



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HOMOCISTEINILAÇÃO DE PROTEÍNAS NA ATHEROSCLEROSE

Trabalho submetido por
Luís Miguel Lucas Glória
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HOMOCISTEINILAÇÃO DE PROTEÍNAS NA ATHEROSCLEROSE

Trabalho submetido por
Luís Miguel Lucas Glória
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida

e coorientado por
Mestre José Feliz

novembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar aos meus orientadores, ao Mestre José Feliz e à Prof.^a Doutora M^a Gabriela Almeida pela orientação que me foi dada. Por parte da Prof.^a uma orientação mais científica, e por parte do Prof. uma orientação mais clínica, sendo que os dois, de igual forma, foram fundamentais para o resultado final da presente monografia de final de curso. São os dois, uns excelentes profissionais e umas excelentes pessoas. Obrigado por toda a disponibilidade demonstrada e por todo o apoio.

Não menos importante, também quero agradecer aos meus pais, por terem acreditado e investindo em mim, sem eles nada disto poderia ter sido possível. Obrigado por serem quem são, e pela educação humilde que me transmitiram. Um muito obrigado, também, ao meu irmão. Amo-vos do fundo, do fundo do coração!

Agradeço às minhas primas, Helena e Rita, o apoio incondicional e as vivências de infância e adolescência, que contribuíram para a minha entrada no ensino superior. Às minhas avós, a energia positiva e a confiança que me transmitiram ao longo da vida. Às minhas tias, M^a Luísa, M^a Amélia, o apoio emocional que me deram, principalmente nas piores fases da vida. À prima Tânia pela sua disponibilidade em ajudar-me.

Aos meus amigos por todo o apoio e incentivo que me deram, para continuar a lutar pelos meus objetivos. Sem vocês, concluir este curso seria, inúmeras vezes, mais difícil, se não impossível, porque todos necessitam de amigos como vocês. Também vos amo! Peço desculpa, pelos momentos em que estive ausente, para concluir esta obra.

Por fim, quero agradecer a todos os docentes que transmitiram os seus conhecimentos, e a todas as pessoas que passaram pela minha vida, que de uma maneira ou de outra, positiva ou negativa, contribuíram sem dúvida para o meu desenvolvimento, como ser humano.

RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares (DCV) associadas à aterosclerose são a principal causa de morte e de morbidade a nível mundial. Por este motivo, é necessário antever o aparecimento da aterosclerose e agir em conformidade. Apesar de serem conhecidos vários fatores de risco capazes de avaliar a probabilidade de um indivíduo desenvolver DCV, nem todos os episódios ocorridos envolvem os principais fatores de risco. Na presente monografia, pretendeu-se correlacionar a hiper-homocisteinemia, e mais precisamente, a homocisteinilação de proteínas, com a génese da aterosclerose. Com efeito, a hiper-homocisteinemia é aceite como um fator de risco emergente para a aterosclerose. No entanto, segundo os resultados obtidos em ensaios clínicos, a redução da concentração plasmática de homocisteína total (tHcy), através da suplementação vitamínica do complexo B, não reduz o risco de ocorrer eventos vasculares, comprometendo o nexo de causalidade entre a tHcy e a aterosclerose. No entanto, estes estudos não consideram os diferentes metabolitos da homocisteína. Por conseguinte, a envolvência destas espécies na aterogénese deverá ser devidamente clarificada no futuro próximo.

Estudos recentes mostraram que a homocisteinilação de proteínas acelera a progressão da aterotrombose. Em particular, a capacidade da homocisteína provocar a *S*-homocisteinilação direta, ou a *N*-homocisteinilação indireta de proteínas, leva à perda das funções das mesmas. Torna-se assim imprescindível um conhecimento mais detalhado da própria aterogénese e do envolvimento de todas as entidades, de forma a permitir a identificação de biomarcadores mais efetivos e de novos alvos terapêuticos.

Palavras-chaves: Aterosclerose; Homocisteína; Homocisteína-tiolactona; Homocisteinilação de proteínas

ABSTRACT

According to the World Health Organization, cardiovascular diseases (CVD) associated with atherosclerosis are the leading cause of death and morbidity worldwide. For this reason, one should predict the onset of atherosclerosis and act accordingly, on time. Although several risk factors capable of assessing the probability of an individual developing CVD are known, not all cases reported involved major risk factors. In this monography, we aim to stablish a correlation between hyperhomocysteinemia, more precisely protein homocysteinylation, and the genesis of atherosclerosis. In fact, hyperhomocysteinemia is accepted as an emergent risk factor for atherosclerosis. However, according to the results obtained in clinical trials, the reduction of total plasma homocysteine concentration (tHcy) through the supplementation of vitamin B complex did not reduce the risk of vascular events, compromising the causal link between tHcy and atherosclerosis. Though, these studies did not consider the different metabolites of homocysteine. Therefore, the involvement of these species in atherogenesis should be duly clarified in the future.

Recents studies have shown that the homocysteinylation of proteins accelerates the progression of atherothrombosis. In particular, the ability of homocysteine to cause direct *S*-homocysteinylation or indirect *N*-homocysteinylation of proteins, leads to the loss of their functions. This is why it is extremily important to get a more detailed knowledge on atherogenesis and the involvement of all species, so one may identify more effective biomarkers and new therapeutic targets.

Keywords: Atherosclerosis; Homocysteine; Homocysteine thiolactone; Protein Homocysteinylation

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. ATEROSCLEROSE	17
2.1. Fisiopatologia.....	17
2.2. Fatores de Risco.....	23
2.2.1. Hiper-homocisteinemia.	24
3. BIOQUÍMICA DA HOMOCISTEÍNA	29
3.1. Homocisteína	29
3.1.1. Considerações Gerais.	29
3.1.2. Efeitos Tóxicos da Hcy.	29
3.1.3. Metabolismo da Hcy.....	32
3.2. Homocisteína-Tiolactona.....	33
3.2.1. Metabolismo da HTL.	35
3.2.2. N-Homocisteinilação de Proteínas.	35
4. EFEITOS ATEROGÊNICOS INDUZIDOS PELA HOMOCISTEINILAÇÃO DE PROTEÍNAS	41
4.1. N-Homocisteinilação de Proteínas.....	41
4.1.1. Intracelulares.	41
4.1.1.1. <i>Stress do Retículo Endoplasmático.</i>	41
4.1.2. Extracelulares.	42
4.1.2.1. <i>Apo-LDL.</i>	42
4.1.2.2. <i>ApoA1-HDL.</i>	42
4.1.2.3. <i>Albumina.</i>	43
4.1.2.4. <i>Fibrinogénio.</i>	44
4.1.2.5. <i>Colagénio.</i>	44

4.1.2.6.	<i>Enzima Conversor da Angiotensina I</i>	45
4.1.3.	Sistema Imunitário.....	46
4.1.3.1.	<i>Resposta Adaptativa</i>	46
4.1.3.2.	<i>Resposta Inata</i>	46
4.2.	S-Homocisteinilação de Proteínas	47
4.2.1.	Extracelulares.	47
4.2.1.1.	<i>Apo-LDL</i>	48
4.2.1.2.	<i>Albumina</i>	48
4.2.2.	Intracelulares.	49
4.2.2.1.	<i>Metalotioneína</i>	49
4.2.2.2.	<i>Peroxirredoxina</i>	50
4.3.	Expressão Génica das Células Endoteliais	51
5.	CONCLUSÃO	53
6.	BIBLIOGRAFIA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estádios histopatológicos da aterosclerose.	22
Figura 2 – Evolução esquemática da placa de ateroma.	23
Figura 3 – Formas de Hcy existentes no plasma. Adaptado de (Nygård et al., 1999). ..	26
Figura 4 - Estrutura química da Hcy. Apresenta uma cadeia lateral semelhante à Cys, já que possui, em comparação com esta, um grupo metilo adicional.....	29
Figura 5 - Representação esquemática das modificações proteicas induzidas pela Hcy, através da S-homocisteinilação.	31
Figura 6 – Metabolismo da Hcy e da HTL. Adaptado de (Jakubowski, 2004; Lewandowski, 2000).	34
Figura 7 - HTL nas suas formas ácido-base. Retirado de (Jakubowski, 2006a)	35
Figura 8 – Representação esquemática das modificações proteicas induzidas pela HTL, através da N-homocisteinilação (Sharma et al., 2015).	37
Figura 9 – Mecanismo químico proposto por Mei et al. (2016), para a “deshomocisteinilação” de resíduos de Lys de proteínas N-homocisteiniladas:.....	38
Figura 10 - Representação do efeito da N-homocisteinilação na reticulação de piridinolina do colagénio. Retirado de (Perła-Kajan et al., 2016).....	45
Figura 11 - A homocisteinilação da metalotioneína (MT) em células endoteliais vasculares humanas compromete o potencial redox intracelular e aumenta a expressão de early growth response-1 (Egr-1).	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Substâncias sintetizadas pelas células endoteliais e a sua respetiva função vasoativa..... 19

Tabela 2 - Fatores de risco maiores tradicionais para a aterosclerose. Adaptado de (Kasper et al., 2015). 24

Tabela 3 – Determinantes principais do aumento da concentração plasmática de tHcy. Adaptado de (Ciaccio & Bellia, 2010; Moll & Varga, 2015)..... 25

Tabela 4 – Classificação da HHcy consoante os níveis plasmáticos de tHcy. 25

LISTA DE ABREVIATURAS

5,10-metilenoTHF – 5,10-metilenotetrahidrofolato

5-metilTHF – 5-metiltetrahidrofolato

ABC – *ATP binding cassette*

ADAM17 – abreviatura inglesa para enzima conversor do fator de necrose tumoral α

ADN – ácido desoxirribonucleico

AMP – abreviatura inglesa para monofosfato de adenosina

ApoA1-HDL – apoproteína A1 associada às lipoproteínas de alta densidade

ApoB-LDL – apoproteína B associada às lipoproteínas de baixa densidade

ARN – ácido ribonucleico

ARNm – ácido ribonucleico mensageiro

ARNt^{Met} – ácido ribonucleico de transferência específico para a metionina

ATP – trifosfato de adenosina

AVC – acidente vascular cerebral

BHMT – betaína-homocisteína metiltransferase

BLH – bleomicina hidrolase

C β S – cistationina β -sintetase

CHOP/GADD153 – *C/EBP homology protein / growth arrest DNA damage 153*

C γ L – cistationina γ -liase

Cys – abreviatura inglesa para cisteína

DCV – doenças cardiovasculares

DMG – dimetilglicina

EC – epicatequina

ECG – epicatequina galato

EGC – epigalocatequina

EGCG – epigalocatequina galato

Egr-1 – *early growth response-1*

H₂O₂ – peróxido de hidrogénio

Hcy – abreviatura inglesa para homocisteína

Hcy-S-S-proteína – ligações dissulfeto entre Hcy e a proteína

HDL – abreviatura inglesa para lipoproteínas de alta densidade

HHcy – abreviatura inglesa para hiper-homocisteinemia

HUVECs – abreviatura inglesa para células endoteliais da veia umbilical humana

hsp60 – abreviatura inglesa para proteína de choque térmico 60

HTL – homocisteína-tiolactona

ICAM1 – molécula de adesão intercelular do tipo 1

IFN- γ – interferão- γ

IL-1 – interleucina-1

IRE11 – *inositol-requiring enzyme 1*

LDL – abreviatura inglesa para lipoproteínas de baixa densidade

LDLr – recetor clássico das LDL

LOx – lisina oxidase

Lys – abreviatura inglesa para lisina

MAT – metionina adenosiltransferase

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos

Met – metionina

MetRS – abreviatura inglesa para metionil-ARNt sintetase

MMACHC – abreviatura inglesa para acidúria metilmalónica-homocistinúria tipo cbl C

MS – metionina sintetase

MT – metalotioneína

MTHFR – metilenotetrahidrofolato redutase

N-Hcy-Proteína – abreviatura inglesa para N-homocisteinilação de proteínas

NO – abreviatura inglesa para óxido nítrico

NOS – abreviatura inglesa para óxido nítrico sintetase

N ϵ -Hcy-Lys – abreviatura inglesa para N-homocisteinilação dos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina

PDGF – abreviatura inglesa para fator de crescimento derivado das plaquetas

PERK – *protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

PON-1 – paraxonase-1

pro-MMP-2 – pró-gelatinase A

Prx1 – peroxirredoxina 1

RE – retículo endoplasmático

RNS – abreviatura inglesa para espécies reativas de azoto

ROS – abreviatura inglesa para espécies reativas de oxigénio

S-nitroso-Hcy – S-nitroso-homocisteína

SAH – S-adenosil-homocisteína

SAHH – S-adenosil-homocisteína hidrolase

SAM – S-adenosilmetionina

SHMT – serina hidroximetiltransferase

SMC – abreviatura inglesa para célula muscular lisa

SRB1 – abreviatura inglesa para recetor *scavenger* B1

TDAG51 – *T-cell death associaed gene 51*

tHcy – abreviatura inglesa para homocisteína total

TGF- β – fator β de transformação de crescimento

THF – tetraidrofolato

TNF – fator de necrose tumoral

tPA – abreviatura inglesa para ativador do plasminogénio tecidual

UPR – abreviatura inglesa para resposta a proteínas *unfolded*

VCAM1 – abreviatura inglesa para molécula de adesão das células vasculares

1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte e de morbidade a nível mundial (World Health Organization, 2011, 2014a). Em 2012, morreram cerca de 56 milhões de pessoas em todo mundo, das quais 17,5 milhões (aproximadamente 31%) foram causados pelas DCV (WHO, 2014a, 2014b). Em 2030, estima-se um aumento da mortalidade para 22,2 milhões de óbitos, ou seja um acréscimo de aproximadamente 8,4%, face a 2012 (WHO, 2014b). Das DCV, as mais mortais são a doença isquémica coronária (*e.g.* enfarte agudo do miocárdio) e a doença cerebrovascular, principalmente o acidente vascular cerebral (AVC), que originaram respetivamente, 7,4 e 6,7 milhões de óbitos, em que, cerca de 65-67% destes números, foram registados em pessoas com idades acima dos 70 anos. A percentagem de óbitos de outras faixas etária nomeadamente dos [60-69 anos], [50-59 anos], [30-49 anos], [<30 anos], correspondem respetivamente a 18%, 10%, 6% e 1% do número total de mortes por doença isquémica coronária e 18%, 9%, 4% e 1% do número total de mortes por doença cerebrovascular, portanto constata-se que a percentagem de óbitos consoante a idade aumenta com o envelhecimento. Se analisarmos a incidência da taxa de mortalidade nos dois sexos verifica-se que, na cardiopatia isquémica, a taxa de mortalidade incide mais no sexo masculino, ao contrário do que se regista na doença cerebrovascular. Se salientar-mos o número de mortes por sexo e pela respetiva faixa etária, verifica-se que, em ambas as doenças, morreram mais pessoas até aos 69 anos do sexo masculino, enquanto que, na faixa etária acima dos 69 anos o maior número de óbitos são do sexo feminino (WHO, 2014a).

The World Bank agrupa os países, consoante o seu rendimento nacional bruto *per capita*, em quatro categorias: baixo rendimento, médio-baixo rendimento, médio-alto rendimento, alto rendimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a taxa de mortalidade pela doença isquémica coronária é mais elevada nos países de alto rendimento, seguido dos médio-alto rendimento, enquanto que a mortalidade pela doença cerebrovascular afeta mais os países de médio-alto rendimento, seguido dos de alto rendimento. Mas, tanto nos países de alto rendimento, médio-alto rendimento e médio-baixo rendimento as principais causas de morte são provocadas por estas DCV, ao contrário do que se verifica nos países de baixo rendimento, em que as doenças cerebrovascular e isquémica coronária são, respetivamente, a quarta e quinta causa de morte (WHO, 2014a). Estes resultados podem estar associados aos diferentes estilos de

vida quotidiano nos diversos países, onde a taxa de mortalidade é mais prevalente nos países com maiores rendimentos. É precisamente nestas regiões do mundo que se observam estilos de vida menos saudáveis, nomeadamente ao nível de alimentação e do sedentarismo (World Health Organization, 2014b).

