico (SHR-sp), também resultou em uma redução da pressão arterial sistólica em ambas as linhagens e significativa redução dos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo (MIZURINNI et al., 2002; PEREZ; VIANNA, 2005).

Concomitantemente, a suplementação de  $\beta$ -caroteno em animais hipertensos, também resultou na redução dos níveis pressóricos e no dialdeído malônico plasmático (ASSIS et al., 2008).

Por outro lado, uma série de outras vitaminas potencialmente envolvidas em mecanismos de óxido-redução podem, também, desempenhar um papel mais significativo no controle das doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.

Entretanto, nem sempre encontramos esta ação bem definida. No que se refere a isso, a riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) vem sendo citada como possível fator de proteção cardiovascular devido a sua atuação no mecanismo de oxido-redução e no metabolismo da homocisteína (SOUZA, 2005). Mas, ainda há uma carência de trabalhos além de existir controvérsias quanto à toxicidade desta vitamina (ZEMPLINI et al., 1996).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar os efeitos da suplementação crônica de riboflavina sobre os parâmetros biológicos gerais de ratos espontaneamente hipertensos com propensão à isquemia cerebral (SHR-sp).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da suplementação suprafisiológica da riboflavina sobre os níveis:
  - Pressão Arterial Sistólica;
  - Plasmáticos da Homocisteína;
  - Plasmáticos de Dialdeído Malônico;
- Verificar se a suplementação suprafisiológica de riboflavina:
  - Altera os parâmetros físicos e comportamentais;
  - Atua nas alterações neurológicas observadas nessa linhagem.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 HOMOCISTEÍNA

##### 3.1.1 A relação entre AVE e homocisteína

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido dedicados a identificação de fatores de risco para as doenças de maior impacto social com o objetivo de prevenir sua ocorrência. Dentre tais doenças, uma das mais estudadas é o acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI), sendo dos processos desencadeantes mais freqüentes, a aterosclerose. McCully (1969) evidenciou a associação entre aterosclerose e concentrações elevadas de homocisteína plasmática (MCCULLY, 1996). Em 1984, Brattström e colaboradores fizeram o primeiro estudo controlado sobre níveis elevados de homocisteína em pacientes com história de acidente vascular cerebral (AVE) (BRATTSTRÖM; HARDEDO; HULTBERG, 1984).

Pesquisadores do estudo de Framingham incluíram a homocisteína (Hcy) na relação de possíveis fatores de risco para doença cardíaca. Este estudo, que completou 50 anos de seguimento em 1998, mostrou que a doença coronariana isquêmica e a doença aterotrombótica cerebral apresentam vários fatores de risco em comum (BOSTOM; ROSEMBERG; SILBERSHATZ, 1999). Kang e colaboradores (1992) publicaram um artigo de revisão que reforçou o conceito de que hiper-homocisteinemia moderada seria fator de risco independente para o desenvolvimento de aterosclerose nas vasculaturas coronariana, periférica e cerebral.

Nos últimos 10 anos, foram realizados mais de 20 estudos transversais e de caso-controle que reforçaram essa relação de risco (CLARKE; DALY; ROBINSON, 1991; ARNESEN et al., 1995). Alguns desses estudos utilizaram o desenho de caso-controle com uma coleta prospectiva de amostras sanguíneas. Entre eles estão a pesquisa conduzida por Stampfer e colaboradores (1992), no Physicians Health Study, e Arnesen e seu grupo (1995) na população da Noruega, que encontraram associação positiva entre hiper-homocisteinemia e doença cardíaca. Em 1995, Perry e colaboradores aproveitaram a pesquisa de British Regional Heart Study e conduziram o primeiro estudo prospectivo que mostrou forte associação entre

concentrações plasmáticas de homocisteína e a ocorrência de AVE (PERRY et al., 1995; BOSTOM; ROSEMBERG; SILBERSHATZ, 1999).

O estudo de Framingham, Bostom e colaboradores (1999) confirmou que a homocisteína poderia ser um fator de risco independente para a ocorrência de acidente vascular cerebral (BOSTOM; ROSEMBERG; SILBERSHATZ, 1999).

A homocisteína é um aminoácido sulfurado não essencial encontrado na forma de produto intermediário no metabolismo da metionina (JACQUES, 2001). Esse aminoácido não forma proteínas e está na interseção de duas vias metabólicas: remetilação da metionina e transulfuração da cisteína. Quando alguma destas vias metabólicas sofre bloqueio, total ou parcial, há aumento na concentração de homocisteína circulante, pois este aminoácido não se acumula nas células. Cerca de 70% da homocisteína presente no sangue está ligada as proteínas, principalmente albumina. Uma pequena fração permanece na forma livre, e o restante, espontaneamente, forma di-sulfídios como cisteína-homocisteína. A expressão homocisteína total refere-se à soma das concentrações de homocisteína livre, ligada a proteínas e na forma de di-sulfídios (JACQUES, 2001).

O mecanismo pelo qual a hiper-homocisteinemia atua como fator de risco para doenças cerebrovasculares ainda não está totalmente esclarecido, mas as pesquisas apontam para diversos fatores, entre os quais podemos citar a promoção de disfunção endotelial (EBERHARDT et al., 2004) e a peroxidação lipídica (HIRANO et al., 1994).

Estudos sobre esses dois fatores originaram a teoria do estresse oxidativo, provocado pelo aumento da homocisteína, pela disfunção vascular, segundo a qual o grupo sulfidríla da homocisteína sofre auto-oxidação ao reagir cataliticamente com íons cúprico e férrico, gerando  $H_2O_2$  e radicais superóxido ( $O_2^-$ ) (LOSCALZO, 1996). Acredita-se que essas moléculas sejam responsáveis pela citotoxicidade da homocisteína. Uma consequência da formação de radicais  $O_2^-$  e também de OH é a peroxidação lipídica que ocorre na superfície das células endoteliais e dentro das partículas de lipoproteínas do plasma (HIRANO et al., 1994). As lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) não-oxidadas são fracamente aterogênicas, ao contrário da sua forma oxidada (fortemente aterogênica) que é imediatamente assimilada por monócitos. A LDL oxidada, na presença de plaquetas, pode promover a geração de tromboxanos ( $TxA_2$ ) e, assim, ativar a trombogênese (SINATRA; DEMARCO, 1995).

### 3.1.2 Metabolismo da homocisteína

Duas reações estão envolvidas no metabolismo da homocisteína: transulfuração e remetilação. Na reação de transulfuração, a homocisteína condensa-se irreversivelmente com a serina para formar a cistationina, sendo tal reação catalisada pela enzima cistationina  $\beta$  sintase ( $C\beta S$ ) que é dependente de piridoxina, agindo como um co-fator (SAW et al., 2001).

Na reação de remetilação, a homocisteína é revertida a metionina ao receber o grupamento metil do 5-metiltetraidrofolato proveniente do folato dietético (Perry et al., 1995). A enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHF redutase) é a enzima responsável pela conversão do 5,10-metilenotetraidrofolato em 5-metiltetraidrofolato.

O grupo metil também pode ser doado pela betaína. A reação com o 5-metiltetraidrofolato ocorre em todos os tecidos e é dependente de cobalamina, enquanto a reação com a betaína ocorre, principalmente, no fígado e é independente de cobalamina (LENTZ, 1997) (Figura 1).