A etiologia das doenças anteriormente referidas está, na sua maioria, subjacentes à aterosclerose (WHO, 2011, 2014b). Deste modo, pretende-se com este trabalho rever o estado da arte acerca da aterosclerose e compreender como a hiper-homocisteinemia, um fator de risco para a aterosclerose, relacionado com a homocisteinilação de proteínas, se associa à patogénese desta doença.

2. ATEROSCLEROSE

2.1. Fisiopatologia

A aterosclerose é compreendida como uma doença inflamatória multifatorial crônica, sistêmica, progressiva e degenerativa das túnica das grandes e/ou médias artérias, causada por um processo inflamatório que leva à formação local de placas de ateroma (Kullo & Cooper, 2010; Ozkan, Ozkan, & Simşek, 2002). Afeta várias regiões do leito vascular e por isso tem distintas manifestações clínicas. Nas coronárias, provoca angina e enfarte agudo do miocárdio. Nas artérias que irrigam o sistema nervoso central, causa AVC. Na circulação periférica, está implicada na claudicação intermitente, gangrena e amputações. Na circulação esplâncnica, pode provocar isquemia mesentérica e no rim, enfarte renal. Nem todas as manifestações da aterosclerose resultam de doença estenótica. Na aorta, a ectasia e o desenvolvimento de aneurisma é um exemplo disso (Kasper et al., 2015).

No ser humano, a aterosclerose ocorre ao longo de inúmeros anos, geralmente, várias décadas. O crescimento da placa aterosclerótica não ocorre de forma linear, mas descontínua, com períodos de relativa quiescência pontuados por períodos de rápida evolução (Libby, 2014).

Normalmente, o processo inflamatório inicia-se quando existe disfunção das células endoteliais. A disfunção endotelial é caracterizada pela diminuição da libertação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio e aumento da libertação dos fatores vasoconstritores derivados do endotélio e de crescimento, e também, pela alteração do fenótipo antiaderente, antitrombótico e anti-inflamatório da célula endotelial para um fenótipo pró-aderente, pró-trombótico, pró-inflamatório (Behrendt & Ganz, 2002). Estas alterações podem ser resultado da interação deste tipo de células com: *i*) fluxo sanguíneo turbulento e oscilatório (baixa tensão de cisalhamento), *ii*) lipoproteínas de baixa densidade (LDL) alteradas, *iii*) espécies reativas de oxigénio (ROS), e de azoto (RNS), *iv*) homocisteína, *v*) microrganismos (*e.g. Chlamydia pneumoniae*), entre outros fatores (Ver secção 2.2) (Kasper et al., 2015; Libby, 2014; Ross, 1999). Para além da disfunção das células endoteliais estar relacionada com o desenvolvimento de aterosclerose, outros estudos têm relacionado a disfunção do tecido adiposo perivascular com este efeito (Ozen, Daci, Norel, & Topal, 2015; Szasz, Bomfim, & Webb, 2013; Zaborska, Wareing, & Austin, 2016).

Como se sabe, para além de ser responsável pela permeabilidade seletiva de várias moléculas entre o sangue e o tecido conjuntivo, o endotélio também modula a função vasomotora, a adesão celular, a inflamação, a ativação plaquetária, a proliferação de células do músculo liso e a coagulação, através da produção de compostos bioativos essenciais para a homeostase do sistema circulatório. As funções de algumas substâncias produzidas pelas células endoteliais estão descritas na Tabela 1 (Deanfield, Halcox, & Rabelink, 2007; Ghiadoni, Bruno, & Gori, 2014; Higashi, 2015; Lewandowski, 2000; Sena, Pereira, & Seica, 2013).

A síntese de alguns compostos vasoativos pelo endotélio é regulada por agentes químicos e físicos (tensão de cisalhamento). Relativamente à regulação por agentes físicos, as células endoteliais expressam vários mecanotransdutores que convertem as tensões físicas em sinais bioquímicos (Chatzizisis et al., 2007; Hahn & Schwartz, 2009). A tensão de cisalhamento é provocada pelo fluxo sanguíneo, o qual pode ser laminar ou turbulento. Quando o ser humano, em condições normais, está em repouso ou a praticar exercício físico de baixa intensidade, o fluxo é laminar em quase toda a árvore circulatória, transitando a turbulento perto de obstáculos no lúmen, como as bifurcações, ramificações nas válvulas, as curvaturas dos vasos. Fluxo laminar exerce uma alta tensão de cisalhamento no endotélio, enquanto que um fluxo turbulento exerce baixa tensão de cisalhamento. A alta tensão de cisalhamento aumenta a expressão de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais. Este composto tem propriedades anti-inflamatórias, ao limitar a expressão de moléculas de adesão, para além de propriedades vasodilatadoras. A exposição de células endoteliais a um fluxo laminar aumenta a transcrição do *Kruppel-like factor 2* que, por sua vez, aumenta a atividade do enzima sintetase do óxido nítrico (NOS). O fluxo laminar também estimula a produção da superóxido dismutase, um enzima antioxidante. Em oposição, o fluxo turbulento e oscilatório, não estimulam a expressão destes compostos antioxidantes e obriga a que o endotélio dessa zona esteja, durante mais tempo, em contacto com agentes que causam disfunção endotelial. Deste modo, a alta tensão de cisalhamento proporciona proteção contra a disfunção endotelial, e é por isso que os locais prediletos para as lesões ateroscleróticas são os que têm baixa tensão de cisalhamento (fluxo turbulento e/ou oscilatório) (Cecchi et al., 2011; Chatzizisis et al., 2007; Gimbrone & García-Cardena, 2013; Hahn & Schwartz, 2009; Jain, Sangwung, & Hamik, 2014).

Tabela 1- Substâncias sintetizadas pelas células endoteliais e a sua respetiva função vasoativa.

Substância	Função
Óxido nítrico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasodilatador ▪ Inibidor da ativação das plaquetas ▪ Inibidor da proliferação das células musculares lisas
Prostaciclina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasodilatador ▪ Inibidor da ativação das plaquetas e de monócitos
Fator hiperpolarizante derivado do endotélio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasodilatador
Endotelina-1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasoconstritor ▪ Indutor da proliferação das células musculares lisas
Tromboxano A ₂	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasoconstritor ▪ Indutor da proliferação das células musculares lisas
Peptidil-dipeptidase A	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enzima conversor da angiotensina I em angiotensina II (vasoconstritor)
Ativador do plasminogénio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ativador da fibrinólise
Trombomodulina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína membranar, que ao interagir com a trombina ativa a proteína C, responsável pela inibição da coagulação
Proteína S	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Co-factor para a ação da proteína C ativa que cliva proteoliticamente os fatores Va e VIIIa
Moléculas associadas à membrana semelhantes à heparina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ativação da antitrombina III, responsável pela inativação da trombina e outros fatores de coagulação
Fator von Willebrand	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adesão das plaquetas
Fator tecidual	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ativador da coagulação
Inibidor do fator tecidual	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inibidor da coagulação
Inibidor do ativador do plasminogénio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inibidor da fibrinólise

Uma vez lesadas as células endoteliais, há um facilitismo para a formação de uma estria lipídica. Esta estria representa a lesão inicial da aterosclerose (Figura 1), e corresponde a um aumento focal de colesterol, proveniente de lipoproteínas, maioritariamente das LDL, no tecido conjuntivo laxo (camada subendotelial) da artéria (Figura 2) (Salisbury & Bronas, 2014). Esta acumulação de LDL pode não resultar simplesmente de um aumento da permeabilidade ou de uma fragilidade do endotélio, mas é sobretudo consequência da sua ligação aos constituintes da matriz extracelular da íntima arterial, em particular com os proteoglicanos (Fogelstrand & Borén, 2012; Libby, 2014). A retenção das LDL nesta matriz favorece a oxidação e glicação das mesmas. Os produtos daí resultantes aumentam a produção local de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF). Estas, por sua vez, regulam a expressão de moléculas de adesão envolvidas no recrutamento de leucócitos. Estas moléculas, bem como, os recetores para os leucócitos são expressas e sobre-expressas, respetivamente, na superfície das células endoteliais e das células

disfuncionais endoteliais. A alta tensão de cisalhamento pode ter um efeito antagônico na expressão destas moléculas (Galkina & Ley, 2007; Salisbury & Bronas, 2014).

Deste modo, a acumulação de leucócitos na íntima caracteriza as lesões precoces da aterosclerose. Assim, a aterogénese envolve elementos inflamatórios, que estão na base da teoria unificadora do processo aterosclerótico: a inflamação. As células inflamatórias tipicamente encontradas na placa de ateroma incluem macrófagos derivados de monócitos, células dendríticas, linfócitos T e B e mastócitos (Kasper et al., 2015).

Os leucócitos, uma vez captadas na superfície das células endoteliais pelos recetores de adesão, atravessam a camada endotelial, por diapedese, e alcançam a íntima arterial (Figura 2) (Ley, Miller, & Hedrick, 2011).

Uma vez na íntima, os monócitos diferenciam em macrófagos e, estes últimos captam avidamente LDL modificadas, via endocitose mediada pelo recetor *scavenger*, transformando-se em células espumosas (Figura 2). A captação das LDL é sobretudo realizada pelos recetores *scavenger* que não sofrem *down-regulation*, como acontece com o recetor clássico das LDL (LDLr), permitindo deste modo, uma maior acumulação de colesterol no interior destas células (Kasper et al., 2015; Libby, 2014; Libby, Ridker, & Hansson, 2009).

Embora a estria lipídica preceda o desenvolvimento da placa aterosclerótica, nem todas as estrias progridem para a placa de ateroma porque as células espumosas carregadas de colesterol podem abandonar a íntima, exportando os lípidos (Figura 1). Os macrófagos também podem proliferar na placa em resposta a fatores de crescimento hematopoéticos (Kasper et al., 2015). Por outro lado, o transporte reverso do colesterol mediado pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL), constitui uma via alternativa para a remoção do colesterol da placa de ateroma, através dos transportadores ABC (*ATP binding Cassette*) e do SRB1 (*scavenger receptor B1*) (Kasper et al., 2015).

Algumas células espumosas na íntima arterial acabam por sofrer apoptose resultando na formação de um centro lipídico designado por *core* necrótico (Figura 1). Antes de sofrerem este processo, os macrófagos podem elaborar micropartículas ou exossomas (que podem conter microARNs reguladores), citocinas e fatores de crescimento envolvidos nas placas de ateroma complicadas (Kasper et al., 2015; Libby, 2014).

A formação de tecido fibroso na matriz extracelular caracteriza as lesões ateroscleróticas mais avançadas que a estria lipídica (Figura 1). A principal responsável

é a célula muscular lisa (SMC). Os monócitos/macrófagos através de citocinas, como as IL-1 e o TNF, induzem a produção local de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o *fibroblast growth factors*, entre outros. Estes últimos, estimulam a proliferação e a produção de matriz extracelular pela célula muscular lisa contribuindo desta forma para a evolução da placa de ateroma. O PDGF elaborado por estas células, ou pelas plaquetas, ou ainda, pelas células endoteliais, pode também estimular a migração das células do músculo liso residentes na túnica média, para a íntima (Figura 2) (Kasper et al., 2015).

Outras citocinas, com destaque para o interferão- γ (IFN- γ) derivado dos linfócitos T ativados, dentro das lesões de ateroma podem limitar a síntese de colagénio pelas células musculares lisas. Antagonicamente, existem mediador que estimulam a produção de colagénio pelas células musculares lisas, como por exemplo, o fator β de transformação de crescimento (TGF- β) e o PDGF. As fibras de colagénio conferem resistência biomecânica à placa, evitando a sua rutura (Libby, 2009).

Para além dos mediadores localmente produzidos, os produtos da coagulação e da trombose contribuem também para a evolução do ateroma; o que justifica a utilização do termo aterotrombose (Kasper et al., 2015).

Apesar da estria lipídica se formar por debaixo de um endotélio intacto, nas lesões mais avançadas ocorrem alterações microscópicas nas células endoteliais que favorecem a formação de microtrombos ricos em plaquetas nos locais de exposição da matriz extracelular trombogénica. As plaquetas assim ativadas libertam numerosos fatores que promovem uma resposta fibróticas, nomeadamente o PDGF e o TGF- β (Kasper et al., 2015).

A trombina para além de gerar fibrina durante a coagulação, também estimula recetores, que sinalização a migração, proliferação e produção de matriz pelas células musculares lisas (Kasper et al., 2015).

As placas de ateroma mais evoluídas caracterizam-se pela sua baixa celularidade, a qual contrasta com a abundância de tecido fibroso calcificado (Figura 1). A escassez de células musculares lisas e macrófagos pode resultar da predominância de fatores citostáticos tais como o TGF- β e o IFN- γ , que inibem a proliferação das células musculares lisas, e levam à sua apoptose (Kasper et al., 2015).

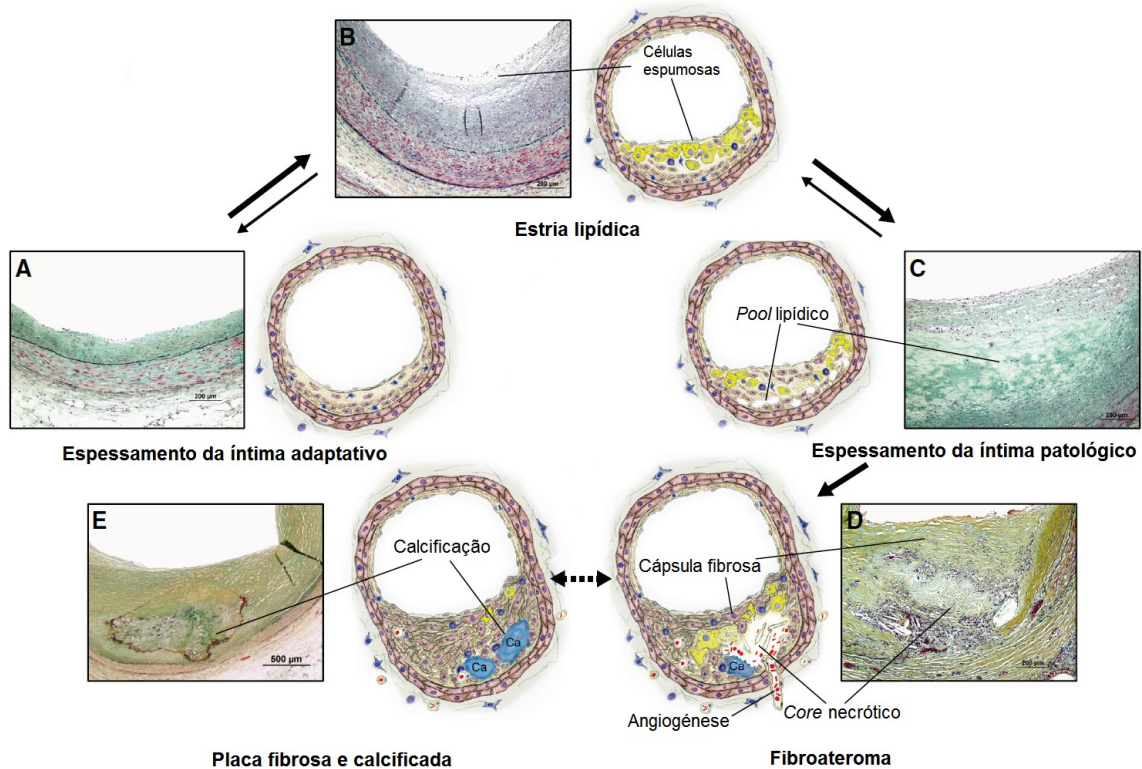


Figura 1 – Estádios histopatológicos da aterosclerose.

(A) Espessamento adaptativo da íntima caracterizado pela acumulação de células musculares lisas na íntima. (B) Formação da estria lipídica correspondente à acumulação de células espumosas na íntima. (C) Espessamento patológico da íntima com a acumulação de lipídios extracelulares sem necrose. (A), (B), (C) são processos reversíveis. (D) Fibroateroma caracterizado por core necrótico, que pode sofrer calcificação na (E) placa fibrocalcificada. Retirado de (Bentzon, Otsuka, Virmani, & Falk, 2014).

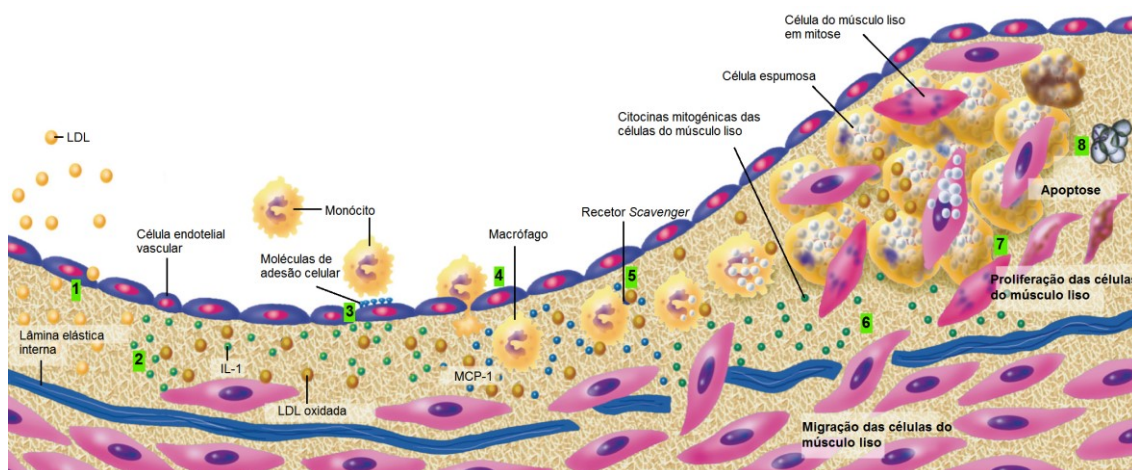


Figura 2 – Evolução esquemática da placa de ateroma.

1, Acumulação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na íntima. A retenção das LDL favorece a sua oxidação ou glicação. 2, *Stress* oxidativo, incluindo produtos da modificação das LDL, pode induzir à produção local de citocinas (esferas verdes). 3, As citocinas induzem um aumento da expressão de moléculas de adesão (hastes azuis na superfície endotelial) de leucócitos, no endotélio, promovendo assim a ligação e migração destes mesmos para a íntima. 4, Monócitos plasmáticos, ao entrar na íntima, em resposta às quimiocinas, tais como a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), aumentam a expressão de receptores *scavenger*, diferenciando-se em macrófagos. 5, Os receptores *scavenger* mediam a captação das LDL modificadas, promovendo o desenvolvimento de células espumosas. Por sua vez, estas libertam citocinas adicionais, moléculas efetoras, tais como o ácido hipocloroso, o anião superóxido, e as metaloproteases da matriz. 6, As células do músculo liso (SMC) migram para a íntima. 7, As SMC podem, então, multiplicar e elaborar matriz extracelular, promovendo a acumulação da mesma, desenvolvendo a placa aterosclerótica. Desta forma, a estria lipídica pode evoluir para uma lesão fibrótica. 8, Em fases posteriores, pode ocorrer calcificação (não representada) e fibrose contínua, que por vezes é acompanhada da apoptose das SMC, resultando numa cápsula fibrosa relativamente acelular, em torno de um *core* lipídico, que também pode conter células mortas e seus detritos. IL = interleucina. Retirado de (Libby, 2014)

2.2. Fatores de Risco

O estudo dos fatores de risco para a aterosclerose gerou de um conjunto de resultados experimentais, transversais e, mais recentemente, longitudinais, em humanos, a partir dos quais se definiram os principais fatores (Tabela 2). O contributo dos vários fatores de risco para a aterosclerose difere consoante a doença aterosclerótica. Por exemplo, a hipertensão arterial está mais relacionada com o AVC enquanto que, a hiperlipemia se relaciona sobretudo, com a doença coronária (Kasper et al., 2015).

Além disso, é importante distinguir entre fatores e marcadores de risco de doença. Por exemplo, estudos genéticos sugerem que a Proteína C Reativa não medeia por si só a aterogénese, apesar de ser utilizada como marcador preditivo de risco. Pelo contrário, a lipoproteína (a) e a apoproteína C3 emergiram como fatores de risco, bem como a hiper-homocisteinemia (HHcy) (Kasper et al., 2015).

Quando um indivíduo acumula vários fatores de risco, os mesmos têm um efeito sinérgico, e não apenas aditivo, na probabilidade de desenvolver DCV (Hall & Guyton, 2011).

Tabela 2 - Fatores de risco *majores* tradicionais para a aterosclerose. Adaptado de (Kasper et al., 2015).

Fatores de risco <i>majores</i>	
Clássicos	Emergentes
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Consumo de tabaco e exposição ao tabaco; ▪ Dieta aterogénica; ▪ Sedentarismo ▪ Hipertensão arterial (pressão sanguínea \geq 140/90 mmHg) ▪ Alta concentração plasmática de LDL, baixa concentração plasmática de HDL [$<$ 40 mg/dL] ▪ Excesso de peso/obesidade ▪ Diabetes <i>mellitus</i> ▪ História familiar de DCV prematuras ▪ Idade avançada ($\text{♂} \geq$ 45 anos, $\text{♀} \geq$ 55 anos) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hiper-homocisteinemia ▪ Hiperglicemia intermédia ▪ Lipoproteína (a) ▪ Apoproteína C3 ▪ Aterosclerose subclínica

Apesar de um conhecimento lato sobre fatores de risco envolvidos na etiologia das DCV associadas à aterosclerose, estes não são prognosticadores corretos, indicando apenas o aumento da probabilidade de surgirem estas patologias. Com efeito, sabe-se que um indivíduo que não apresente nenhum destes fatores pode vir a ter uma doença cardiovascular. Como tal, é imperativo descobrir novos fatores de risco que permitam prever corretamente o surgimento da aterosclerose, bem como, elucidar os mecanismos de ação dos mesmos e dos fatores de risco já conhecidos. Deste modo, espera-se que surjam terapias inovadoras para a prevenção e/ou tratamento das DCV, reduzindo assim, a taxa de mortalidade e morbidade, bem como as atuais despesas com o diagnóstico e com a terapêutica das mesmas (WHO, 2011).

2.2.1. Hiper-homocisteinemia.

A HHcy é descrita como uma desordem metabólica caracterizada pelo excesso de homocisteína total (tHcy) presente no sangue (Concentração plasmática de tHcy $>$ 15 $\mu\text{mol/L}$), originada pelo deficiente metabolismo da homocisteína (Hcy) (Ver 3.1.3), e agravada em doentes com insuficiência renal (Tabela 3) (Ganguly & Alam, 2015; Nygård, Vollset, Refsum, Brattström, & Ueland, 1999). Os valores plasmáticos de tHcy considerados normais, e, em indivíduos saudáveis, estão entre 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$. Tal como

indicado na Tabela 4, a HHcy classifica-se em três tipos consoante a quantidade de tHcy presente no sangue (Ganguly & Alam, 2015; Nygård et al., 1999).

Tabela 3 – Determinantes principais do aumento da concentração plasmática de tHcy. Adaptado de (Ciaccio & Bellia, 2010; Moll & Varga, 2015).

Determinantes principais de HHcy	
Fatores genéticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Défice de CβS ▪ Défice de MS ▪ Défice de MTHFR
Determinantes fisiológicos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Envelhecimento ▪ Sexo Masculino ▪ Gravidez ▪ Pós-menopausa ▪ Aumento da massa muscular
Determinantes estilo de vida	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduzida ingestão de vitaminas B₁₂, B₆, B₂ e ácido fólico ▪ Fumar ▪ Café
Condições clínicas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Deficiência em vitaminas B₁₂, B₆, B₂ e ácido fólico ▪ Insuficiência renal ▪ Hipotireoidismo

Tabela 4 – Classificação da HHcy consoante os níveis plasmáticos de tHcy.

Classificação	Concentração plasmática de tHcy (µmol/L)
Ligeira	16 a 30
Moderada	31 a 100
Severa	> 100

No plasma, pode-se encontrar a Hcy em três formas diferentes (tHcy) (Figura 3): ligada às proteínas plasmática, por pontes dissulfeto (*S*-homocisteinilação); ligada a compostos tióis de baixo peso molecular, formando homodímeros com outro resíduo de Hcy (homocistina), ou heterodímero com um outro composto tiol; na sua forma livre (Hcy reduzida) (Ganguly & Alam, 2015; Nekrassova, Lawrence, & Compton, 2003; Nygård et al., 1999).

Em termos de distribuição, a Hcy encontra-se predominantemente ligada às proteínas plasmáticas, correspondendo a cerca de 70 a 80 % de todas as formas de Hcy presentes no plasma. Em oposição, a forma reduzida da Hcy representa apenas 1 % do conteúdo total. Os restantes 20 a 30 % correspondem à formação de dímeros entre a Hcy e compostos tióis (Figura 3) (Ganguly & Alam, 2015; Nygård et al., 1999).

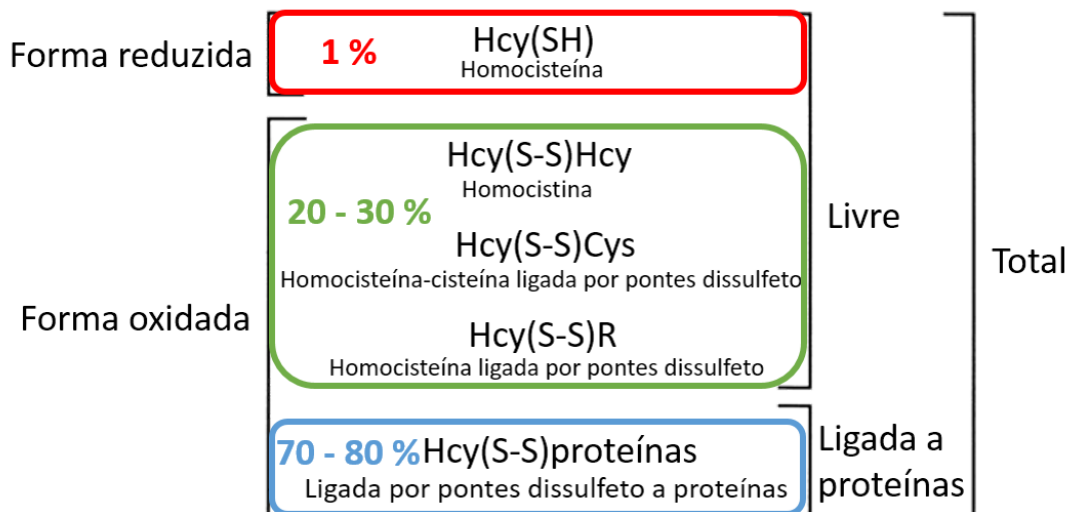


Figura 3 – Formas de Hcy existentes no plasma. Adaptado de (Nygård et al., 1999).

Os níveis de tHcy têm sido usados como biomarcadores plasmáticos das DCV em ensaios clínicos, onde se estuda a relação entre o metabolismo da Hcy com estas patologias (Jakubowski, 2013).

Em 1969, McCully (1969) propôs a HHcy severa como fator de risco de aterosclerose, quando observou aterosclerose na autópsia de crianças com homocistinúria (excesso de homocisteína na urina) causada por erros inatos no metabolismo da Hcy. Esses erros metabólicos são caracterizados por mutações dos genes dos enzimas cistationina β-sintetase (CβS), metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), metionina sintetase (MS) e acidúria metilmalónica-homocistinúria tipo cbl C (MMACHC) (Poloni, Blom, & Schwartz, 2015). As placas de ateroma observadas em seres humano, coelho, macaco com homocistinúria, são tendencialmente fibrosas e calcificadas (McCully, 2015b).

Tal como mencionado anteriormente, a HHcy é aceita pela comunidade médica como um fator de risco independente para o desenvolvimento de DCV (Ganguly & Alam, 2015; Koubaa et al., 2009; Leach et al., 2014; Sharifi, Salimi, & Shams, 2012; Tcherkas & Denisenko, 2001). Diversos estudos observacionais (prospetivos e retrospectivos) mostraram que um aumento da concentração de tHcy, mesmo sendo ligeiro, está associado a um maior risco de desenvolvimento de DCV (Eckel & Cornier, 2014). Guo et al. (2014) analisaram e compararam os efeitos de uma dieta rica em metionina (1% metionina), rica em gorduras (10% natas, 1,25% colesterol, 0,5% ácido cólico) e rica em ambos estes nutrientes, com uma dieta equilibrada (grupo controle),

em ratinhos machos com ausência do gene do LDLr. Pelos resultados obtidos, verificaram que os ratinhos com uma dieta rica em metionina apresentavam HHcy, e que os níveis elevados de tHcy aceleraram o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, evidenciando assim, a HHcy como um possível fator de risco independente para o desenvolvimento de aterosclerose no ser humano. Também apuraram que, a hiperlipemia acelerou a evolução de aterosclerose, para além de terem verificado que, a associação destes dois fatores de risco acelerou e desenvolveu lesões ateroscleróticas mais graves nos ratinhos com defeitos no gene do LDLr. O resultado da associação destes dois fatores de risco está em concordância com o que foi dito anteriormente, acerca dos efeitos sinérgicos de fatores de risco. Para além do aumento da gravidade clínica pelos efeitos sinérgicos de fatores de risco, tem-se verificado um aumento da prevalência de HHcy em indivíduos que têm vários fatores de risco de DCV, como o tabagismo, a hipertensão e com o défice nutricional em vitaminas B₆ e B₁₂ e ácido fólico, a idade avançada e a insuficiência renal (Guo et al., 2015; Lewandowski, 2000; Škovierová et al., 2016).

Ao longo dos anos, têm sido realizados diversos ensaios clínicos com o intuito de determinar se a redução dos níveis plasmáticos de tHcy com reforço da ingestão de vitaminas do complexo B, incluindo a vitamina B₁₂, B₆ e ácido fólico, seriam benéficas na redução da doença aterosclerótica em indivíduos com doença cardiovascular estabelecida. Os resultados destes ensaios revelaram, que não houve redução dos eventos vasculares em indivíduos com doença cerebrovascular, ou com doença cardiovascular e, ainda com doença vascular resultante de insuficiência renal crónica (McCully, 2015b). A falha da suplementação vitamínica, em contexto de prevenção secundária, levou desde 2015, a ser estudado o efeito da suplementação destas vitaminas, em contexto de prevenção primária, ao qual, aguarda-se ainda pelos resultados finais (McCully, 2015a).

Todavia, é de salientar que os estudos, quer observacionais, quer clínicos, ao utilizarem a tHcy como biomarcador, não discriminam as espécies individuais da Hcy, pelo que se desconhece qual delas participa diretamente na génese da aterosclerose.

3. BIOQUÍMICA DA HOMOCISTEÍNA

3.1. Homocisteína

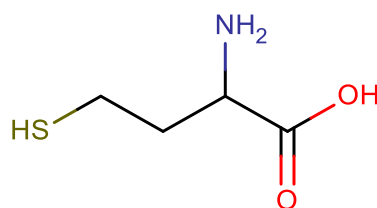


Figura 4 - Estrutura química da Hcy. Apresenta uma cadeia lateral semelhante à Cys, já que possui, em comparação com esta, um grupo metilo adicional.

3.1.1. Considerações Gerais.

A Hcy é um aminoácido não-proteico (Figura 4), que constitui um produto intermediário da conversão de metionina (Met) em cisteína (Cys) (Ganguly & Alam, 2015; Nekrassova et al., 2003; Nygård et al., 1999). A Met é um aminoácido essencial obtido exclusivamente pela dieta. Uma vez ingeridas, as proteínas contendo este aminoácido, são digeridas e a Met, na sua forma livre, é direcionada para a corrente sanguínea, onde circula até ser captada pelas células. Uma vez dentro das células, a Met é convertida a *S*-adenosilmetionina (SAM) pelo enzima metionina adenosiltransferase (MAT), que necessita de uma molécula de trifosfato de adenosina (ATP) para que esta reação ocorra. Após formada a SAM, um doador universal de grupos de metilo, este transfere o seu grupo metilo para um aceitador seu (*e.g.* ADN, ARN, proteínas, fosfolípidos), a este processo dá-se o nome de metilação, originando *S*-adenosil-homocisteína (SAH) (Figura 6). Por fim, a SAH sofre hidrólise enzimática, pela ação da *S*-adenosil-homocisteína hidrolase (SAHH), gerando Hcy e adenosina, num processo reversível. (Figura 6) (Jakubowski, 2006b; Jakubowski & Głowacki, 2011; Nygård et al., 1999; Poloni et al., 2015; Rafii et al., 2009). Se não existir nenhum mecanismo que impeça a acumulação intracelular de Hcy, a sua elevada concentração torna-se citotóxicas (Welch, Upchurch, & Loscalzo, 1997).