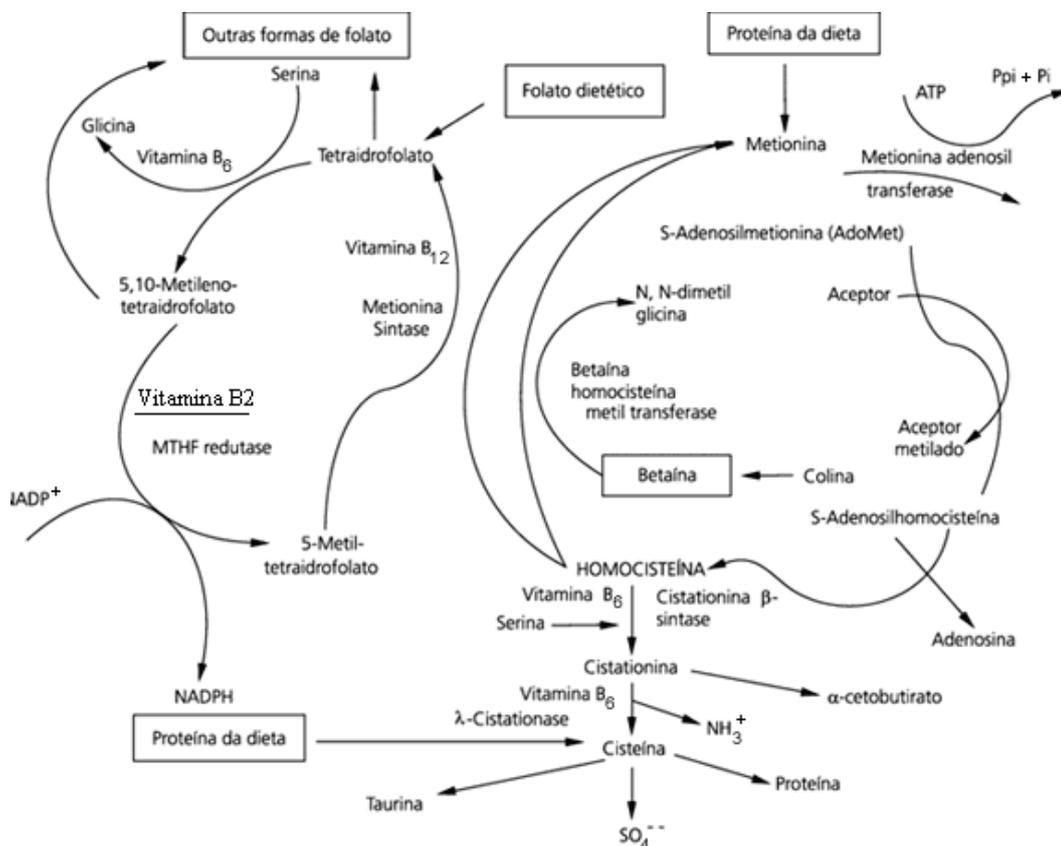


Figura 1: Metabolismo da homocisteína

### 3.1.3 Associação entre a Hiper-Homocisteinemia e Doenças Cardiovasculares

Segundo Weiss e colaboradores (2000), a disfunção endotelial associada à hiper-homocisteinemia é manifestada pelo prejuízo da regulação do tônus vascular, do fluxo sanguíneo e pela perda da função antitrombótica das células endoteliais. De acordo com Domagala e colaboradores (1998), a produção de radicais livres durante a oxidação da homocisteína favorece a disfunção endotelial. Quando adicionada ao plasma, a homocisteína é rapidamente auto-oxidada, originando a homocistina e homocisteína tiolactona (WELCH; LOSCALZO, 1998) bem como outras formas ativas de oxigênio consideradas citotóxicas, tais como o superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (WELCH; UPCHURCH; LOSCALZO, 1997). Observou-se que os radicais hidroxila e superóxido estão envolvidos no início da peroxidação lipídica e da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), respectivamente (UPCHURCH et al., 1997). Foi demonstrado que a homocisteína prejudica a expressão da peroxidase glutationa pelas células endoteliais, favorecendo a peroxidação lipídica (DURAND et al., 2001).

Ainda no estudo de Domagala e colaboradores (1998), a hiper-homocisteinemia estimula a proliferação de células musculares lisas e inibe o crescimento de células endoteliais, favorecendo a aterosclerose. Um dos mecanismos pelos quais o aumento da homocisteína favorece a proliferação dessas células é pela inativação do óxido nítrico a partir dos peróxidos de lipídios produzidos pela oxidação desse aminoácido sulfurado (SYDOW; BOGER, 2001). A inibição da proliferação e migração de células musculares lisas é dada pelo óxido nítrico (WELCH; UPCHURCH; LOSCALZO, 1997). A sua inativação deixa o endotélio mais vulnerável aos danos promovidos pela homocisteína (UPCHURCH et al., 1997). Sugere-se que o aumento moderado dos níveis de homocisteína seja o principal fator de risco para as doenças aterotrombóticas, uma vez que afeta o sistema de coagulação sanguínea (DURAND et al., 2001). Segundo Harpel e colaboradores (1996), a hiper-homocisteinemia inibe vários mecanismos anticoagulantes que são mediados pelo endotélio vascular.

Em Welch e colaboradores (1997), a atividade pró-coagulante do endotélio é estimulada pela hiper-homocisteinemia através dos seguintes mecanismos: aumento da atividade dos fatores XII e V, redução da ativação da proteína C, indução da expressão do fator tecidual (ativando a via extrínseca de coagulação), supressão da

expressão do sulfato de heparan pelo endotélio e inibição da atividade da trombomodulina. Todos esses mecanismos facilitam a formação de trombina, aumentando a propensão de eventos trombóticos e aterogênicos (WELCH; UPCHURCH; LOSCALZO, 1997).

Lauricella e colaboradores (2002) investigaram os efeitos da hiper-homocisteinemia na formação e na estrutura das fibras de fibrina e verificaram que essas fibras eram mais compactas e mais curtas, sendo mais resistentes à ação do sistema fibrinolítico. Convém destacar que a velocidade da fibrinólise sofre grande influência do tamanho e densidade das fibras. As fibras densas sofrem dissolução mais lentamente do que as finas.

Outro possível mecanismo pelo qual a hiper-homocisteinemia pode promover a aterogênese é por meio da redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, um potente agente anti-agregante que exerce um importante papel na regulação da função plaquetária, visto por Domagala e colaboradores (1998). Leoncini e colaboradores (2003) observaram que a hiper-homocisteinemia leva a uma diminuição do transporte de arginina, importante para a biossíntese do óxido nítrico.

Stamler e colaboradores (1993) demonstraram que as células endoteliais detoxificam a homocisteína por meio da liberação do óxido nítrico que, em presença do oxigênio, combina-se com a homocisteína, formando o S-nitroso-homocisteína. Os efeitos adversos da hiper-homocisteinemia são abrandados pela formação do S-nitroso-homocisteína que, por sua vez, não promove a formação de peróxido de hidrogênio e homocisteína tiolactona, produtos que contribuem para a toxicidade endotelial. Assim como os demais S-nitrosotióis, o S-nitroso-homocisteína é um vasodilator e inibidor plaquetário (STAMLER et al., 1993). Entretanto, a exposição prolongada a níveis elevados de homocisteína compromete o efeito protetor mediado pelo óxido nítrico, limitando a produção do mesmo pelo endotélio (MCCULLY, 1996).

Conforme Harpel e colaboradores (1996) e Coppola e colaboradores (2000), a maioria dos estudos que investigaram os possíveis mecanismos trombogênicos da hiper-homocisteinemia empregou experimentos *in vitro*, nos quais foram utilizadas concentrações elevadíssimas de homocisteína; em geral, concentrações maiores do que aquelas observadas nos casos de hiper-homocisteinemia. Há poucos registros na literatura científica de estudos *in vivo* com humanos (BORGES, 2002).

A compreensão dos mecanismos *in vivo* pelos quais a hiperhomocisteinemia se relaciona com as doenças vasculares oclusivas poderia fornecer novas abordagens para a prevenção e tratamento da aterotrombose (DOMAGALA et al., 1998).

Com isso, uma série de estudos tem sido realizada com a finalidade de identificar terapias alternativas para o tratamento dessas doenças, os quais incluem a possível ação de nutrientes protetores do endotélio vascular, com destaque para as vitaminas (BORGES, 1999, 2002). Algumas dessas vitaminas estão potencialmente envolvidas em mecanismos de óxido-redução e podem, também, desenvolver um papel mais significativo no controle das doenças cardiovasculares e cérebro-vasculares e, assim, destacamos a riboflavina.

## 3.2 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

### 3.2.1 Disfunção Endotelial e Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS), conhecidas como radicais livres, são componentes químicos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados que reagem com proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, oxidando-os. As fontes de radicais livres podem ser endógenas (metabolismo do oxigênio, fagocitose, apoptose, coagulação) ou então exógenas (cigarros, drogas, dieta, pesticidas, ozônio, nitrogênio, dióxido sulfúrico, raio-X, luz ultravioleta). Os radicais livres em humanos podem incluir radicais hidroxil, ânions superóxidos, peróxidos de hidrogênio e a molécula simples do oxigênio (EMMERT; KIRCHNER, 1999).