3.1.2. Efeitos Tóxicos da Hcy.

Até à data, foram propostos diferentes efeitos tóxicos da Hcy, os quais podem resultar de efeitos tóxicos diretos, caso da *S*-homocisteinilação de proteínas e da indução do *stress* oxidativo, ou indiretos, através dos seus diversos metabolitos (Škovierová et al., 2016; Zang et al., 2016).

O *stress* oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies pró-oxidantes (ROS e RNS) e antioxidantes. Diferentes estudos revelaram que as reações redox podem ser um fator chave para o desenvolvimento da aterosclerose em indivíduos com HHcy. A Hcy aumenta a produção de ROS que podem formar radicais hidroxilo que, por sua vez, podem remover elétrons de outras moléculas e induzir a subsequente oxidação de lípidos, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos, contribuindo assim para a disfunção endotelial, seguida de ativação plaquetária e formação de trombos. A auto-oxidação dos metabolitos da Hcy conduz à acumulação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), um potente agente oxidante. Vários mecanismos têm sido propostos para o *stress* oxidativo da Hcy: *i*) auto-oxidação da Hcy, *ii*) inibição da atividade enzimática dos antioxidantes na célula, *iii*) libertação da superóxido dismutase da superfície das células endoteliais, *iv*) ativação das NADPH oxidases, *v*) inibição da NOS, *vi*) degradação do enzima dimetilargininase e acumulação do inibidor da NOS, a dimetilarginina assimétrica e *vii*) formação de peroxinitrito, um indicador da reação entre o radical superóxido e o NO, que altera o metabolismo da tirosina e provoca alteração na função proteica induzindo, dessa forma, a disfunção endotelial (Lai & Kan, 2015; Škovierová et al., 2016).

Quanto à *S*-homocisteinilação, ocorre quando a Hcy se liga através do seu grupo tiol a outro grupo idêntico proveniente de um resíduo de Cys¹ de uma proteína, estabelecendo-se uma ponte dissulfeto (Figura 5). Estas alterações têm um forte impacto no estado redox das proteínas, com a consequente modificação da sua função (Škovierová et al., 2016). Como tal, a *S*-homocisteinilação também contribui para o *stress* oxidativo. Este assunto voltará a ser abordado mais à frente.

Quanto aos efeitos tóxicos consequentes dos metabolitos de Hcy, dado a sua importância e relevo na presente monografia, serão discutidos em pormenor ao longo das secções seguintes.

¹ Se um resíduo de Hcy for incorporado erradamente na cadeia polipeptídica da proteína, este poderá também contribuir para a formação de pontes dissulfeto.

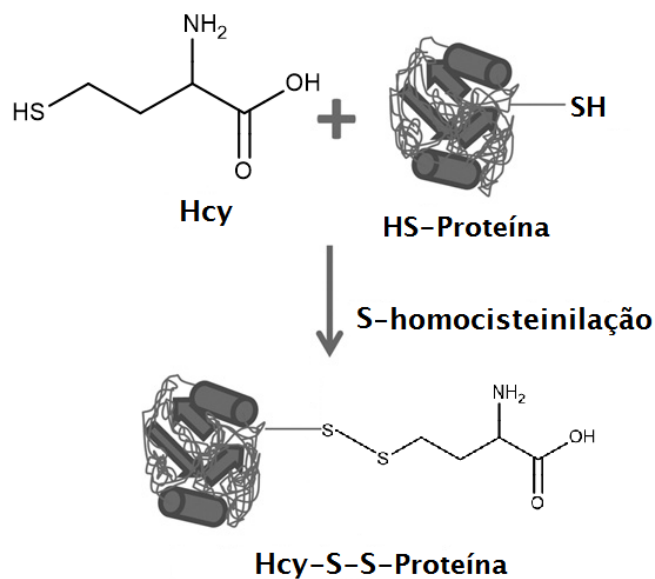


Figura 5 - Representação esquemática das modificações proteicas induzidas pela Hcy, através da S-homocisteinilação.

A fim de evitar a citotoxicidade, a célula pode metabolizar a Hcy por duas vias que geram metabolitos não-citotóxicos (Ver secção 3.1.3), exportar a Hcy para o meio extracelular, nomeadamente para a circulação sanguínea, ou ainda, atenuar os seus efeitos citotóxicos, através de vários compostos, como por exemplo, o glutathione², a glutathione peroxidase³, a catalase e o NO (Welch et al., 1997). Este último reduz a biodisponibilidade da Hcy, ao interagir com este aminoácido, formando S-nitroso-homocisteína (S-nitroso-Hcy). A síntese desta molécula, para além de diminuir a concentração de Hcy, não produz ROS, e mantém a biodisponibilidade do NO, funcionando como uma dadora de NO (Stamler et al., 1993). No entanto, o S-nitroso-Hcy pode incorporar-se em proteínas, de forma translacional, devido ao facto da sua estrutura ser similar à da Met. A metionil-ARNt sintetase (MetRS), um enzima aminoacil-ARNt sintetase específico para a Met, essencial para a tradução do ARNm, e consequentemente para a biossíntese de proteínas, seleciona o S-nitroso-Hcy em vez da Met permitindo, assim, a incorporação da Hcy na cadeia polipeptídica da proteína

² O glutathione, no estado reduzido, confere às células mecanismos de defesa antioxidante, prevenindo, por exemplo, a oxidação dos grupos tiol de vários compostos e proteínas, também reduz os radicais ROS ou de azoto, e remove peróxidos lipídicos e de hidrogénio. Estas funções podem ser obtidas pela ação direta do glutathione ou indiretamente, através de reações enzimáticas.

³ O enzima glutathione peroxidase é responsável pela catálise da redução de hidroperóxidos e lipoperóxidos orgânicos e, concomitantemente, pela oxidação do glutathione. Também parecer ser responsável pela prevenção da oxidação do NO.

recém-sintetizada, em vez da Met. Todavia, este mecanismo poderá ser tóxico para a célula (Jakubowski, 2000, 2001, 2004).

Por causa do potencial de redução do meio intracelular, sobretudo devido à presença de glutatióno reduzido, a Hcy desloca-se do meio intracelular para o extracelular na sua forma reduzida; no entanto, passado alguns minutos a horas, a maioria desta oxida-se (Lewandowski, 2000).

3.1.3. Metabolismo da Hcy.

A metabolização da Hcy pode ser feita por duas vias distintas, isto é, por transulfuração ou por remetilação. A maioria das células do corpo humano, se não todas, metabolizam a Hcy pela via de remetilação; só apenas o fígado, os rins, o pâncreas e o intestino delgado conseguem metabolizar a Hcy pela via de transulfuração, para além da remetilação (Lewandowski, 2000; Perła-Kaján, Twardowski, & Jakubowski, 2007; Škovierová et al., 2016).

A transulfuração da Hcy é um processo sintético irreversível de resíduos de Cys a partir da Hcy. O primeiro passo necessita da ação catalítica do enzima C β S, enzima este que está dependente do fosfato de piridoxal, seu cofator, para condensar a Hcy com a serina, dando origem ao aminoácido não-proteico cistationina. Esta última é convertida em Cys, catião amónio e α -oxobutirato, pela ação da cistationina γ -liase (C γ L) (Figura 6). Posteriormente, a Cys formada por reações oxidativas, gera taurina ou sulfato, em porções 2:1. Este aminoácido também é essencial para a síntese de proteínas, do coenzima A e do glutatióno. As células que não conseguem catabolizar a Hcy por esta via, obtêm Cys da corrente sanguínea (Jakubowski & Głowacki, 2011; Poloni et al., 2015; Rafii et al., 2009).

Em condições normais, cerca de 50% da Hcy é remetilada originando metionina. A remetilação pode ser catalisada por dois enzimas de diferentes vias: a metionina sintetase (MS) ou a betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT). A conversão de Hcy a Met, pela ação da MS, está dependente da presença do substrato 5-metiltetrahydrofolato (5-metilTHF). Este provém da metabolização do 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-metilenoTHF) pelo enzima dependente de riboflavina, o metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR). Na presença do 5-metilTHF e da vitamina B12 (cofator da MS), a MS catalisa a transferência do grupo metilo do 5-metilTHF para a Hcy, originando Met e tetrahydrofolato (THF). O THF, posteriormente, é convertido em 5,10-metilenoTHF pela serina hidroximetiltransferase

(SHMT), uma reação dependente da presença de piridoxal-5'-fosfato como cofator. O produto desta reação, como dito anteriormente, é essencial para a obtenção de 5-metilTHF. A todo este processo dá-se o nome de ciclo dos folatos. Já a outra via de remetilização da Hcy através do enzima BHMT, só ocorre no fígado e nos rins, e requer betaina como grupo dador de metilo para formar Met e dimetilglicina (DMG). Esta reação é catalisada pela BHMT (Figura 6) (Jakubowski & Głowacki, 2011; Lewandowski, 2000; Poloni et al., 2015; Rafii et al., 2009; Škovierová et al., 2016).

3.2. Homocisteína-Tiolactona

Se o metabolismo da Hcy falhar, quer pela ausência e/ou defeito dos enzimas implícitos na sua metabolização, quer pela carência dos seus cofatores, ou ainda, pela excessiva ingestão ou carência⁴ nutricional de Met (McCully, 2015b), a concentração intracelular de Hcy eleva-se, aumentando assim a probabilidade deste aminoácido ser metabolizado por uma via extraordinária ao seu metabolismo. Esta via surge quando ocorre um erro numa reação de edição pela MetRS. Devido à similaridade das estruturas químicas dos resíduos de aminoácido Hcy e Met, torna-se difícil para o MetRS discriminar a Met, entre estes aminoácidos, para poder formar metionil-ARNt. Caso este selecione erradamente Hcy em vez de Met, e a ative por ligação de uma molécula de monofosfato de adenosina (AMP) ao seu terminal carboxilo, ativação esta que requer energia proveniente da hidrólise de ATP, o MetRS não consegue ligar a Hcy ativada ao ARNt^{Met}, e irá catalisar a reação da cadeia lateral tiol da Hcy, removendo o AMP do terminal carboxilo ativado da Hcy, formando-se como produto final, a homocisteína-tiolactona (HTL) (Jakubowski & Głowacki, 2011).

Esta via de metabolização está dependente do rácio intracelular de Hcy/Met. Elevadas concentrações intracelulares de Hcy e baixas de Met estão relacionadas com o aumento da síntese de HTL (Perła-Kaján et al., 2007).

⁴ O decréscimo da concentração intracelular de Met reduz a biossíntese de SAM, provocando consequentemente a diminuição da ativação alostérica da CβS e, da inibição alostérica da MTHFR.

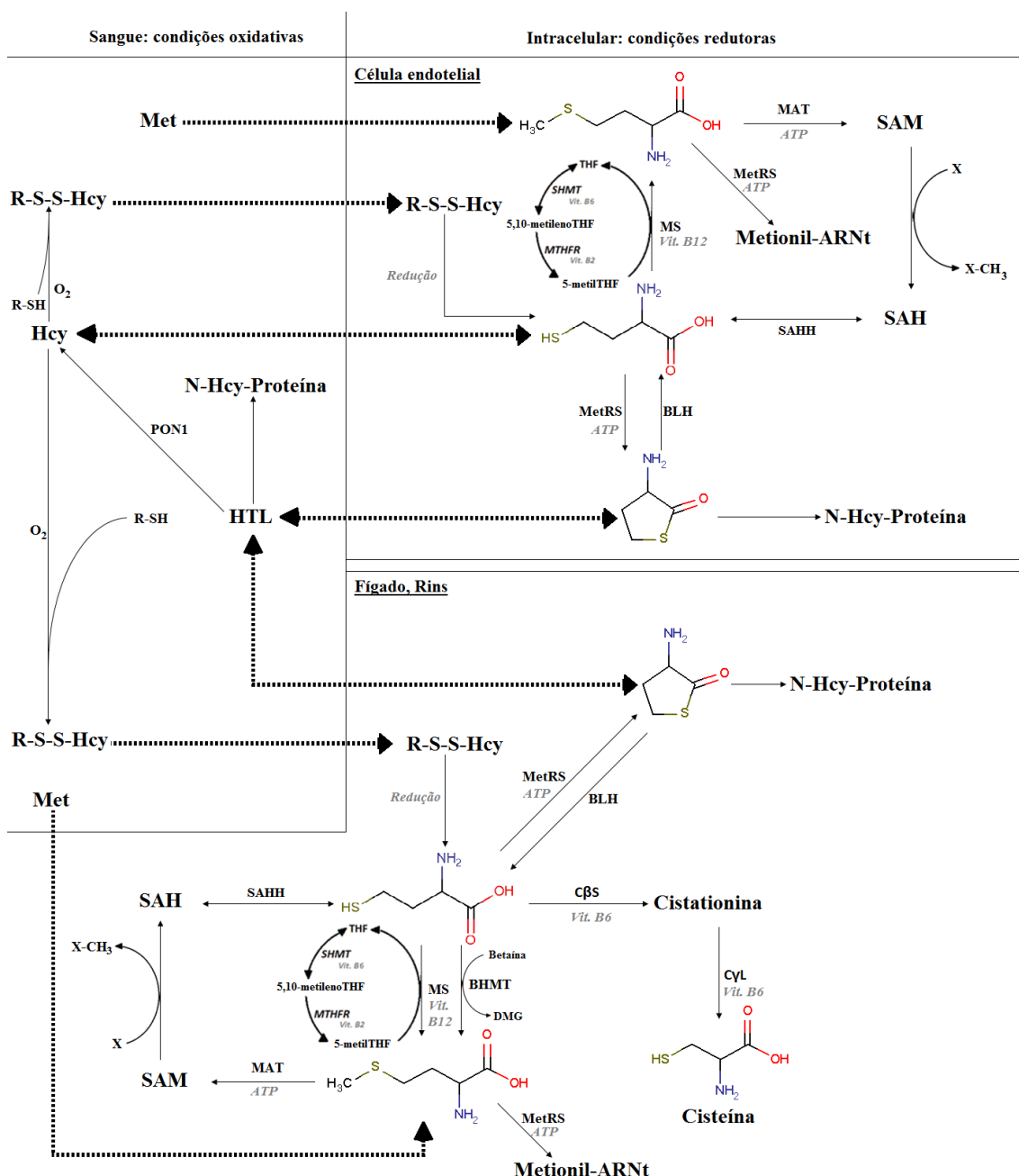


Figura 6 – Metabolismo da Hcy e da HTL. Adaptado de (Jakubowski, 2004; Lewandowski, 2000).

Met = metionina; MAT = metionina adenosiltransferase; ATP = adenosina trifosfato; SAM = S-adenosilmetionina; X = grupo metilo; X-CH₃ = acetador de grupos metilo; SAH = S-adenosilhomocisteína; Hcy = homocisteína; R-SH = grupo tiol na extremidade da cadeia de um composto; O₂ = oxigênio molecular; R-S-S-Hcy = formação de uma ponte dissulfeto entre os grupo tiol da Hcy e do composto; CβS = cistationina β-sintetase; Vit. B6 = piridoxal-5'-fosfato; CγL = cistationina γ-liase; MS = metionina sintetase; Vit. B12 = vitamina B12; 5-metilTHF = 5-metiltetrahydrofolato; THF = tetrahydrofolato; SHMT = serina hidroximetiltransferase; 5,10-metilenoTHF = 5,10-metilenotetrahydrofolato; MTHFR = metilenotetrahydrofolato redutase; Vit. B2 = riboflavina; BHMT = betaína-homocisteína metiltransferase; DMG = dimetilglicina; MetRS = metionil-ácido ribonucleico de transferência sintetase; Metionil-ARNt = metionil-ácido ribonucleico de transferência; HTL = homocisteína-tiolactonase; N-Hcy-Proteína = N-homocisteinilação de proteína; BLH = bleomicina hidrolase; PON1 = paraoxonase sérica tipo 1.