A oxidação pode alterar a estrutura molecular e, posteriormente, a sua função. Essas alterações acontecem de modo eventual, provavelmente por comandos anatômicos e fisiológicos desordenados, como malignidade e doenças cardiovasculares (CUTLER, 1991). É estimado que o DNA humano receba, a cada dia, cerca de 10.000 impactos oxidativos, indicando que o estresse oxidativo é onipresente (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993). Portanto, o mecanismo antioxidante do sistema de defesa dos seres humanos é excelente, envolvendo métodos de prevenção (executado por proteínas extracelulares), de reparo (através de enzimas, como a superóxido desmutase) e de intercepção (agentes

antioxidantes, como as vitaminas C e E e os carotenóides) (EMMERT; KIRCHNER, 1999).

A disfunção endotelial é resultado de uma desregularização da homeostase vascular. Uma das propostas para o mecanismo da disfunção endotelial envolve a degradação acelerada do óxido nítrico pelas espécies reativas de oxigênio (COSENTINO; LÜSCHER, 1998). Portanto, a redução da concentração de ROS através de terapia antioxidante é um potente mecanismo para o tratamento da disfunção endotelial, através da manutenção da função endotelial e também prevenindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (DUVALL, 2005).

O óxido nítrico é um importante componente para o controle da homeostase vascular, pois controla o tônus vascular, o fenótipo das células musculares lisas e a adesão e agregação das plaquetas e dos leucócitos (KEANEY; SIMON; FREEDMAN, 1999).

Normalmente, há um perfeito balanço entre os oxidantes e os antioxidantes, mas toxinas externas, mutações incorretas do DNA e oxidação dos lipídios das membranas podem eventualmente afetar esse balanço, promovendo assim, as doenças (EMMERT; KIRCHNER, 1999).

### 3.3 RIBOFLAVINA

A riboflavina, 7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina (Figura 2), é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B (vitamina B<sub>2</sub>), apresenta coloração amarela e é fluorescente. Além do leite que foi uma das primeiras fontes de obtenção, essa vitamina é encontrada também em carne, peixe e, principalmente, em vegetais de cor verde-escura (BOERS et al., 1985; SOUZA, 2005). A riboflavina proveniente da dieta encontra-se na forma das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (Figura 3) ligadas a proteínas; no entanto, quando o bolo alimentar chega ao estômago, o meio ácido propicia a liberação destas coenzimas.

Essa vitamina é absorvida na forma livre a partir de um processo mediado por um carreador na parte proximal do intestino delgado (pirofosfatases e fosfatases) e armazenada nas células sob a forma de pigmento amarelo. Como a maioria dos alimentos contém a vitamina em sua forma de coenzimas, FAD e FMN, a absorção

segue a clivagem hidrolítica da riboflavina livre a partir de seus vários complexos de flavoproteína. A captura da riboflavina livre pela mucosa é a unida à sua fosforilação para FMN (SOUZA, 2005).

A vitamina B<sub>2</sub> é transportada no plasma tanto como riboflavina livre como FMN, ambas sendo amplamente ligadas à proteínas plasmáticas, particularmente albumina. A sua forma livre é transportada para a célula que promove a conversão em FAD e, principalmente, em FMN, que são amplamente ligadas a uma proteína ligante à riboflavina (RfBP). Apesar de pequenas quantidades da vitamina serem encontradas no fígado e, ela não é armazenada em qualquer grau apreciável e deve, portanto, ser fornecida regularmente na dieta (SOUZA, 2005).

A conversão em suas formas de coenzima é devida a uma fosforilação dependente de trifosfato de adenosina (ATP) para produzir riboflavina-5`-fosfato, também conhecida como FMN, pela enzima *flavocinase*. A maior parte de FMN é, então, convertida em FAD pela FAD-pirofosforilase. Ambos os passos são regulados pelos hormônios da tireóide (SOUZA, 2005).

Essa vitamina é essencial para o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídeos e também ajuda na proteção antioxidante. Devido a estes papéis fundamentais no metabolismo, a deficiência de riboflavina se manifestam primeiro nos tecidos de rápida dinâmica celular, tais como a epiderme e o epitélio intestinal (MCCULLY, 1996).

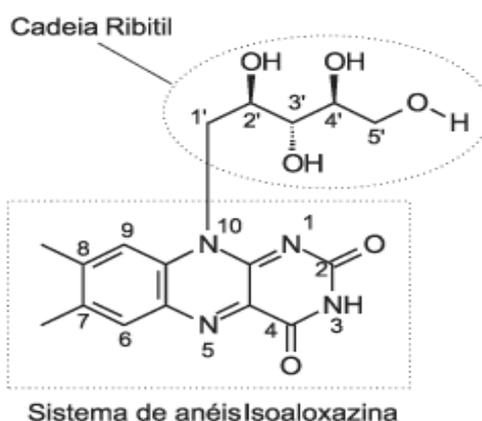


Figura 2: Estrutura da riboflavina

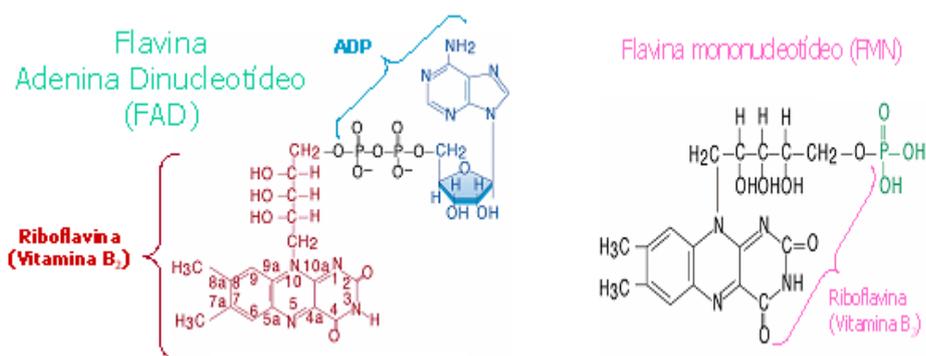


Figura 3: Estrutura molecular das coenzimas

A riboflavina é de fundamental importância em organismos aeróbios, sendo precursora de importantes coenzimas participantes da cadeia transportadora de elétrons como a FAD e FMN (CARSON; NEIL, 1962; CHEN; BONERJEE, 1998; BROUWER et al., 2000). Também origina muitas das flavinas que se encontram ligadas à diversas enzimas, as quais atuam na catálise de um grande número de importantes reações como as relacionadas ao reparo do DNA.

O metabolismo de lipídios necessita de derivados da riboflavina, assim como a degradação de drogas e outros compostos químicos exógenos (xenobióticos) via sistema de hidroxilação microsossomal. Cofatores de riboflavina são requeridos para o metabolismo do ácido fólico, piridoxina e niacina, além de serem utilizados por enzimas de eritrócitos, como a glutationa redutase que é uma enzima importante pertencente ao sistema de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas nessas células (CHEN; BONERJEE, 1998).

Curiosamente, a riboflavina pode tanto contribuir quanto inibir o estresse oxidativo através da sua dupla habilidade de produzir superóxido e, ao mesmo tempo, poder estar envolvida na redução de hidroperóxidos (BARBE et al., 2001).

Atualmente, a dose recomendada de ingestão de riboflavina varia desde 0,4 mg (na infância) a 1,3 mg/dia para adultos sendo que, para mulheres grávidas, recomenda-se uma dose suplementar de 0,3 mg/dia durante a gestação e 0,5 mg/dia durante o período de lactação, já que estudos mostram que durante o terceiro trimestre de gestação há uma queda progressiva nos níveis de riboflavina (CHRITENSEN et al., 1991, 1993).

Como participa de diversas reações de óxido-redução importantes no metabolismo através dos cofatores FMN e FAD, os quais atuam como carreadores de elétrons, dietas inadequadas de riboflavina poderiam levar a distúrbios no metabolismo intermediário. Em ratos, a deficiência em riboflavina foi associada a uma redução tecido-específica na atividade da succinato oxidorreductase (succinato desidrogenase), efeito este que pode ter implicações na produção de energia através da fosforilação oxidativa. Além disto, a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos também é dependente de flavinas como aceptores de elétrons (COOPER, 1983).

Em animais, estudos demonstraram que a deficiência de riboflavina está relacionada ao desenvolvimento anormal no feto e, em humanos, vários estudos correlacionam a deficiência de riboflavina com quadros hematológicos, principalmente com aqueles relacionados ao sistema hematopoiético (EMMERT; KIRCHNER, 1999).