3.2.1. Metabolismo da HTL.

Em condições fisiológicas, a HTL produzida pelas células encontra-se maioritariamente na sua forma neutra (Figura 7) e consegue difundir-se passivamente pelas membranas celulares (Figura 6). Grande parte da HTL vai para o meio extracelular, nomeadamente para a corrente sanguínea, para posteriormente ser excretada pelo rim, acumulando-se na urina. Deste modo, uma falha da função renal leva então à acumulação de HTL no plasma (Jakubowski, 2013). Alternativamente, pode ser metabolizada pelo enzima intracelular, a bleomicina hidrolase (BLH), ou pelo enzima extracelular, a paraxaonase-1 (PON-1) (Figura 6). A PON-1 é um enzima associado às lipoproteínas de alta densidade (HDL), que possui uma dupla ação anti-aterogénica ao, por um lado, hidrolisar o anel lactona da HTL, convertendo-a em Hcy, e, por outro, ao hidrolisar os peróxidos lipídicos e os hidroperóxidos de linoleato de colesterol das LDL oxidadas (Chistiakov, Melnichenko, Orekhov, & Bobryshev, 2017; Jakubowski, 2013). No meio intracelular, a HTL é hidrolisada pela BLH, a qual tem uma eficácia catalítica cem vezes superior à da PON-1; porém, esta continua a ser baixa e não saturada a 20 mM de HTL (Marsillach et al., 2014).

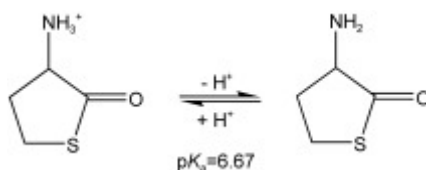


Figura 7 - HTL nas suas formas ácido-base. Retirado de (Jakubowski, 2006a)

3.2.2. N-Homocisteinilação de Proteínas.

A HTL é um tioéster cíclico, quimicamente reativo, uma vez que a energia da ligação do anidrido na Hcy~AMP é conservada na ligação tioéster. Tendo a HTL um grupo tioéster, o qual se comporta como um grupo eletroatrator por efeito indutivo, o valor de pK_a da HTL é de $6,67 \pm 0,05$, sendo inferior ao valor de outros grupos amino comuns, nomeadamente o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina ($pK_a = 10,5$). Sendo assim, este grupo tioéster é suscetível de sofrer ataques nucleófilos, especialmente pelo grupo ϵ -amino da cadeia lateral dos resíduos de lisina (Lys), levando à formação de ligações amida com estes mesmos grupos da Lys ($N\epsilon$ -Hcy-Lys). Deste modo, dependendo do pH do meio, a HTL pode provocar a N-homocisteinilação das proteínas (N-Hcy-Proteína) (Figura 8) (Garel & Tawfik, 2006; Jakubowski, 2006b; Jakubowski & Głowacki, 2011).

A *N*-homocisteinilação das proteínas é um processo de modificação pós-transdução, induzida pela HTL, que leva à incorporação de Hcy nas proteínas, através da formação de ligações amida entre o grupo tioéster da HTL e o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina das proteínas. Este processo pode alterar a estrutura e os pontos isoelétricos das proteínas, induzindo assim o seu desenrolamento ou multimerização e levando, conseqüentemente, à agregação/precipitação/formação de proteínas amiloides, e à perda das suas funções biológicas (Figura 8) (Garel & Tawfik, 2006; Jakubowski, 2006b; Jakubowski & Głowacki, 2011). Refira-se que, os níveis de *N*-Hcy-Proteína aumentam significativamente em indivíduos com HHcy (Jakubowski, 2013).

A reatividade da HTL com grupos ϵ -amino dos resíduos de Lys da proteína varia consoante o tamanho, os pontos isoelétricos da proteína, o número de resíduos de Lys e sua distribuição na proteína. Proteínas compostas por cerca de 100 a 700 resíduos de aminoácidos mostram uma correlação favorável entre a reatividade da HTL e o teor de lisinas ($r = 0.97$). Proteínas grandes, como o fibrinogénio (3588 aminoácidos), à partida têm maior quantidade de lisinas que as de baixas dimensões, sendo expectável uma correlação idêntica entre *N* ϵ -Hcy-Lys e o número de lisinas. No entanto, não se verificou o aumento reacional da HTL, provavelmente, devido à inacessibilidade dos grupos ϵ -amino dos resíduos de Lys ao solvente (Jakubowski, 2000; Sharma, Kumar, Dar, & Singh, 2015).

Ao analisar as alterações provocadas pela HTL, através da *N*-homocisteinilação das proteínas lisozima, RNase-A e α -LA, Sharma, Kumar, & Singh (2014) concluíram que a modificação estrutural e funcional das proteínas depende dos seus pontos isoelétricos. A *N*-homocisteinilação desnatura as proteínas ácidas, perdendo estas, as suas funções, e pode levar, conseqüentemente, à agregação proteica. Contrariamente, as proteínas básicas são resistentes a estas alterações. Assim, sugerem que, células ou tecidos com um conteúdo rico em proteínas ácidas poderiam ser os principais alvos para a *N*-homocisteinilação. Contudo, o estudo indica também, que as alterações estruturais e funcionais induzidas pela *N*-homocisteinilação não ocorre em todas as proteínas ácidas.

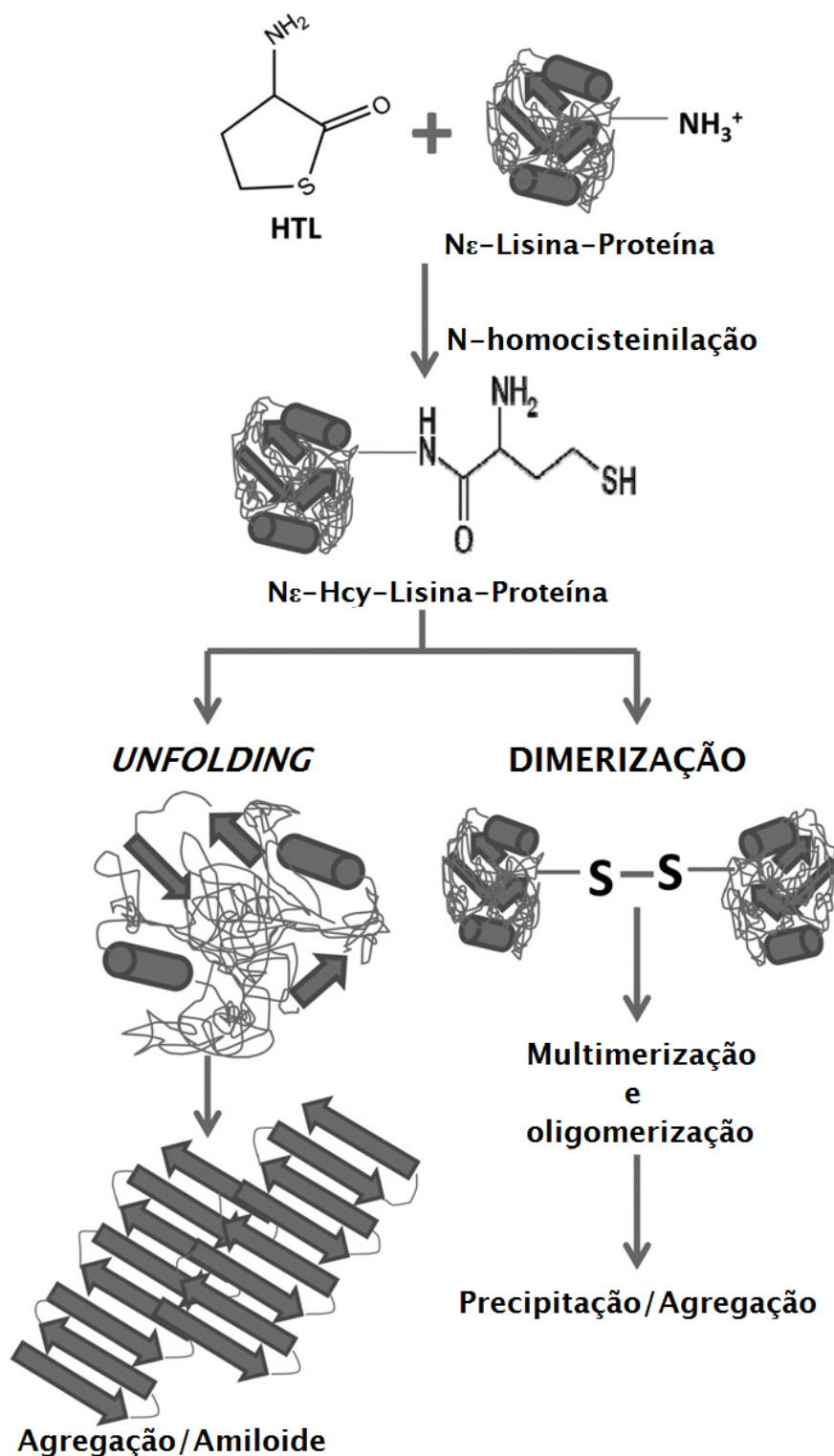


Figura 8 – Representação esquemática das modificações proteicas induzidas pela HTL, através da N-homocisteinilação (Sharma et al., 2015).

Num estudo realizado a ratinhos, verificou-se que a N-homocisteinilação de proteínas pode ser revertida pela alteração de uma dieta rica em Met, para uma pobre neste aminoácido. Porém, durante duas semanas, a alteração da dieta não permitiu reverter totalmente os níveis plasmáticos de N-Hcy-proteínas de modo a igualarem-se

aos níveis do grupo de controlo (ratinhos que nunca ingeriram uma dieta rica em Met), ao contrário da concentração plasmática da HTL e Hcy, que passado o mesmo tempo, retomaram aos valores normais (grupo controlo) (Jakubowski et al., 2009).

Atualmente, não é conhecido nenhum mecanismo para a destoxificação de *N*-Hcy-proteínas. Porém, pela primeira vez, foi proposto um mecanismo para a “auto-deshomocisteinilação” em solução aquosa, conforme descrito no esquema da Figura 9 (Mei et al., 2016). Se for correto, este mecanismo poderá justificar a redução da concentração plasmática de *N*-Hcy-proteínas observada em ratinhos, no estudo anteriormente referido.

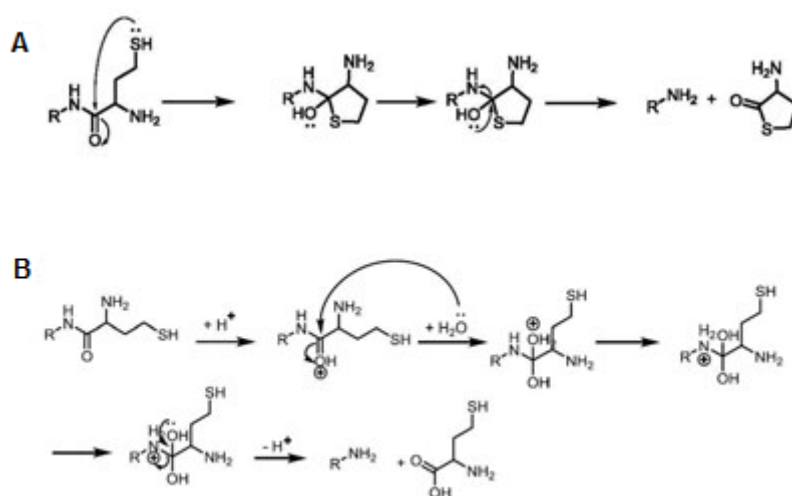


Figura 9 – Mecanismo químico proposto por Mei et al. (2016), para a “deshomocisteinilação” de resíduos de Lys de proteínas *N*-homocisteiniladas:

Sob condições alcalinas (A), o par de elétrons não partilhados do grupo tiol ataca primeiro o grupo carbonilo para formar um anel de cinco membros. De seguida, o par de elétrons não partilhados do grupo hidroxilo ataca o carbono quaternário quebrando a ligação com grupo amina, para obter HTL. Isto sugere que o principal subproduto da “deshomocisteinilação”, em condições fisiológicas, é a HTL. Em contraste, em condições ácidas (B), o grupo carbonilo é inicialmente protonado antes que as moléculas de H_2O o ataquem, seguido da transferência de um protão e da isomerização intramolecular. Finalmente, o grupo hidroxilo ataca o carbono quaternário, quebrando a ligação com o grupo amina, e originando Hcy. Se este mecanismo estiver correto, dado o grupo tiol ser mais nucleófilo do que o grupo hidroxilo, a “deshomocisteinilação” será ativada mais facilmente em condições alcalinas do que em ácidas. Retirado de (Mei et al., 2016).

Segundo os resultados obtidos por Olas, Kołodziejczyk, & Malinowska (2010), a HTL é mais reativa do que a Hcy, na indução da homocisteinilação de proteínas, sendo, por isso necessário, maiores concentrações de Hcy para formar o mesmo número de aductos com proteínas, comparativamente à HTL. Neste mesmo estudo, verificaram que tanto a HTL como a Hcy podem provocar *N*-homocisteinilação, *S*-homocisteinilação e *C*-homocisteinilação (Hcy ligada ao grupo carbonilo) de proteínas. Porém, devido à

falta de evidências suficientes na literatura que suportem esta última, na presente monografia não será incluída a hipótese da HTL e da Hcy provocarem C-homocisteinilação.

4. EFEITOS ATEROGÉNICOS INDUZIDOS PELA HOMOCISTEINILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Apesar de não se conhecer o mecanismo exato de ação da Hcy na aterogénese, sabe-se que este aminoácido pode ter uma ação direta, através da *S*-homocisteinilação de proteínas, ou indireta, através dos seus metabolitos, nomeadamente da HTL, e da sua capacidade de provocar *N*-homocisteinilação de proteínas, que levam, por exemplo, à desregulação do mecanismo vasodilatador endotelial, ao *stress* do retículo endoplasmático das células endoteliais e do músculo liso vasculares e a alterações fenotípicas para um fenótipo endotelial pró-inflamatório e pró-coagulante. (Fridman, Fuchs, Porcile, Morales, & Gariglio, 2011; Škovierová et al., 2016). Nesta secção apenas serão focados os efeitos aterogénicos da Hcy e HTL através da homocisteinilação de proteínas. Todavia, é de salientar que, na literatura recente, muitos dos estudos efetuados não discriminam entre as espécies de Hcy e os seus metabolitos responsáveis pelos seus efeitos tóxicos. Na presente secção, foram selecionados trabalhos da base de dados *Pubmed*, publicados nos últimos 5 anos (com algumas exceções) e que correlacionam a homocisteinilação de proteínas com a aterogénese.

4.1. *N*-Homocisteinilação de Proteínas

4.1.1. Intracelulares.

4.1.1.1. *Stress do Retículo Endoplasmático.*

Como foi dito anteriormente, a incorporação pós-transdução da Hcy em proteínas, pela HTL, pode modificar estruturalmente as proteínas, podendo conduzir à agregação das mesmas devido ao enrolamento incorreto ou perda da estrutura tridimensional.

Se estas proteínas alteradas estiverem presentes no lúmen do retículo endoplasmático (RE), é ativada a resposta a proteínas *unfolded* (UPR), que quando sobrecarregada despoleta a apoptose da célula, mediada pela ativação de, pelo menos, 2 genes apoptóticos: o CHOP/GADD153 (*growth arrest DNA damage 153*) e o TDAG51 (*T-cell death associated gene 51*) (Jakubowski, 2013; Lai & Kan, 2015)

Células endoteliais apoptóticas foram observadas na corrente sanguínea de pacientes com hiper-homocisteinemia grave. Esta observação apoia a hipótese da

disfunção endotelial não ocorrer apenas por perda da biodisponibilidade de óxido nítrico, mas também pela ativação da via URP que envolvem proteínas tais como: *inositol requiring enzyme* (IRE1), *RNA-activated protein Kinase like ER kinase* (PERK) e o fator de ativação da transcrição 6 (Jakubowski, 2013; Lai & Kan, 2015). Este acontecimento leva também à ativação de vias inflamatórias (Wu et al., 2015).