Atualmente, a influência hematológica da deficiência de riboflavina tem sido associada a sua interferência no metabolismo do ferro, já que a mobilização de ferro a partir da proteína intracelular ferritina é um processo redutivo e flavinas reduzidas podem agir reduzindo o ferro da ferritina e, desta maneira, mobilizá-lo em vários tecidos em concentrações fisiologicamente relevantes. Sintomas de neurodegeneração e neuropatia têm sido documentados em vários estudos de dietas deficientes em riboflavina em diferentes espécies, apesar de haver pouca informação com relação à relevância desses resultados em humanos, mas sabe-se que a riboflavina apresenta uma função no metabolismo da tiroxina e sua carência poderia contribuir com a patofisiologia de algumas doenças mentais (BAYNES, 1991; EMMERT; KIRCHNER, 1999; KEANEY; SIMON; FREDMAN, 1999).

Pesquisas na área de saúde pública relatam a importância da riboflavina como fator de proteção contra doenças cardiovasculares e processos tumorais. Trabalhos publicados durante as décadas de 70 e 80 indicaram que ela poderia apresentar efeitos protetores contra danos teciduais gerados por oxidação. Devido a sua não toxicidade, a riboflavina é um forte candidato como agente redutor do ferro presente no grupo heme de proteínas, atuando como protetor de danos oxidativos em determinados tecidos. No entanto, o potencial terapêutico desta vitamina neste contexto deve ainda ser amplamente investigado, já que a maioria dos estudos até o presente momento foi realizada em modelos animais (BAYNES, 1991).

Dentre vários estudos, o que merece destaque é de Strain e colaboradores (2004) que demonstrou uma redução da homocisteína plasmática com a administração de B<sub>2</sub>, reduzindo, assim, os riscos para doenças cardiovasculares. Isto, porque a riboflavina atua como um cofator da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHF redutase), que é responsável pela formação de 5-metiltetrahidrofolato que funciona como doador do radical metil no processo de remetilação da homocisteína (DIAS et al., 2001).

Embora existam evidências apontando para uma atuação benéfica da riboflavina, são necessários maiores estudos para uma determinação real do papel dessa vitamina no controle dos fatores de risco para o acidente vascular encefálico.

### 3.4 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 doenças cerebrovasculares por ser um modelo adequado para análise do papel da pressão arterial severa no desenvolvimento do AVE (OKAMOTO; YAMORI; NAGAOKA, 1974).

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 250 mmHg de pressão sistólica (CHALMERS; CHAPMAN, 2001), 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 (IKEDAK; YAMORI, 1999; LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003).

O SHR-sp apresenta grande incidência de AVE, tanto hemorrágico quanto isquêmico chegando a atingir 100% da causa de óbito nos machos (YAMORI et al., 1976).

Ogata e colaboradores (1981) relataram que o AVE nessa linhagem 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 e colaboradores (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.

Além disso, Yamagata e colaboradores (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. Especula-se, portanto, que a variabilidade genética entre as linhagens SHR-sp e WKY (Wistar Kyoto rat), em resposta ao dano do AVE isquêmico, pode ser um dos fatores que contribuem para a suscetibilidade a doença cerebrovascular, independente da hipertensão (IKEDAK; YAMORI, 1999).

As células cerebrais neuronais do SHR-sp apresentaram-se mais suscetíveis a hipóxia/reoxigenação sob condições de cultura (TAGAMI et al., 1997). 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 (CHALMERS; CHAPMAN, 2001).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados doze ratos machos SHR-sp obtidos da colônia do Biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, com onze semanas de idade, divididos em dois grupos (n=6), sendo um controle e outro tratado.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais (Figura 4) em biotério com temperatura controlada ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade controlada ( $60\pm 10\%$ ) e ciclo de luminosidade (claro/escuro 12 horas). Receberam apenas ração Nuvilab da Nuvital e água *ad libitum* durante 10 dias (período basal).

Os ensaios seguiram as normas convencionais para experimentos com animais (NIH Publicação nº 85-23,1996). O protocolo experimental usado neste estudo foi aprovado pela câmara de pesquisa da UNIRIO, e realizado no Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas da UNIRIO (LINDCD) seguindo protocolo de Vianna (2009).



Figura 4: Gaiola metabólica

### 4.2 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS GERAIS

Diariamente procedeu-se à avaliação dos parâmetros biológicos gerais através de determinações da ingestão de água e ração, peso corpóreo, diurese, excreção fecal e realizada ectoscopia que observa a distribuição e coloração de

pêlos; aspecto da pele e mucosas bem como o comportamento animal, postura e equilíbrio seguindo a metodologia de Vianna (2009).

A medição da pressão arterial sistólica foi realizada por pletismografia duas vezes na semana, em dias alternados, seguindo metodologia de Magaldi modificada por Vianna (1992), que consiste em colocar o animal numa caixa com temperatura controlada de aproximadamente 37°C, durante 10 minutos, para aquecer a cauda e, assim, facilitar a aferição da pressão arterial sistólica (Figura 5). Esse tempo e temperatura são os ideais para evitar alterações tensionais.

O animal, então, é colocado em um cilindro de contenção e sua cauda introduzida no pletismógrafo com água aquecida a 35°C (Figura 6). Em seguida, comprime-se a cauda dentro do aparelho com a finalidade de expulsar o máximo de sangue. Insufla-se o manguito a 240 mmHg (SHR-sp), aguarda-se a estabilização do líquido (aproximadamente 5 segundos) e afrouxa-se lentamente o manguito para permitir a passagem de sangue pela artéria previamente comprimida. Quando o sangue passa para o interior da cauda, aumenta o seu volume e o tubo indicador registra a subida da água, e procede-se a leitura da pressão sistólica. A média de três medidas é considerada a pressão sistólica.



Figura 5: Caixa de aquecimento

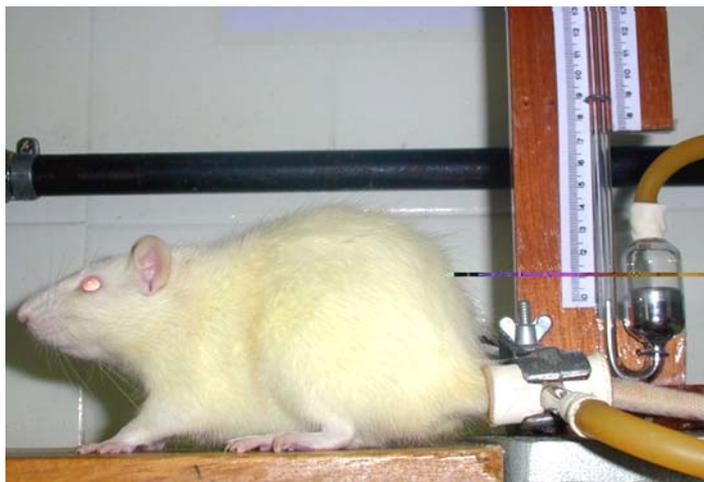


Figura 6: Plestimógrafo

#### 4.3 SUPLEMENTAÇÃO

No grupo tratado, após os 10 dias do período basal, iniciou-se a suplementação de riboflavina (R 4500 - Sigma®), por gavagem orogástrica (Figura 7) com duração de 4 semanas. A dose utilizada foi suprafisiológica de 10mg de riboflavina/ kg de peso, que foi considerada ótima na redução dos níveis pressóricos, em estudos prévios (VIANNA; FRANÇA, 2009). O grupo controle recebeu apenas o veículo (água).



Figura 7: Gavagem orogástrica

#### 4.4 PARÂMETROS NEUROLÓGICOS

Diariamente, tanto durante o período basal quanto nas 4 semanas de suplementação, os parâmetros neurológicos gerais foram avaliados seguindo metodologia descrita por Vianna (2009):

- 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). Frequentemente são observados sinais de ataxia nesse teste.
- Equilíbrio: o equilíbrio foi testado avaliando a deambulação do animal em estreita passarela inclinada à 45° e 75° (Figura 8). O animal é colocado numa passarela e observa-se a hesitação, ocorrência de queda, cambaleio.



Figura 8: Plano inclinado

- Teste de sensibilidade ao calor: O teste sensorio motor foi realizado medindo a sensibilidade do animal à dor em resposta à 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 ) (Figura9).



Figura 9: Termo-sensório-motor

- Cognição: Teste de labirinto. Caixa com dimensões 60x60cm, dividida em 6 compartimentos, apresentando percurso simples, com uma única zona de erro (um compartimento sem saída) (Figura 10). 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, 1992).

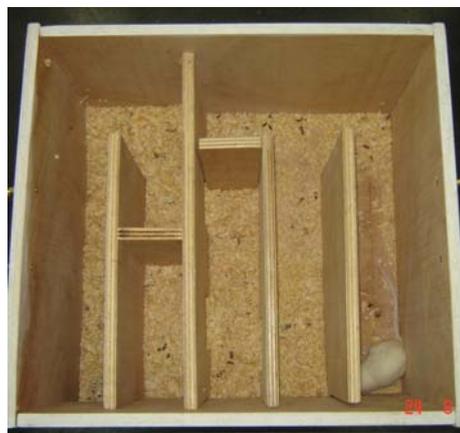


Figura 10: Labirinto

- Barra de equilíbrio (tempo de agarre das patas): a barra de equilíbrio consiste numa estrutura de madeira com 5 mm de diâmetro, cuja função era avaliar o tempo em que o animal conseguiria suportar seu próprio peso através da força da pata dianteira ao colocá-lo segurando na barra (Figura 11). O tempo em que os ratos levavam segurando a barra era cronometrado.



Figura 11: Barra de equilíbrio

- Viga de equilíbrio: esse teste avalia globalmente a função vestibulomotora e cerebelar do equilíbrio. Desta forma, o animal era colocado em uma estreita viga de madeira com dimensões 1,5 cm de largura e aproximadamente 1m de altura (Figura 12). De acordo com Fujimoto e colaboradores (2004), os animais com lesões cerebrais podem ser capazes de ficar na viga por mais de 60 segundos, mas podem assumir posturas que são diferentes de animais normais, como abraçar a viga ou se equilibrar com as patas dependuradas para se sustentar. Assim, foi estipulado o tempo de 60 segundos para que o animal permanecesse na viga. Se os animais conseguissem a marca estipulada era anotado o valor de 60 segundos, caso ele caísse antes do tempo delimitado, o valor de tempo correspondente era anotado.



Figura 12: Viga de equilíbrio

#### 4.5 TOXICIDADE

Os animais foram induzidos a um coma profundo, via éter sulfúrico inalatório, e administração de barbitúrico (tiopental sódico) via intraperitoneal com doses superiores a 25 mg/Kg. Em seguida, os animais eram fixados através das patas em posição dorsal para a realização de uma esterno-laparotomia com ampla abertura das cavidades torácica e abdominal permitindo a punção cardíaca, retirando-se, em média, 5 ml de sangue para dosagem de malondialdeído (MDA) e homocisteína (Hcy). Esse procedimento também permitiu a remoção do fígado para a medição de seu peso usando o método de Scherle (1970).

Este método consiste na aferição do deslocamento de líquido resultante da inserção de um órgão em solução salina fisiológica. Esse órgão estará suspenso por um fio em um Becker sem tocar as suas paredes e apoiado sobre uma balança analítica calibrada (0,001 g). Considerando-se que volume é igual ao peso/gravidade específica e que a gravidade da solução salina fisiológica é de 1,0048 g, considera-se, então, que peso é igual ao volume. Sendo os resultados expressos como o peso do órgão (g) / 100g de peso corporal do animal. Assim, com esse método pode-se observar se houve alguma modificação macroscópica nesse órgão como: hipertrofia ou atrofia.

#### 4.6 DOSAGEM DE HOMOCISTEÍNA (Hcy)

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, seguindo o método de Pfeiffer e colaboradores (1999). O sangue foi centrifugado em centrífuga CELM modelo Kombat (aferição e calibração Control-Lab), a 2000G 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, sendo realizado uma fase móvel composta de tampão ácido acético/acetato 0,1M (pH 5,5) com 30mL/L de metanol grau cromatográfico num fluxo de 0,7mL/min, a leitura por fluorescência nos comprimentos de onda 385 e 515nm.

#### 4.7 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 2000G 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, seguindo metodologia de Parthasarathy e colaboradores; 1985.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados utilizando o teste estatístico, programa GraphPad Prism® versão 4.0 para Windows®, para análise de variância ANOVA *two-way*, sendo considerado significativo  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADO

### 5.1 PARÂMETROS BIOLÓGICOS GERAIS

A suplementação suprafisiológica de B<sub>2</sub>, não alterou os parâmetros biológicos gerais e o exame físico aliado à avaliação macroscópica do fígado (Tabela 1) confirmou a ausência de toxicidade da riboflavina, sob doses suprafisiológicas.

Tabela 1: Representa a média  $\pm$  DP do peso corporal, diurese e ingestão de água, ração e peso hepático (g) / 100g de peso corporal, de ratos SHR-sp tratados (n=6) com riboflavina (10mg/Kg de peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6)

Parâmetros Biológicos	Controle	Tratado
Peso Corpóreo (g)	226,45 $\pm$ 19,6	233,68 $\pm$ 15,2
Diurese (ml)	3,34 $\pm$ 1,12	3,28 $\pm$ 1,27
Ingestão de ração (g)	19,26 $\pm$ 2,52	21,70 $\pm$ 3,53
Ingestão Hídrica (ml)	29,90 $\pm$ 1,37	30,51 $\pm$ 2,12
Peso hepático (g/100g)	3,37 $\pm$ 0,29	3,72 $\pm$ 0,24

### 5.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A pressão arterial sistólica apresentou uma significativa redução ( $p < 0.05$ ) que variou em média de 16 a 20 mmHg com a dose de 10 mg B<sub>2</sub> / kg. Os ratos do grupo controle apresentaram pressão arterial sistólica mantida em 228, 76  $\pm$  3,52 mmHg e os do grupo tratado variaram de 225, 1  $\pm$  8,0 mmHg (período basal) para 194,1  $\pm$  0,3 mmHg, até o final do tratamento (Gráfico 1).

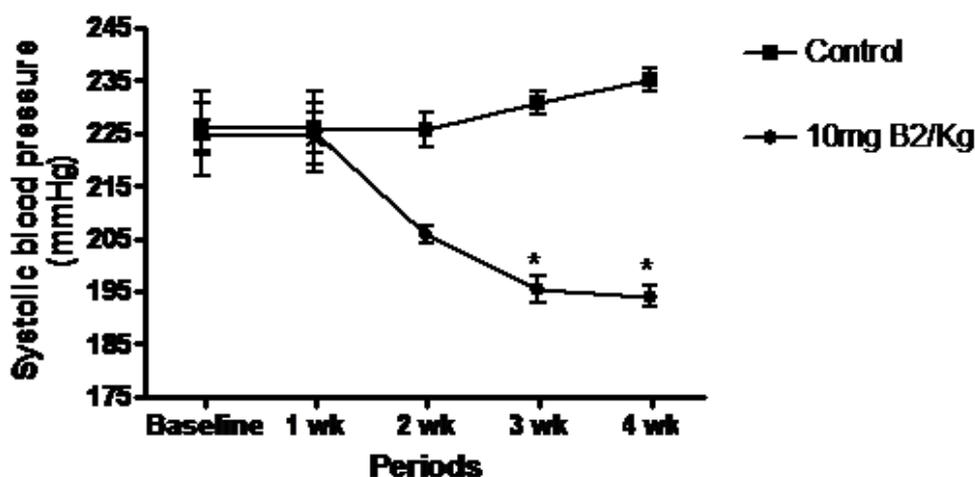


Gráfico 1: Efeitos da suplementação de riboflavina sobre a pressão arterial sistólica em ratos SHR-sp. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais (controle) 12 animais (tratados) . \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle

### 5.3 PARÂMETROS NEUROLÓGICOS

Não foram observadas mudanças no comportamento dos animais na análise dos resultados dos testes neurológicos, sendo mantida sua docilidade.

Em relação ao teste da locomoção, foi observada uma alteração na marcha em apenas dos 2 dos 6 ratos do grupo controle na segunda semana do experimento, ou seja, um sinal de ataxia, comum nessa linhagem (SHR-sp) a partir de 14ª semana. Já no grupo suplementado com riboflavina, esse sinal não foi encontrado até o final do experimento.