4.1.2. Extracelulares.

No meio extracelular, foram observadas, *in vivo*, várias proteínas alvo da *N*-homocisteinilação pela HTL, nomeadamente a albumina, o fibrinogénio, a apoA1-HDL, a apoB-LDL e o colagénio (Jakubowski, 2013; Perła-Kajan et al., 2016; Zinellu, Sotgia, et al., 2010). Seguidamente, cada caso será descrito ao pormenor.

4.1.2.1. Apo-LDL.

A *N*-homocisteinilação das apo-LDL promove a multimerização das mesmas, levando à sua agregação ou precipitação. Uma vez nos vasos, nomeadamente, nos *vasa vasorum*, estes agregados podem, facilmente, ligar-se aos constituintes lipídicos dos microrganismos, promovendo assim a sua retenção. Consequentemente, este processo contribui para a obstrução da circulação nos *vasa vasorum*, resultando em isquemia da parede arterial, morte celular intramural, obstrução dos capilares e propagação de microrganismos para a íntima, o que conduz à inflamação e criação de placas de ateroma vulneráveis. Por outro lado, a presença de LDL homocisteiniladas e oxidadas estimulam a produção de anticorpos anti-*N*-Hcy-LDL que podem iniciar um ciclo vicioso ao aumentar a formação de complexos e a agregação de lipoproteínas (McCully, 2015a; Perła-Kaján et al., 2007; Vignini et al., 2004).

4.1.2.2. ApoA1-HDL.

A apoproteína predominante nas lipoproteínas de alta densidade é a apoA1. Esta última é a grande responsável pelo efeito anti-aterogénico das HDL, pois é responsável pelo efluxo de colesterol das células espumosas e pela ação antioxidante das HDL, capazes de reduzir as LDL oxidadas. Esta proteína tem 21 lisinas suscetíveis de sofrer *N*-homocisteinilação. Contudo, *in vivo*, apenas foi observado a formação de dois aductos *N* ϵ -Hcy-Lys (Ishimine et al., 2010). Num recente estudo de Miyazaki et al. (2014), foi analisado os efeitos provocados pela *N*-homocisteinilação da apoA1 na sua capacidade antioxidante e de efluxo de colesterol e verificou-se que esta modificação da

apoproteína alterou negativamente a sua capacidade antioxidante, promovendo mesmo a oxidação das LDL; porém, não afetou o efluxo de colesterol.

4.1.2.3. Albumina.

Tal como referido anteriormente, grande parte da tHcy está ligada à albumina por pontes dissulfeto (*S*-homocisteinilação), no entanto esta proteína também sofre *N*-homocisteinilação. A primeira envolve a Cys34, e a segunda envolve a ligação da HTL com a Lys525 (Sharma et al., 2015). Estas modificações pós translacionais podem alterar a interação da albumina com as catequinas (Genoud, Castañon, Lauricella, & Quintana, 2014; Zinellu et al., 2015).

As catequinas são compostos polifenólicos particularmente abundantes no chá verde e, existem sobretudo nas formas de epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigalocatequina galato (EGCG). São lhe reconhecidas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Zinellu et al., 2015).

Estes flavonoides ligam-se à albumina plasmática com diferentes afinidades, o que pode modular a farmacocinética, principalmente a sua biodisponibilidade. Assim, as catequinas que têm na composição galato possuem maior afinidade para a albumina (Zinellu et al., 2015).

Estudos *in vitro* revelaram que a incubação da albumina com Hcy diminui a afinidade da albumina para as catequinas, avaliada pela constante de afinidade K_b : 14% para a EC, 18% para EGC, 24% para a ECG e 30% para a EGCG; o mesmo aconteceu para a *N*-homocisteinilação provocada pela HTL: 17% para a EC, 22% para a EGC, 23% para a ECG e 32% para a EGCG (Zinellu et al., 2015).

Tendo em conta que a ligação da albumina às catequinas ocorre em apenas um local, especula-se que, quer a ligação da Hcy ao resíduo Cys34, quer da HTL ao resíduo Lys525, possam diminuir o acesso das catequinas à albumina por modificação conformacional desta. Esta observação é suportada, pelo facto, das catequinas com maior perda de afinidade serem as que têm de maior massa (ECG e EGCG). A diminuição da afinidade da albumina pelas catequinas torna-as mais suscetíveis de sofrerem oxidação e/ou catabolismo, o que encurtará a sua semivida e, portanto, a atividade biológica (Zinellu et al., 2015).

Apesar deste estudo não ter sido realizado *in vivo*, torna-se particularmente interessante devido, ao facto, de outros compostos, nomeadamente fármacos com forte

ligação à albumina, poderem sofrer alterações na sua biodisponibilidade, em situações de HHcy (Zinellu et al., 2015).

Ver outros efeitos da albumina *N*-homocisteinilada na secção 4.1.3.1.

4.1.2.4. Fibrinogénio.

O fibrinogénio, uma proteína chave no processo de coagulação, dispõe de resíduos de Lys essenciais para a ligação dos enzimas fibrinolíticos a esta proteína, e como tal, para o exercício da sua função. Uma vez homocisteiniladas, estas Lys podem comprometer o processo, e alterar a estrutura e função do fibrinogénio, que na presença de trombina, pode levar à modificação pró-trombótica da estrutura e função do coágulo de fibrina. *In vivo*, identificaram-se três Lys homocisteiniladas (α -Lys562, β -Lys344, e γ -Lys385) no plasma de indivíduos com deficiência de CBS, os quais, apresentaram hiper-homocisteinemia severa. O resíduo de α -Lys562, na molécula de fibrinogénio, está diretamente envolvido na ligação à plasmina e ao ativador do plasminogénio tecidual (tPA). A *N*-homocisteinilação desta Lys demonstrou comprometer a fibrinólise *in vivo*, o que explica o maior risco de doença arterial coronária nos indivíduos com deficiência de C β S. Os coágulos nestes pacientes são mais compactos, menos permeáveis e mais resistentes à fibrinólise (Szlauer et al., 2015).

In vitro, foi demonstrado que a *N*-homocisteinilação do fibrinogénio permite a formação de pontes dissulfeto com a albumina. A presença destes complexos fibrinogénio-albumina no coágulo comprometem também a fibrinólise promovida pelo tPA. Da mesma forma que Hemoglobina A1c é utilizada para monitorizar o controlo da diabetes *mellitus*, alguns autores defendem que o doseamento dos conjugados albumina-fibrinogénio são uteis como marcadores do dano proteico induzido pela Hcy (Sauls, Warren, & Hoffman, 2011).

4.1.2.5. Colagénio.

Estudos em ratinhos deficientes no enzima C β S, que caracteristicamente possuem valores elevados de Hcy e de HTL circulante, apresentam alterações do colagénio no sistema cardiovascular e esquelético (Perła-Kajan et al., 2016). No entanto, o mecanismo para estas alterações permanecia desconhecido, até que muito recentemente, Perła-Kajan et al. (2016) estudou o efeito da HTL em ratinhos deficientes no enzima C β S e, pela primeira vez, propôs um mecanismo que explica a anormalidade

do colagénio (Figura 10). Ao formar ligações amida com os resíduos de Lys do colagénio, a HTL compromete a formação das pontes cruzadas de piridinolina, necessárias para a reticulação do colagénio. O ponto crítico para a *N*-homocisteinilação foi localizado no *N*-telopéptido do colagénio tipo I α -1, no resíduo de Lys160. Importa referir que estudos paralelos permitiram concluir que a atividade e expressão do enzima lisina oxidase (LOx), na presença de Hcy, que catalisa a primeira etapa na formação das ligações cruzadas ao oxidar os resíduos de lisina, não são alteradas na presença de Hcy.

Na placa de ateroma complicada ocorre a formação de trombo com eventual embolização de parte, ou de todo o trombo. Esta placa instável tem o seu colagénio pouco reticulado, devido à falta das reticulações de piridinolina, o que facilita a formação e o descolamento do trombo.

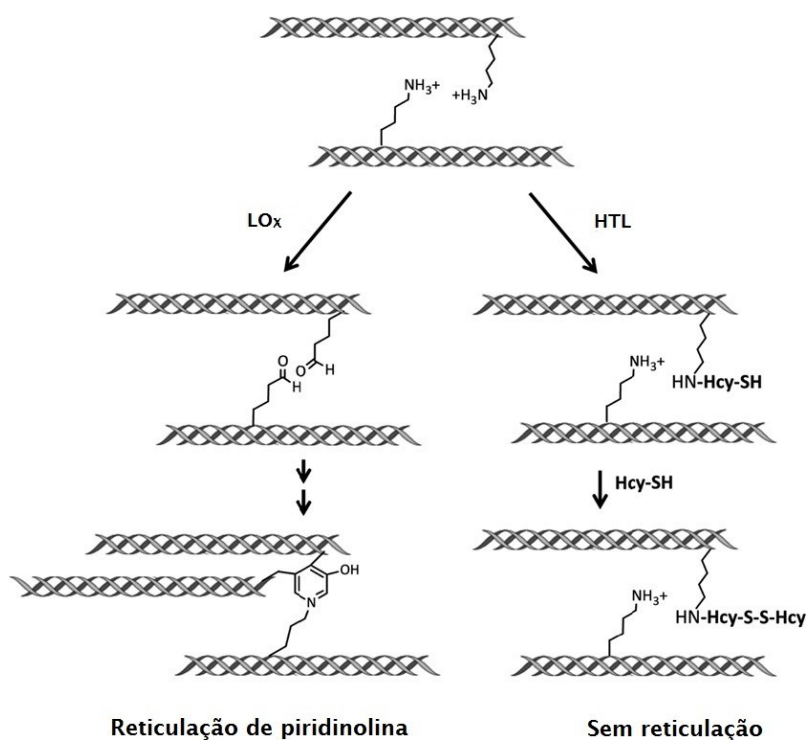


Figura 10 - Representação do efeito da *N*-homocisteinilação na reticulação de piridinolina do colagénio. Retirado de (Perla-Kajan et al., 2016)

4.1.2.6. Enzima Conversor da Angiotensina I.

Huang et al. (2015) levantaram a hipótese de que um aumento da concentração de Hcy, nas suas várias formas e metabolitos, incluindo a homocisteína e a HTL, podem aumentar a atividade do enzima conversor da angiotensina I, através da homocisteinilação do mesmo. Assim, níveis de angiotensina II e, conseqüentemente, da aldosterona, são elevados bem como a atividade da NADPH oxidase, que ao aumentar a

produção de superóxido, induz o *stress* oxidativo e, conseqüentemente, a disfunção endotelial.

4.1.3. Sistema Imunitário.

Sendo a aterosclerose uma doença inflamatória crônica, envolve a imunidade inata e adaptativa. A peroxidação lipídica tem um papel central na resposta, quer celular, quer humoral, ao gerar aldeídos reativos como o malondialdeído, que podem modificar os resíduos de Lys nas apoproteínas das LDL e em várias outras proteínas. Estes aductos lípidos oxidados/proteínas, como por ex. o malondialdeído-LDL, transportam novos epitopos que serão reconhecidos pela resposta imune inata e adaptativa (Jakubowski, 2013).

4.1.3.1. Resposta Adaptativa.

A incorporação da Hcy nas proteínas humanas induz a produção de autoanticorpos que reconhecem os epitopos *Nε*-Hcy-Lys das *N*-Hcy-proteínas. Estes autoanticorpos podem reagir com proteínas homocisteiniladas. Existe uma correlação direta entre os níveis destes autoanticorpos e a concentração da Hcy plasmática, mas não com os níveis plasmáticos de cisteína ou metionina (Jakubowski, 2013).

Os autoanticorpos *N*-Hcy-proteína estão particularmente elevados nos pacientes com doença arterial coronária e AVC. Alguns estudos mostraram que, no sexo masculino, estes autoanticorpos são preditores mais sensíveis de doença arterial precoce quando comparados com os níveis totais de Hcy (Jakubowski, 2013).

A presença de autoanticorpos *Nε*-Hcy-Lys pode também ser benéfica, ao promover a excreção de antígenos em circulação. Mas por outro lado, podem ter efeito nocivo quando, por exemplo, os epitopos *Nε*-Hcy-Lys que estão expostos à superfície das células endoteliais, se ligam aos anticorpos, recrutando os monócitos que, através dos seus recetores Fc, lesam as células endoteliais (Jakubowski, 2013).

O tratamento com ácido fólico por 3 a 6 meses reduz os níveis de autoanticorpos, mas apenas em indivíduos saudáveis (Jakubowski, 2013).

4.1.3.2. Resposta Inata.

As *N*-Hcy-proteínas, particularmente as *N*-Hcy-apoLDL, são captadas avidamente pelos macrófagos, quando comparadas com as LDL não modificadas. Além disso, os níveis de Proteína C Reativa correlacionam-se significativamente com os

níveis de autoanticorpos, sugerindo que as *N*-Hcy-proteínas são pró-inflamatórias. Por outro lado, estudos mais recentes demonstraram que a *N*-Hcy-albumina aumenta a ligação dos monócitos às células endoteliais ao induzir a expressão de quimiocinas pró-inflamatórias e citocinas tais como VCAM1, ICAM1 e MCP-1 quer nos monócitos quer nas células endoteliais. Curiosamente estas citocinas pró-inflamatórias também podem ser induzidas em culturas celulares humanas pela Hcy; porém, para que tal aconteça, são necessárias concentrações muito mais elevadas de Hcy, em relação à *N*-Hcy-albumina para que tal aconteça (Jakubowski, 2013).

Capasso et al. (2012) estudou o efeito da *N*-Hcy-albumina na expressão gênica das células endoteliais e verificou-se existir uma sobre-expressão de genes envolvidos na remodelação vascular, tais como ADAM17 e hsp60. A albumina pode ser internalizada na célula por endocitose e, dessa forma, pode determinar a alteração na expressão de citocinas e recetores.

A ADAM17 é uma metaloprotease que promove a produção da molécula de adesão celular, ICAM1 e do fator de necrose tumoral α (TNF- α). A hsp60 eleva-se quer a nível celular, na membrana e no citosol, quer no meio extracelular, e demonstrou tratar-se de um importante autoantígeno na aterosclerose. Os anticorpos anti-hsp60 ao ligarem-se à hsp60, na membrana da célula endotelial, induzem um efeito citotóxico. Por outro lado, os macrófagos expressam também ligandos para a hsp60 e, da sua interação, resulta a ativação desta célula (Capasso et al., 2012).

A concentração plasmática de hsp60 é significativamente mais elevada nos pacientes com doença cardiovascular (Capasso et al., 2012).

4.2. S-Homocisteinilação de Proteínas

4.2.1. Extracelulares.

Tendo em conta que a maior parte da homocisteína circulante se encontra ligada a proteínas, um dos mecanismos para explicar a sua citotoxicidade reside na capacidade de se ligar aos resíduos de cisteína das proteínas ou de clivar as pontes dissulfeto da cisteína, alterando dessa forma a estrutura e/ou função das proteínas. Os resíduos de Cys não só estão envolvidos no enrolamento e estabilidade das proteínas e formação de pontes dissulfeto com o grupo tiol livre da Hcy, como também participam em reações de oxirredução, e coordenam-se com iões metálicos (Silla, Sundaramoorthy, Talwar, & Sengupta, 2013).

4.2.1.1. Apo-LDL.

Vários estudos demonstraram que as apoproteínas das lipoproteínas também são suscetíveis à *S*-homocisteinilação, numa extensão proporcionalmente relacionada com a concentração plasmática de homocisteína. Por outro lado, a própria *N*-homocisteinilação aumenta o número de locais para a *S*-homocisteinilação (Zinellu et al., 2012).

A incubação das células endoteliais com Hcy-*S-S*-apoLDL mostrou aumentar a produção intracelular de ROS, levando a uma menor proliferação e viabilidade destas células, sugerindo um papel anti-angiogénico e pró-aterogénico para este tipo de modificação das LDL (Zinellu et al., 2009).

Por outro lado, é bem conhecido que as LDL podem atravessar as células endoteliais via transcitose para alcançarem o espaço subendotelial, numa taxa proporcional à concentração das LDL plasmáticas. Se as LDL *S*-homocisteiniladas ficarem retidas na íntima, estas podem libertar o seu conteúdo Hcy, que irá promover a oxidação de grupos tióis de outros compostos, ou a *S*-homocisteinilação de outras proteínas. Uma vez que a atividade de algumas metaloproteases é regulada pela *S*-homocisteinilação dos grupos tiol livres na cadeia polipeptídica, um aumento da concentração de Hcy, na placa de ateroma, pode ativar as metaloproteases latentes, elastolíticas – pro-MMP-2 contribuindo para a rutura da placa (Zinellu et al., 2012).