Na avaliação dos testes da barra de equilíbrio, viga de equilíbrio e plano inclinado, não foram encontrados diferenças entre o grupo tratado e o controle; e todos os animais alcançaram o tempo mínimo pré-determinado para sua execução; e apresentaram equilíbrio e força necessários para completar o teste (Tabela 2).

Entretanto, no teste do labirinto e sensório-motor, foi observada uma queda gradual no tempo de resposta dos ratos tratados, quando comparados com os ratos do grupo controle, com significância estatística entre grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Representa a média  $\pm$  DP dos testes neurológicos dos ratos SHR-sp tratados (n=6) com riboflavina (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6)

Testes Grupos	Memória	Barra de Equilíbrio	Viga de Equilíbrio	Sensório-Motor
Controle	38"81 $\pm$ 09"36	22"97 $\pm$ 04"27	1'00"00 $\pm$ 0'00"00	3'26"31 $\pm$ 0'00"05
Tratado	16"25 $\pm$ 04"51	20"84 $\pm$ 01"48	1'00"00 $\pm$ 0'00"00	1'38"29 $\pm$ 0'00"08

#### 5.4 DOSAGEM DE HOMOCISTEÍNA (Hcy) e DIALDEÍDO MALÔNICO (MDA)

No que se refere ao estresse oxidativo, as dosagens da homocisteína e dialdeído malônico apresentaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) no grupo tratado quando comparado com grupo o controle (Tabela 3).

Tabela 3: Representa a média  $\pm$  DP das dosagens de homocisteína (Hcy) e de dialdeído malônico (MDA) dos ratos SHR-sp tratados (n=6) com riboflavina (10mg/Kg/peso corpóreo) comparados aos ratos controle (n=6)

Marcadores Grupos	Hcy	MDA
Controle	16,21 $\pm$ 0,63	5.87 $\pm$ 0,38
Tratado	14,45 $\pm$ 0,35	4,05 $\pm$ 0,68

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou uma influência significativa do uso de vitaminas antioxidantes sobre o processo de longevidade e melhor qualidade de vida desses animais, particularmente sensíveis ao estresse oxidativo. Esta experiência demonstrou claramente uma redução dos níveis de pressão arterial entre 16 e 20 mmHg, em comparação ao grupo controle, e não observou-se sinais de ataque isquêmico transitório, como ataxia e convulsões, até ao final do experimento.

Em França e Vianna (2010), o tratamento com riboflavina também foi capaz de induzir a redução da pressão arterial sistólica em ratos jovens (8 semanas) e em ratos adultos (18 semanas). No entanto, ratos adultos foram mais resistentes à suplementação, alcançando uma redução da pressão arterial sistólica de 6 mmHg versus 17 mmHg apresentados pelos ratos mais jovens. Este tipo de resposta menor por ratos mais velhos pode estar associado à evidência de que a eficiência de um sistema antioxidante diminui durante o envelhecimento (JONES et al., 2002).

O papel fisiológico da riboflavina poderia, provavelmente, ser atribuído à sua estrutura química: presença de anel ribitol (Figura 2) (DE COLIBUS; MATTEVI, 2006). A redução desse anel (FAD, FMN forma oxidada) produz as formas reduzidas de flavoproteínas (FMNH<sub>2</sub> e FADH<sub>2</sub>) (GROPPER; SMITH; GROFF, 2009). Essa configuração química permite esta vitamina ter alta afinidade para reagir com vários substratos, principalmente o oxigênio molecular (MASSEY, 1994; MATTEVI, 2006). A flavina, até mesmo ionizada ou reduzida, tem diferentes propriedades químicas que podem ser ajustadas de acordo com as proteínas do meio (como ligadoras de hidrogênio ou interações hidrofóbicas) (DE COLIBUS; MATTEVI, 2006).

Outro ponto, é que a riboflavina em sua forma de FMN e FAD tem função como coenzimas para uma ampla variedade de enzimas oxidativas e pode permanecer ligada à enzimas durante as reações de oxidação-redução (redox) (BOEHNKE; REUTER; FLACH et al., 2004). Com isso, as flavoproteínas exibem uma gama de potenciais redox e, portanto, podem desempenhar uma variedade de papéis no metabolismo intermediário, como: descarboxilação do piruvato e  $\alpha$ -cetoglutarato, que requer FAD; desempenhar papéis muito importantes na cadeia de transporte de elétrons; redução da forma de glutathiona oxidada (GSSG) em sua forma reduzida (GSH) que é, também, dependente da FAD; ser necessária para a

Acil-CoA desidrogenase que requer FAD para a oxidação dos ácidos graxos livres (BOEHNKE; REUTER; FLACH et al., 2004).

Nesse estudo, observa-se uma tendência à redução dos sinais isquêmicos associados à lesão neurológica, pois os ratos do grupo tratado atingiram 16 semanas de idade, no final do experimento, sem apresentar nenhum sinal de lesão neurológica, fato que não ocorreu no grupo controle, onde 2 ratos apresentaram ataques isquêmicos transitórios, caracterizado por ataxia e convulsões. De acordo com Pawlar, Pawlaw e Mysliwiec, (2005) esses sinais são esperados nessa linhagem, SHR-sp, em torno da 16<sup>a</sup> a 18<sup>a</sup> semana, por isso essas suplementação sugerem uma importante ação neuroprotetora. Outro ponto importante que corrobora com os efeitos destas vitaminas na redução dos radicais livres, são os marcadores de estresse oxidativo: homocisteína e malondialdeído, que foram fortemente reduzidos com a suplementação de vitamina B<sub>2</sub>.

Esse efeito é muito importante, pois a homocisteína está diretamente associada ao desenvolvimento de acidente vascular cerebral (BRATTSTRÖM; HARDEBO; HULTBERG, 1984; ZEMPLIENI et al., 1996; MCCULLY, 1996; SOUZA et al., 2005). É possível que os efeitos adicionais da homocisteína possam envolver uma ação mais direta sobre o cérebro que poderia aumentar o dano neuronal em curso. Em apoio a essa hipótese, a homocisteína poderia induzir a neurotoxicidade direta pela ativação do N-metil-D-aspartato (NMDA), subtipo do receptor de glutamato (BOSTOM; ROSENBERG; SILBERSHATZ, 1999). Dano neuronal na sequência de um acidente vascular cerebral foi atribuído ao excesso de estimulação dos aminoácidos excitatórios como o glutamato e aspartato, através da ativação dos receptores NMDA (KANG S-S; WONG; MALINOW, 1992).

O dano de biomoléculas se não for reparado, em última análise, pode comprometer o funcionamento da célula e levá-la até a morte por apoptose ou necrose, e desencadear processos de neurodegeneração (CLARKE; DALY; ROBINSON, 1991). Este aspecto é reforçado pelo fato de que os neurônios são altamente propensos a situações de estresse oxidativo. De uma forma geral, substâncias com propriedades antioxidantes atuam através de reação direta com radicais livres, promovendo a regeneração de outros antioxidantes ou controlando a formação de espécies reativas de oxigênio.

Neste contexto, a investigação da ocorrência de estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) é fundamental para compreender como espécies

oxidantes contribuem para a patologia de doenças neurodegenerativas. Em relação a isso, Vianna, Fiorelli e Oliveira (2006) salientaram que o cérebro é alto consumidor de oxigênio, mas é deficitário quanto ao sistema antioxidante tornando-o bastante sensível ao estresse oxidativo. Portanto, a redução dos níveis sanguíneos de MDA e Hcy aqui apresentados, provavelmente, contribuiu para a inibição de eventos isquêmicos nos animais SHR-sp suplementados.

A análise dos testes neurológicos revelou que os animais tratados não apresentaram sinais de isquemia ou injúria neurológica, uma vez que a resposta ao teste sensorio-motor foi mais rápida nesses animais, em torno de 1 minuto versus 2 a 4 minutos nos animais neurologicamente comprometidos (CARSTENS et al., 1993). Acrescenta-se, também, o fato de que a cognição foi significativamente melhorada pela suplementação de riboflavina o que associamos à redução da homocisteína sérica. Em relação a isso, Troen e Rosenberg (2005), demonstraram que a elevação da homocisteína está relacionada com o declínio da função cognitiva além de promover uma atrofia cerebral.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados identificaram ações da riboflavina, tais como hipotensora, neuroprotetora e uma redução nos marcadores de estresse oxidativo (homocisteína e dialdeído malônico). Adicionalmente, a vitamina B<sub>2</sub> preservou os aspectos físicos e cognitivos dos animais tratados, assim como, provavelmente, preservou-os dos ataques isquêmicos associados à lesão neurológica.

Além disso, a suplementação dessa vitamina em doses suprafisiológicas não representou risco de toxicidade ou sinais de interação de nutrientes.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. D.; VICTOR, M. Doenças cerebrovasculares. **McGraw-Hill.**, v. 34, p.481-6, 1996.

AMES, B.N; SHIGENAGA, M.K; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 90(17), p.7915-22, 1993.

ARNESEN, E; REFSUM, H; BONAA, K.H; UELAND, P.M; FORDE, O.H; NORDREHAUG, J.E. Serum total homocysteine and coronary heart disease. **Int J Epidemiol.**, v. 24, p.704-709, 1995.

ARRIBAS, S.M; GORDON, J.F; DALY, C.J, DOMINICZAK, A.F., MCGRATH, J.C. Confocal microscopic characterization of a lesion in a cerebral vessel of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Stroke.**, v. 27, p.1118-1123, 1996.

ASSIS, T.R; VIANA, F.P, RASSI, S. Study on the major maternal risk factors in hypertensive syndromes. **Arq Bras Cardiol.**, v. 91, nº1, p. 11-7, 2008.

OLIVEIRA, G.S.; FIGUEIREDO, A.S.P; SANTOS, R.S.; VIANNA, L.M. Efeito da suplementação de beta-caroteno em ratos hipertensos. **Rev. Nutrição.**, v. 20, p. 39-45, 2007.

BARBE, F; ABDELMOUTTALEB, I; CHANGO, A; GERARD, P; QUILLIOT, D; KLEIN, M. Detection of moderate hyperhomocysteinemia: comparison of the Abbott fluorescence polarization immunoassay with the Bio-Rad and SBD-F high-performance liquid chromatographic assays. **Amino Acids.**, v.4, p. 435-40, 2001.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. **Diabetes.**, v. 40, p.405-12, 1991.

BOEHNKE, C; REUTER, U; FLACH, U. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre. **European Journal of Neurology.**, v. 11, nº 7, p. 475-7, 2004.

BOERS, G.H; SMALS, A.G; TRIJBELS, F.J. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. **NEJM.**, v. 313, p. 709-15, 1985.

BORGES, A.C; FERES, T; VIANNA, L.M; PAIVA, T.B. Cholecalciferol treatment restores the relaxant responses of spontaneously hypertensive rat arteries to bradykinin. **Pathophysiology.**, v.8, n<sup>o</sup>.4, p.263-268, 2002.

BORGES, A.C; FERES, T; VIANNA, L.M; PAIVA, T.B. Effect of cholecalciferol treatment on the relaxant responses of spontaneously hypertensive rat arteries to acetylcholine. **Hypertension.**, v.34, n<sup>o</sup>.4, p. 897-901, 1999.

BOSTOM, A.G; ROSENBERG, I.H; SILBERSHATZ, H. Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. **Ann Intern Med.**, v. 131, p. 352-355, 1999.

BRATTSTRÖM, L.E; HARDEBO, J.E; HULTBERG, B.L. Moderate hyperhomocysteinemia: a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. **Stroke.**, v. 15, p.1012-1016, 1984.

BROUWER, I.A; DUSSELDORP, M. VAN; WEST, C.E.S. Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. **IHJ.**, v. 7, p.S56-S58, 2000.

CARSON, N.A.J; NEIL, D.W. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. **Arch Dis Child.**, v. 37, p.505-13, 1962.

CARSTENS, E; WILSON, C. Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine and habituation. **J Neurophysiol.**, v. 70, p. 630-639, 1993.

CHALMERS, J; CHAPMAN, N. Progress in reducing the burden of stroke. **Clin Exper Pharmacol Physiol.**, v. 28, p.1091–1095, 2001.

CHEN, Z.; BONERJEE, R. Purification of soluble cytochrome B5 as a component of the reductive activation of porcine methionine synthase. **J Biol Chem.**, v. 273, p. 26248-55, 1998.

CHRISTENSEN, B; UELAND, P.M. Methionine synthase inactivation by nitrous oxide during methionine loading of normal human fibroblasts. Homocysteine remethylation as determinant of enzyme inactivation and homocysteine export. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 3, n<sup>o</sup> 267, p. 1298-303, 1993.

CHRISTENSEN, B ; REFSUM, H. Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine loading in non-transformed, transformed, proliferating and quiescent cells in culture. **J Cell Physiol.**, v. 1, p. 52-62, 1991.

CLARKE, R; DALY, L; ROBINSON, K. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. **J Med.**, v. 324, p. 1149-1155, 1991.

COOPER, A. J. L. Biochemistry of sulfur containing amino acids. **Annu Rev Biochem.**, v. 52, p. 187-222, 1983.

COPPOLA, A; DAVI, G; DE STEFANO, V; MANCINI, F.P; CERBONE, A.M; DI MINNO G. Homocysteine, coagulation, platelet function, and thrombosis. **Semin Thromb Hemost.**, v. 26, n° 3, p. 243-54, 2000.

COSENTINO, F; LÜSCHER, T.F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 3, p. S54-S61, 1998.

COSTA, V.A.V; VIANNA, L.M; AGUILA, M.B; MANDARIM, C.A. Alpha-tocopherol supplementation on favorable effects on blood pressure blood viscosity and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry.**, v.16, n° 4, p. 251-256, 2005.

CUTLER, R.G. Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging. **Arch Gerontol Geriatr.**; v.12, n° 2, p.75-98, 1991.

DE COLIBUS, L; MATTEVI, A. New frontiers in structural flavoenzymology. **Curr Opin Struct Biol.**, v. 16, p. 722-728, 2006.

DIAS, P.M.T; MEZZOMO, A; PETEFFI, C; PEZZI,D,R. Homocisteína: Um fator de risco vascular. **Rev. Cient. AMECS.**, v.10, n° 1, p. 53-58, 2001.

DOMAGALA, T.B; UNDA, A; LIBURA, M; SZCZEKLIK, A. Pathogenesis of vascular disease in hyperhomocysteinemia. **J Cardiovasc Risk.**, v. 5, n° 4, p. 239-47, 1998.

DURAND, P; PROST, M; LOREAU, N; LUSSIER-CACAN, S; BLACHE, D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. **Lab Invest.**, v. 81, n° 5, p. 645-72, 2001.

DUVALL, W.L. Endothelial dysfunction and antioxidants. **Mt Sinai Méd.**, v. 2, n<sup>o</sup> 72, p. 71-80, 2005.

EBERHARDT, R.T; FORGIONE, M.A; CAP, A; LEOPOLD, J.A; RUDD, M.A; TROLLIET, M. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. **J Clin Invest.**, v. 4, p. 483-91,2000.

EMMERT, D.H; KIRCHNER, J.T. The role of vitamin E in the prevention of heart disease. **Arch Farm Med.**, v. 8, p. 537-542, 1999.

FRANÇA, C.F & VIANNA, L.M. Effectiveness of B vitamins on the control of hypertension and stroke events of SHRSP rats. **Journal of Dietary Supplements.**, 2010. *in press*

FUJIMOTO, S.T; LONGHI, L.; SAATMAN, K.E. Motor and function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.**, v. 28, p. 365-378, 2004.

GROPPE, R S.S; SMITH, J.L; GROFF, J.L. Riboflavin, Chapter 9, in *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, 5th ed. Wadsworth CENGAG Learning, 2009, P329-333

HARPEL, P.C; ZHANG, X; BORTH, W. Homocysteine and hemostasis: pathogenetic mechanisms predisposing to thrombosis. **J Nutr.**, v. 126, n<sup>o</sup>. 4, p.1285S-9S, 1996.

HIRANO, K; OGIHARA, T; MIKI, M. Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. **Free Radic Res.**, v. 5, p. 267-76, 1994.

IKEDAK; YAMORI, Y. Gene related to stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 26, p. 566-67, 1999.

JACQUES, P.F; BOSTOM, A.G; WILSON, P.W.F; RICH, S; ROSENBERG, I.H; SELHUB, J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. **Am J Clin Nutr.**, v. 73, n<sup>o</sup>. 3, p. 613-21, 2001.

JONES, D.P; MODY, V.C; CARLSON, J.L; LYNN, M.F; STEMBERG, P. Redox analysis of human plasm allows separation of pro oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radic Biol. Med.**, v. 33, p. 1290-1300, 2002.