Por outro lado, no espaço subendotelial e na presença de oxigénio molecular, a auto-oxidação dos grupos tióis em compostos como a Hcy, leva à formação de H₂O₂, e isso pode promover a oxidação das LDL retidas, transformando-as em moléculas altamente aterogénicas que promovem o processo inflamatório no vaso (Zinellu et al., 2012; Zinellu et al., 2009).

Na doença renal crónica, as LDL são mais homocisteiniladas do que na população em geral, podendo ser responsável pelo incremento do transporte, quer da Hcy, quer da Cys, para o espaço subendotelial. Nos indivíduos com síndrome nefróticos que caracteristicamente apresentam níveis elevados de colesterol LDL, os níveis de apoB-LDL *S*-homocisteinilada relacionam-se com os níveis de creatinina sérica (Zinellu, Loriga, et al., 2010).

4.2.1.2. Albumina.

As placas ateroscleróticas são caracterizadas por um ambiente pró-inflamatório e pró-oxidante. Cerca de 70 % das proteínas da placa de ateroma são provenientes do

plasma, sendo predominante a albumina. A estrutura primária da albumina contém trinta e quatro resíduos de cisteína que contribuem com dezassete pontes dissulfeto na estrutura terciária, e um resíduo livre de cisteína (Cys34) com atividade redox. Por conseguinte, a *S*-homocisteinilação da albumina ocorre unicamente neste resíduo de aminoácido. Efetivamente, na comparação entre a albumina circulante e a presente na placa de ateroma, verificou-se que esta última sofre quase três vezes mais oxidação na Cys34, provavelmente devido ao ambiente mais oxidativo da placa (Lepedda et al., 2014).

Ver também secção 4.1.2.3.

4.2.2. Intracelulares.

Embora, a evidência da *S*-homocisteinilação das proteínas extracelulares esteja bem estabelecida, pouco é conhecido sobre as proteínas intracelulares alvo da *S*-homocisteinilação pela Hcy. A razão poderá ser pelo facto do citosol (ao contrário do RE) ser um ambiente redutor que não favorece o estabelecimento de ligações Hcy-*S-S*-proteínas (Silla et al., 2013).

4.2.2.1. Metalotioneína.

A metalotioneína (MT), uma proteína acompanhante (*chaperone*) intracelular atua como um ligador de zinco e removedor de radicais superóxido. Pela particular abundância de radicais Cys, pode ser alvo da *S*-homocisteinilação. A *S*-homocisteinilação desta proteína compromete a sua ligação ao zinco, aumentando a concentração deste ião no citosol e elevando a expressão do Egr-1 (*early growth response-1*), um fator de transcrição *zinc finger*, que regula a expressão dos genes pró-inflamatórios e pró-coagulantes associados à aterosclerose. Por outro lado, a homocisteinilação da MT impede a inativação do superóxido, o que aumenta o stress oxidativo (Figura 11) (Colgan & Austin, 2007).

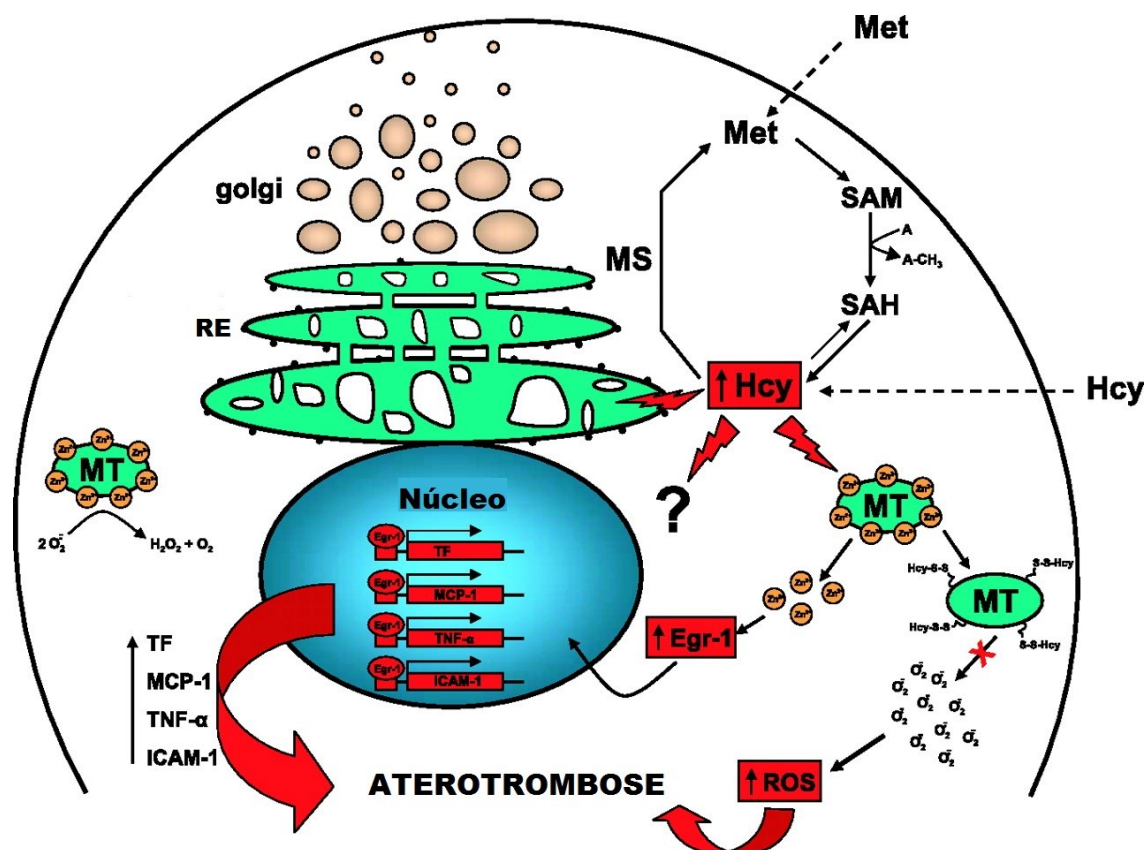


Figura 11 - A homocisteinilação da metalotioneína (MT) em células endoteliais vasculares humanas compromete o potencial redox intracelular e aumenta a expressão de *early growth response-1* (Egr-1). A MT é um *chaperone* de ligação de zinco intracelular ubíquo (Zn^{2+}) com propriedades de eliminação do radical superóxido (O_2^-) (lado esquerdo do diagrama). O aumento dos níveis de homocisteína intracelular (Hcy) nas células endoteliais pode ocorrer através de vários mecanismos, incluindo a captação de metionina extracelular (Met) e / ou Hcy, ou o comprometimento no metabolismo intracelular de Hcy. O aumento dos níveis intracelulares de Hcy facilita a S-homocisteinilação da MT no citosol, libertando Zn^{2+} e prejudicando as propriedades de remoção de radicais O_2^- da MT. A elevação no Zn^{2+} livre intracelular, atribuível à homocisteinilação de MT, aumenta a expressão de Egr-1, um factor de transcrição precoce / intermediário que medeia a expressão de uma ampla gama de factores celulares possuindo propriedades pró-aterogénicas e pró-trombóticas, incluindo a proteína quimiotáctica de monócitos-1 (MCP-1), factor de necrose tumoral- α (TNF- α), a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e o factor tissular (TF). Com o aumento da expressão de Egr-1 e de espécies reativas de oxigénio (ROS), induzida pela homocisteinilação, é de esperar uma disfuncionalidade por parte das células endoteliais, contribuindo assim para o desenvolvimento e progressão da aterotrombose (componentes representados em vermelho). Alvos intracelulares adicionais de homocisteinilação (retratado como ponto de interrogação) e seu efeito sobre o enovelamento de proteína / função no citoplasma e retículo endoplasmático de células endoteliais estão atualmente a ser investigadas. SAM indica S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosil-homocisteína; MS, metionina sintetase. A, molécula aceitadora; A-CH₃, molécula aceitadora metilada. Retirado de (Colgan & Austin, 2007).

4.2.2.2. Peroxirredoxina.

Uma das funções da peroxirredoxina 1 (Prx1), uma proteína intracelular, é a eliminação de H_2O_2 , que é mediada pela formação transiente de uma ponte dissulfeto intermolecular entre a Cys52 (centro catalítico) e a Cys173 de outra molécula de Prx1 (Lee et al., 2007). Riquier et al. (2014) verificaram que a Prx1 é alvo da

S-homocisteinilação ao nível da Cys52. No entanto falta provar se esta alteração inibe a atividade desta proteína ou se pelo contrário, a protege (Riquier et al., 2014).

4.3. Expressão Génica das Células Endoteliais

Já se tinha verificado que a HHcy alterava, em ratinhos, a expressão de alguns genes que se associam ao desenvolvimento de aterotrombose (Gurda, Handschuh, Kotkowiak, & Jakubowski, 2015). No entanto, não se sabe ao certo, qual das espécies de Hcy, são as responsáveis. Recentemente, Gurda, Handschuh, Kotkowiak, e Jakubowski (2015) verificaram, através das técnicas de *microarrays*, e de PCR quantitativo em tempo real, que a HTL e a *N*-homocisteinilação de proteínas do soro fetal bovino (proteínas modificadas pela incubação com HTL, que mimetizam a *N*-Hcy-proteína presentes no plasma de pacientes com defeito dos enzimas C β S e MTHFR), mais do que a Hcy, induzem alterações na expressão de genes nas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), sendo que cada um destes genes é importante para a homeostase celular e vascular, e responsável por um determinado mecanismo biomolecular celular. Contudo, neste estudo não é claro qual das espécies de Hcy e seus metabolitos, e quais as proteínas homocisteiniladas, estão envolvidas na desregulação génica. A HTL adicionada à monocultura de HUVECs, pode ser metabolizada pelas mesmas, originando *N*-Hcy-Proteínas intracelulares, bem como a Hcy adicionada pode formar pontes dissulfeto com as cisteínas das proteínas intracelulares (*S*-homocisteinilação). Através da análise bioinformática, os mesmos autores correlacionaram estas alterações génicas com várias categorias de doenças, inclusive a aterosclerose.

5. CONCLUSÃO

O papel da homocisteína na gênese da aterosclerose pode ser considerado direto, quando esta induz a *S*-homocisteinilação de proteínas, ou indireto, quando primeiramente é convertida em homocisteína-tiolactona, possibilitando a *N*-homocisteinilação de proteínas. Quanto à última, foi estabelecido não só o seu efeito a nível intracelular, nomeadamente, no *stress* do retículo endoplasmático, como também, a sua influência nas alterações estruturais e funcionais de proteínas extracelulares, caso do efeito da *N*-homocisteinilação das apolipoproteínas, da albumina, do colagénio, do enzima conversor da angiotensina I, e do próprio fibrinogénio. Sendo a aterosclerose uma doença inflamatória, não é de surpreender, a participação da *N*-homocisteinilação das proteínas, quer na resposta inata, quer adaptativa, da inflamação. Importa também salientar que a própria *N*-homocisteinilação favorece a *S*-homocisteinilação e, que esta última, por sua vez, pode alterar, a estrutura e função, quer de proteínas extracelulares, quer das intracelulares, tais como a metalotioneína e a peroxirredoxina.

Refira-se que estudos mais recentes levantaram a hipótese da homocisteinilação de proteínas alterar também a expressão génica das células endoteliais, contribuindo igualmente para a sua disfunção.

Os estudos analisados na presente monografia evidenciam que a homocisteinilação de proteínas acelera a progressão da aterotrombose.

Deste modo, o principal desafio é perceber qual a consequência que as proteínas homocisteiniladas têm na aterosclerose. Para esse efeito, são necessários mais estudos que aprofundem o conhecimento sobre os mecanismos aterogénicos provocados pela homocisteinilação de proteínas, e encontrar, eventualmente, outras proteínas homocisteiniladas envolvidas na aterogénese. Adicionalmente, será de toda a relevância ter em consideração, em futuros ensaios clínicos humanos, os diferentes metabolitos da homocisteína, nomeadamente a homocisteína-tiolactona e a *N*-homocisteinilação de proteínas, para além da homocisteína total. Esta estratégia poderá clarificar o contributo de todas as espécies da homocisteína na aterogénese.

Deste trabalho, conclui-se também, a importância em conhecer quais são as proteínas intracelulares que podem ser homocisteiniladas, *in vivo*, nas células do músculo liso e no tecido adiposo perivascular e perceber a sua influência na homeostase dessas células, para assim compreender o seu possível envolvimento na aterosclerose.

Finalmente, é importante um conhecimento mais detalhado da própria aterogénese e do envolvimento dos vários metabolitos da homocisteína, o que poderá permitir a identificação de biomarcadores das doenças cardiovasculares mais efetivos e, por outro lado, de novos alvos terapêuticos, no combate à aterosclerose.

6. BIBLIOGRAFIA

- Behrendt, D., & Ganz, P. (2002). Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *The American Journal of Cardiology*, *90*(10), L40–L48. [http://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02963-6](http://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02963-6)
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research*, *114*(12), 1852–1866. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>
- Capasso, R., Sambri, I., Cimmino, A., Salemme, S., Lombardi, C., Acanfora, F., ... Ingrosso, D. (2012). Homocysteinylated albumin promotes increased monocyte-endothelial cell adhesion and up-regulation of mcp1, hsp60 and adam17. *PLoS ONE*, *7*(2), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031388>
- Cecchi, E., Giglioli, C., Valente, S., Lazzeri, C., Gensini, G. F., Abbate, R., & Mannini, L. (2011). Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, *214*(2), 249–256. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.008>
- Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., & Stone, P. H. (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling. Molecular, cellular, and vascular behavior. *Journal of the American College of Cardiology*, *49*(25), 2379–2393. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.059>
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, *132*, 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.010>
- Ciaccio, M., & Bellia, C. (2010). Hyperhomocysteinemia and cardiovascular risk: effect of vitamin supplementation in risk reduction. *Current Clinical Pharmacology*, *5*, 30–36. <http://doi.org/10.2174/157488410790410551>
- Colgan, S. M., & Austin, R. C. (2007). Homocysteinylated albumin impairs intracellular redox homeostasis: the enemy within! *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(1), 8–11. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000254151.00086.26>
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, *115*(10), 1285–1295. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>

- Eckel, R. H., & Cornier, M.-A. (2014). Update on the ncep atp-iii emerging cardiometabolic risk factors. *BMC Medicine*, *12*(1), 115. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-12-115>
- Fogelstrand, P., & Borén, J. (2012). Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *22*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.numecd.2011.09.007>
- Fridman, O., Fuchs, A. G., Porcile, R., Morales, A. V., & Gariglio, L. O. (2011). Paraoxonasa : sus múltiples funciones y regulación farmacológica, *81*(3), 251–260.
- Galkina, E., & Ley, K. (2007). Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(11), 2292–301. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.149179>
- Ganguly, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal*, *14*(1), 6. <http://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>
- Garel, J., & Tawfik, D. S. (2006). Mechanism of hydrolysis and aminolysis of homocysteine thiolactone. *Chemistry - A European Journal*, *12*, 4144–4152. <http://doi.org/10.1002/chem.200501145>
- Genoud, V., Castañon, M., Lauricella, A. M., & Quintana, I. (2014). Characterization of n-homocysteinylated albumin adducts. *Protein Journal*, *33*(1), 85–91. <http://doi.org/10.1007/s10930-013-9540-z>
- Ghiadoni, L., Bruno, R. M., & Gori, T. (2014). Endothelial function testing and cardiovascular disease: focus on peripheral arterial tonometry. *Vascular Health and Risk Management*, *577*. <http://doi.org/10.2147/VHRM.S44471>
- Gimbrone, M. A., & García-Cardena, G. (2013). Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology*, *22*(1), 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.carpath.2012.06.006>
- Guo, H.-Y., Xu, F.-K., Lv, H. T., Liu, L. Bin, Ji, Z., Zhai, X. Y., ... Chi, J. F. (2014). Hyperhomocysteinemia independently causes and promotes atherosclerosis in ldl receptor-deficient mice. *Journal of Geriatric Cardiology*, *11*(1), 74–78. <http://doi.org/10.3969/j.issn.1671-5411.2014.01.013>
- Guo, S., Pang, H., Guo, H., Zhang, M., He, J., Yan, Y., ... Ding, Y. (2015). Ethnic differences in the prevalence of high homocysteine levels among low-income rural kazakh and uyghur adults in far western china and its implications for preventive public health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*,

- 12(5), 5373–5385. <http://doi.org/10.3390/ijerph120505373>
- Gurda, D., Handschuh, L., Kotkowiak, W., & Jakubowski, H. (2015). Homocysteine thiolactone and n-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids*, 1319–1339. <http://doi.org/10.1007/s00726-015-1956-7>
- Hahn, C., & Schwartz, M. A. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 53–62. <http://doi.org/10.1038/nrm2596>
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Tratado de fisiologia médica*. 12ª edição. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Editora.
- Higashi, Y. (2015). Assessment of endothelial function. History, methodological aspects, and clinical perspectives. *International Heart Journal*, 56(2), 125–134. <http://doi.org/10.1536/ihj.14-385>
- Huang, A., Pinto, J. T., Froogh, G., Kandhi, S., Qin, J., Wolin, M. S., ... Sun, D. (2015). Role of homocysteinylation of ace in endothelial dysfunction of arteries. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 308(2), H92–H100. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00577.2014>
- Ishimine, N., Usami, Y., Nogi, S., Sumida, T., Kurihara, Y., Matsuda, K., ... Tozuka, M. (2010). Identification of n-homocysteinylated apolipoprotein ai in normal human serum. *Annals of Clinical Biochemistry*, 47(Pt 5), 453–9. <http://doi.org/10.1258/acb.2010.010035>
- Jain, M. K., Sangwung, P., & Hamik, A. (2014). Regulation of an inflammatory disease: kruppel-like factors and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(3), 499–508. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301925>
- Jakubowski, H. (2000). Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *The Journal of Nutrition*, 130(2S Suppl), 377S–381S. <http://doi.org/0022-3166/00>
- Jakubowski, H. (2000). Translational incorporation of s-nitrosohomocysteine into protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21813–21816. <http://doi.org/10.1074/jbc.C000280200>
- Jakubowski, H. (2001). Protein n-homocysteinylation: implications for atherosclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 55(8), 443–447. [http://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)00085-3](http://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)00085-3)
- Jakubowski, H. (2004). Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cellular*

- and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61(4), 470–487.
<http://doi.org/10.1007/s00018-003-3204-7>
- Jakubowski, H. (2006a). Mechanism of the condensation of homocysteine thiolactone with aldehydes. *Chemistry - A European Journal*, 12(31), 8039–8043.
<http://doi.org/10.1002/chem.200600785>
- Jakubowski, H. (2006b). Pathophysiological consequences of homocysteine excess. In *The Journal of Nutrition* (pp. 1741–1749).
- Jakubowski, H. (2013). *Homocysteine in protein structure/function and human disease*. Vienna, Austria: Springer Vienna. <http://doi.org/10.1007/978-3-7091-1410-0>
- Jakubowski, H., & Głowacki, R. (2011). Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. In *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 55, pp. 81–103).
<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-387042-1.00005-8>
- Jakubowski, H., Perla-Kajan, J., Finnell, R. H., Cabrera, R. M., Wang, H., Gupta, S., ... Shih, D. M. (2009). Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein n-homocysteinylation in mice. *The FASEB Journal*, 23(6), 1721–1727. <http://doi.org/10.1096/fj.08-127548>
- Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2015). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19ª edição. New York, USA: McGraw-Hill.
- Koubaa, N., Nakbi, A., Hammami, S., Attia, N., Mehri, S., Hamda, K. Ben, ... Hammami, M. (2009). Association of homocysteine thiolactonase activity and pon1 polymorphisms with the severity of acute coronary syndrome. *Clinical Biochemistry*, 42(9), 771–776. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.02.017>
- Kullo, I. J., & Cooper, L. T. (2010). Early identification of cardiovascular risk using genomics and proteomics. *Nature Reviews Cardiology*, 7(6), 309–317.
<http://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.53>
- Lai, W. K. C., & Kan, M. Y. (2015). Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 67(1), 1–12.
<http://doi.org/10.1159/000437098>
- Leach, N. V., Dronca, E., Vesa, S. C., Sampelean, D. P., Craciun, E. C., Lupsor, M., ... Grigorescu, M. (2014). Serum homocysteine levels, oxidative stress and cardiovascular risk in non-alcoholic steatohepatitis. *European Journal of Internal Medicine*, 25(8), 762–767. <http://doi.org/10.1016/j.ejim.2014.09.007>
- Lee, W., Choi, K. S., Riddell, J., Ip, C., Ghosh, D., Park, J. H., & Park, Y. M. (2007).

- Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of cys83 in prx1 underscores the structural and functional differences between prx1 and prx2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 22011–22022. <http://doi.org/10.1074/jbc.M610330200>
- Lepedda, A. J., Zinellu, A., Nieddu, G., Muro, P. De, Carru, C., Spirito, R., ... Formato, M. (2014). Human serum albumin cys 34 oxidative modifications following infiltration in the carotid atherosclerotic plaque. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/690953>
- Lewandowski, C. M. (2000). *Homocysteine and Vascular Disease*. (K. Robinson, Ed.) *The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference*, 230. Dordrecht: Springer Netherlands. <http://doi.org/10.1007/978-94-017-1789-2>
- Ley, K., Miller, Y. I., & Hedrick, C. C. (2011). Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7), 1506–1516. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221127>
- Libby, P. (2009). Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl, S352-7. <http://doi.org/10.1194/jlr.R800099-JLR200>
- Libby, P. (2014). The vascular biology of atherosclerosis. In E. Braunwald, D. L. Mann, D. P. Zipes, R. O. Bonow, & P. Libby (Eds.), *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* (pp. 873–890). 10^a edição. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2009). Inflammation in atherosclerosis. From pathophysiology to practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 54, 2129–2138. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009>
- Marsillach, J., Suzuki, S. M., Richter, R. J., McDonald, M. G., Rademacher, P. M., MacCoss, M. J., ... Furlong, C. E. (2014). Human valacyclovir hydrolase/biphenyl hydrolase-like protein is a highly efficient homocysteine thiolactonase. *PLoS ONE*, 9(10), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0110054>
- McCully, K. S. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 56(1), 111–128.
- McCully, K. S. (2015a). Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 8(2), 211–219.

- <http://doi.org/10.1586/17512433.2015.1010516>
- McCully, K. S. (2015b). Homocysteine metabolism, atherosclerosis, and diseases of aging. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 6, pp. 471–505). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/cphy.c150021>
- Mei, X.-Y., He, X.-D., Huang, L., Qi, D.-S., Nie, J., Li, Y., ... Zhao, S.-M. (2016). Dehomocysteinylation is catalysed by the sirtuin-2-like bacterial lysine deacetylase cobb. *The FEBS Journal*. <http://doi.org/10.1111/febs.13912>
- Miyazaki, A., Sagae, N., Usami, Y., Sato, M., Kameda, T., Yoshimoto, A., ... Tozuka, M. (2014). N-homocysteinylation of apolipoprotein a-i impairs the protein's antioxidant ability but not its cholesterol efflux capacity. *Biological Chemistry*, 395(6), 641–648. <http://doi.org/10.1515/hsz-2013-0262>
- Moll, S., & Varga, E. A. (2015). Homocysteine and mthfr mutations. *Circulation*, 132(1), e6–e9. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013311>
- Nekrassova, O., Lawrence, N. S., & Compton, R. G. (2003). Analytical determination of homocysteine: a review. *Talanta*, 60, 1085–1095. [http://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00173-5](http://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00173-5)
- Nygård, O., Vollset, S. E., Refsum, H., Brattström, L., & Ueland, P. M. (1999). Total homocysteine and cardiovascular disease. *Journal of Internal Medicine*, 246, 425–454. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.49.1.31>
- Olas, B., Kołodziejczyk, J., & Malinowska, J. (2010). May modifications of human plasma proteins stimulated by homocysteine and its thiolactone induce changes of hemostatic function of plasma in vitro? *General Physiology and Biophysics*, 29(2), 186–193. http://doi.org/10.4149/gpb_2010_02_186
- Ozen, G., Daci, A., Norel, X., & Topal, G. (2015). Human perivascular adipose tissue dysfunction as a cause of vascular disease: focus on vascular tone and wall remodeling. *European Journal of Pharmacology*, 766, 16–24. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.012>
- Ozkan, Y., Ozkan, E., & Simşek, B. (2002). Plasma total homocysteine and cysteine levels as cardiovascular risk factors in coronary heart disease. *International Journal of Cardiology*, 82(3), 269–77. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911915>
- Perła-Kaján, J., Twardowski, T., & Jakubowski, H. (2007). Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids*, 32, 561–572. <http://doi.org/10.1007/s00726-006-0432-9>

- Perła-Kajan, J., Utyro, O., Rusek, M., Malinowska, A., Sitkiewicz, E., & Jakubowski, H. (2016). N-homocysteinylated impairs collagen cross-linking in cystathionine β -synthase-deficient mice: a novel mechanism of connective tissue abnormalities. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, (6). <http://doi.org/10.1096/fj.201600539>
- Poloni, S., Blom, H., & Schwartz, I. (2015). Stearoyl-coa desaturase-1: is it the link between sulfur amino acids and lipid metabolism? *Biology*, 4(2), 383–396. <http://doi.org/10.3390/biology4020383>
- Rafii, M., Elango, R., House, J. D., Courtney-Martin, G., Darling, P., Fisher, L., & Pencharz, P. B. (2009). Measurement of homocysteine and related metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877, 3282–3291. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.002>
- Riquier, S., Breton, J., Abbas, K., Cornu, D., Bouton, C., & Drapier, J.-C. (2014). Peroxiredoxin post-translational modifications by redox messengers. *Redox Biology*, 2(1), 777–785. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.001>
- Ross, R. (1999). Inflammation or atherogenesis. *The New England Journal of Medicine*, 340(2), 115–126. <http://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>
- Salisbury, D., & Bronas, U. (2014). Inflammation and immune system contribution to the etiology of atherosclerosis. *Nursing Research*, 63(5), 375–385. <http://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000053>
- Sauls, D. L., Warren, M., & Hoffman, M. (2011). Homocysteinylated fibrinogen forms disulfide-linked complexes with albumin. *Thrombosis Research*, 127(6), 576–581. <http://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.01.009>
- Sena, C. M., Pereira, A. M., & Seica, R. (2013). Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2216–2231. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.08.006>
- Sharifi, E., Salimi, A., & Shams, E. (2012). Dna/nickel oxide nanoparticles/osmium(iii)-complex modified electrode toward selective oxidation of l-cysteine and simultaneous detection of l-cysteine and homocysteine. *Bioelectrochemistry*, 86, 9–21. <http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.12.013>
- Sharma, G. S., Kumar, T., Dar, T. A., & Singh, L. R. (2015). Protein n-

- homocysteinylation: from cellular toxicity to neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(11), 2239–2245. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.013>
- Sharma, G. S., Kumar, T., & Singh, L. R. (2014). N-homocysteinylation induces different structural and functional consequences on acidic and basic proteins. *PLoS ONE*, 9(12), 1–22. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0116386>
- Silla, Y., Sundaramoorthy, E., Talwar, P., & Sengupta, S. (2013). S-linked protein homocysteinylation: identifying targets based on structural, physicochemical and protein-protein interactions of homocysteinylated proteins. *Amino Acids*, 44(5), 1307–1316. <http://doi.org/10.1007/s00726-013-1465-5>
- Škovierová, H., Vidomanová, E., Mahmood, S., Sopková, J., Drgová, A., Červeňová, T., ... Lehotský, J. (2016). The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1733. <http://doi.org/10.3390/ijms17101733>
- Stamler, J. S., Osborne, J. A., Jaraki, O., Rabbani, L. E., Mullins, M., Singel, D., & Loscalzo, J. (1993). Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *Journal of Clinical Investigation*, 91(1), 308–318. <http://doi.org/10.1172/JCI116187>
- Szasz, T., Bomfim, G. f., & Webb. (2013). The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vascular Health and Risk Management*, 9, 105. <http://doi.org/10.2147/VHRM.S33760>
- Szlauer, A., Mielimonka, A., Głowacki, R., Borowczyk, K., Stachniuk, J., & Undas, A. (2015). Protein n-linked homocysteine is associated with recurrence of venous thromboembolism. *Thrombosis Research*, 136(5), 911–916. <http://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.09.002>
- Tcherkas, Y. V., & Denisenko, a. D. (2001). Simultaneous determination of several amino acids, including homocysteine, cysteine and glutamic acid, in human plasma by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 913, 309–313. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01201-2](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01201-2)
- Vignini, a, Nanetti, L., Bacchetti, T., Ferretti, G., Curatola, G., & Mazzanti, L. (2004). Modification induced by homocysteine and low-density lipoprotein on human aortic endothelial cells: an in vitro study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(9), 4558–4561. <http://doi.org/10.1210/jc.2004-0419>

- Welch, G. N., Upchurch, G., & Loscalzo, J. (1997). Hyperhomocyst(e)inemia and atherothrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 811(1 Atheroscleros), 48-58-9. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51988.x>
- World Health Organization. (2011). *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. (S. Mendis, P. Puska, & B. Norrving, Eds.). Geneva, Switzerland: Autor.
- World Health Organization. (2014a). *Global health estimates 2014 summary tables: deaths by cause, age and sex, by world bank income category, 2000-2012*. Geneva. Disponível em http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GHE_DthWBInc_2000_2012.xls?ua=1, consultado a 18 de setembro de 2016
- World Health Organization. (2014b). *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. Geneva, Switzerland: Autor.
- Wu, S., Gao, X., Yang, S., Meng, M., Yang, X., & Ge, B. (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction induced by homocysteine thiolactone. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 29, n/a-n/a. <http://doi.org/10.1111/fcp.12101>
- Zaborska, K. E., Wareing, M., & Austin, C. (2016). Comparisons between perivascular adipose tissue and the endothelium in their modulation of vascular tone. *British Journal of Pharmacology*. <http://doi.org/10.1111/bph.13648>
- Zang, T., Pottenplackel, L., Handy, D., Loscalzo, J., Dai, S., Deth, R., ... Ma, J. (2016). Comparison of protein n-homocysteinylation in rat plasma under elevated homocysteine using a specific chemical labeling method. *Molecules*, 21(9), 1195. <http://doi.org/10.3390/molecules21091195>
- Zinellu, A., Loriga, G., Scanu, B., Pisanu, E., Sanna, M., Deiana, L., ... Carru, C. (2010). Increased low-density lipoprotein s-homocysteinylation in chronic kidney disease. *American Journal of Nephrology*, 32(3), 242-248. <http://doi.org/10.1159/000319012>
- Zinellu, A., Sotgia, S., Scanu, B., Arru, D., Cossu, A., Posadino, A. M., ... Carru, C. (2015). N- and s-homocysteinylation reduce the binding of human serum albumin to catechins. *European Journal of Nutrition*, 1-7. <http://doi.org/10.1007/s00394-015-1125-5>
- Zinellu, A., Sotgia, S., Scanu, B., Deiana, L., Talanas, G., Terrosu, P., & Carru, C. (2012). Low density lipoprotein s-homocysteinylation is increased in acute

- myocardial infarction patients. *Clinical Biochemistry*, 45(4–5), 359–362.
<http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.12.017>
- Zinellu, A., Sotgia, S., Scanu, B., Pintus, G., Posadino, A. M., Cossu, A., ... Carru, C. (2009). S-homocysteinylation of ldl apolipoprotein b adversely affects human endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis*, 206(1), 40–6.
<http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.035>
- Zinellu, A., Sotgia, S., Scanu, B., Pisanu, E., Sanna, M., Sati, S., ... Carru, C. (2010). Determination of homocysteine thiolactone, reduced homocysteine, homocystine, homocysteine–cysteine mixed disulfide, cysteine and cystine in a reaction mixture by overimposed pressure/voltage capillary electrophoresis. *Talanta*, 82(4), 1281–1285. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.06.054>