KANG, S-S, WONG, P.W; MALINOW, M.R. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Annu Rev Nutr.**, v. 12, p. 279-298, 1992.

KEANEY, J.F; SIMON, D.I; FREEDMAN, J.E. Vitamin E and vascular homeostasis: implication for atherosclerosis. **FASEB.**, v. 13, p. 965-975, 1999.

KRISTENSEN, B; MALM, J; CARLBERG, B. Epidemiology and etiology aged 18 to44 years in Northern Sweden. **Stroke.**, v. 28, p. 1702-1709, 1997.

KEANEY,J.F; SIMON, D.I; FREEDMAN, J.E. Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. **FASEB J.**, v.13, nº9, p. 965-75, 1999.

LAURICELLA, A.M; QUINTANA, I.L; KORDICH, L.C. Effects of homocysteine thiol group on fibrin networks: another possible mechanism of harm. **Thromb Res.**, v. 107, nº. 1-2, p. 75-79, 2002.

LAWRENCE, E.S; COSHALL, C; DUNDAS, R. Estimates of the prevalence of acute stroke impairments and disability in a multiethnic population **Stroke.**, v. 32, p.1279-84, 2001.

LENO, C; BERCIANO, J; COMBARROS, O. A prospective study of stroke in young adults in Cantabria, Spain. **Stroke.**, v. 24, p. 792-795, 1993.

LENTZ, S.R. Mini-review: Homocysteine and vascular dysfunction. **Life Sci.**, v. 61, nº 13, p. 1205, 1997.

LEONCINI, G; PASCALE, R; SIGNORELLO, M.G. Effects of homocysteine on L-arginine transport and nitric oxide formation in human platelets. **Eur J Clin Invest.**, v. 33, nº. 8, p. 713-9, 2003.

LO, E; DALKARA, T; MOSKOWITZ, M. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature Rev.**, v. 4, p. 399–415, 2003.

LOSCALZO, J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. **J Clin Invest.**, v. 1, p. 5-7, 1996.

MASSEY, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. **Biochem Soc Trans.**, v. 28, p.283-296, 2000.

MATTEVI, A. To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes, **Trends Biochem Sci.**, v. 31, p. 276–283, 2006.

MCCULLY, K.S. Homocysteine and vascular disease. **Nat Med.**, v. 4, p. 386-9, 1996.  
MIZURINNI, D; VIANNA, L.M; VANDENBOER, H; SILVA, F.L. Toxidade da piridoxina observada em ratos SHR idosos. **Rev. Científica UBM.**, v.3, nº.6, p. 34-39, 2002.

NENCINI, P; INZITARI, D; BARUFFI, M.C. Incidence of stroke in young adults in Florence, Italy. **Stroke.**, v. 19, p. 977-981, 1988.

ODDERSON, I.R; KEATON, J.C; MCKENNA, B.S. Swallow management in patients on an acute stroke pathway: quality is cost effective. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 76, p.1130-3, 1995.

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.**, v. 54, p. 183-188, 1981.

OKAMOTO, K; YAMORI, Y; NAGAOKA, A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Circ Res.**, v. 33/34, p. 1143-1153, 1974.

PARTHASARATHY, S; STEINBRECHER, U.P; BARNETT, J; WITZTUN, J; STEINBERG, D. Essential role of phospholipase A2 activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. **Proceeding National Academy Science USA, Washington.**; v.82 (9), p. 3000-3004, 1985.

PAWLAR, K; PAWLAW, D; MYSLIWIEEC, M. Method of dialysis therapy and selected markers of oxidative stress and endothelial injury in patients with chronic renal failure. **Pol Arch Med Wewn.**, v. 1, p. 21, 2005.

PEREZ, S.C; VIANNA, L.M. Favorable effects of pyridoxine and folic acid SUPPLEMENTATION OF SRH-SP. **ANN. NEUROCIEN.**, v. 10, N°3, P. 146-149, 2005.

PERRY,I.J; REFSUM, H; MORRIS, R.W; EBRAHIM, S.B; UELAND, P.M; SHAPER, A.G. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British man. **Lancet.**, v. 346, p.1395-1398, 1995.

ROTH, E.J; HARVEY, R.L. Rehabilitation of stroke syndromes. In: Braddom RL, ed. *Physical medicine & rehabilitation*. PA: Saunders 2000:1117-60.

SACCO, R.L; HAUSER, W.A; MOHR, J.P. Hospitalized stroke in Blacks and Hispanics in Northern Manhattan. **Stroke.**, v. 22, p. 1491-1496, 1991.

SAW, S.M; YUAN, J.M; ONG, C.N; ARAKAWA, K; LEE, H.P; COETZEE, G.A. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. **Am J Clin Nutr.**, v. 73, nº2, p. 232-9, 2001.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie.**, v. 26, p. 57-60, 1970.

SINATRA, S.T; DEMARCO, J. Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL) and the heart: antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. **Conn Méd.**, v. 10, p. 579-88, 1995.

SIQUEIRA, J.I NETO; SANTOS, A.C; FÁBIO, S.R; SAKAMOTO, A.C. Vasculopatia cerebral na síndrome do anticorpo antifosfolípide primária. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 54, p. 661-664, 1996.

SOUZA, A.C.S; FERREIRA, C.V; JUCÁ, M.B; AOYAMA, H; CAVAGIS, A.D.M; PEPPELENBOSCH, M.P. Riboflavin: a multifunctional vitamin. **Química Nova.**, v.8, nº.5; p. 54-9, 2005.

STAMLER, J.S; OSBORNE, J.A; JARAKI, O; RABBANI, L.E; MULLINS, M; SINGEL, D. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. **J Clin Invest.**, v. 91, nº1, p. 308-18, 1993.

STAMPFER, M.J; MALINOW, R; WILLETT, W.C. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. **JAMA.**, v. 268, p. 877-881, 1992.

STRAIN, J.J; DOWEY, L; WARD, M; PENTIEVA, K; MCNULTY, H. B-vitamins, homocysteine metabolism and CVD. **Proc Nutr Soc.**, v. 63, p. 597-603, 2004.

SYDOW, K; BOGER, R.H. Homocysteine, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: pathomechanisms and therapeutic options. **Z Kardiol.**, v. 90, nº 1, p. 1-11, 2001.

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.**, v. 78, p.1415-1429, 1998.

UPCHURCH, G.R JR; WELCH, G.N; FABIAN, A.J; FREEDMAN, J.E; JOHNSON, J.L; KEANEY, J.F. JR. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. **J Biol Chem.**, v. 272, nº 27, p. 17012-7, 1997.

VIANNA, L.M & FRANÇA, C.F. Efeito da Suplementação de Riboflavina na Modulação da Pressão Arterial em Ratos Normotensos. **MN metabólica.**, v.10, nº4, p. 172-176 , 2009.

VIANNA, L.M & FRANÇA, C.F. The response of young and adult rats to the riboflavin supplementation. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, 2010. *in press*

VIANNA, L.M. Efeito de administração crônica de vitamina D3 em ratos espontaneamente hipertensos. Tese de doutorado apresentado à Escola Paulista de Medicina. *Index. Em Lilacs:* p.107, 1992.

VIANNA, L.M. Manual de Fisiologia Experimental. Yendis Editora, 2009.

WEISS, N; KELLER, C; HOFFMANN, U; LOSCALZO, J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. **Vasc Med.**, v. 7, nº 3, p. 227-39, 2000.

WELCH, G.N; LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. **N Engl J Med.**, v. 338, nº 15, p. 1042-50, 1998.

WELCH, G.N, UPCHURCH, J.R, LOSCALZO, J. Hyperhomocyst(e)inemia and atherothrombosis. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 811, p. 48-58, 1997.

YAMAGATA, K; TAGAMI, M; NARA, Y. Faulty induction of blood-brain barrier functions by astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 24, p. 686-91, 1997.

YAMORI, Y; HORIE, R; HANDA, H; SATO, M; FUKASE, M. Pathogenic similarity of strokes in stroke prone spontaneously hypertensive rats and humans. **Stroke.**, v. 7, p. 46-53, 1976.

ZEMPLINI, J; GALLOWAY, J.R; MCCORMICK, D.B. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans. **Am J Clin Nutr.**, v. 63, nº 1, p. 54–66, 2006.

# 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](#)