

# **EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATOS JOVENS**

**MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>1</sup>; GABRIELA DEBOM<sup>2</sup>; PATHISE OLIVEIRA<sup>3</sup>; REJANE TAVARES<sup>4</sup>; FRANCIELI STEFANELLO<sup>5</sup>; ROSELIA SPANEVELLO<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas - [mayara\\_sandrielly@hotmail.com](mailto:mayara_sandrielly@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas - [gabidebom@gmail.com](mailto:gabidebom@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - [pathisesouto@hotmail.com](mailto:pathisesouto@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - [tavares.rejane@gmail.com](mailto:tavares.rejane@gmail.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - [fmstefanello@gmail.com](mailto:fmstefanello@gmail.com)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas - [rspanevello@gmail.com](mailto:rspanevello@gmail.com)

## **1. INTRODUÇÃO**

Elevados níveis de metionina (Met) e de seus metabólitos podem ocorrer em diversas anormalidades genéticas, especialmente na deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT) (MUDD, 2011). A metabolização inadequada deste aminoácido, resulta na formação de metabólitos tóxicos como a metionina sulfóxido (MetO), e na deficiência de produtos importantes como a S-adenosilmetionina (SAM). Pacientes hipermetioninêmicos apresentam várias alterações neurológicas e hepáticas, entretanto os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nestas alterações ainda não foram completamente elucidados (MUDD, 2000; 2001).

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e os níveis de defesas antioxidantes do organismo (BIRBEN et al., 2012). Quando em excesso, as espécies reativas podem causar danos a biomoléculas como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos comprometendo assim o funcionamento celular. Desta forma, o estresse oxidativo tem sido associado à etiologia de várias patologias incluindo doenças hepáticas agudas e crônicas (LOGUERCIO E FEDERICO, 2003; KIM et al., 2004).

Estudos prévios já demonstraram que a exposição prolongada à Met induz estresse oxidativo e promove alterações histológicas em fígado de ratos (STEFANELLO et al., 2009). Além disto, também foram descritas alterações em parâmetros de estresse oxidativo em fígados de ratos jovens após a administração aguda de Met e/ou MetO (COSTA et al., 2013). Neste contexto, tendo em vista que os mecanismos fisiopatológicos da hipermetioninemia ainda são pouco compreendidos, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da administração crônica da Met, MetO e da associação Met/MetO sobre parâmetros bioquímicos séricos e de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 28 ratos Wistar obtidos do Biotério Central da UFPel, os quais foram mantidos em ambiente com temperatura (20-24°C) e umidade (40-60%) controladas, água e alimento *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 3527).

## *2.2 Modelo experimental de hipermetioninemia*

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=7): Controle (solução salina), Met (0,2 - 0,4 g/kg de peso corporal), MetO (0,05 - 0,1 g/kg de peso corporal) e MIX (associação de Met + MetO). Os animais foram tratados diariamente recebendo duas injeções subcutâneas com intervalo de 8 h entre as injeções, do 6º ao 28º dia de vida. As doses utilizadas e o tempo de tratamento foram baseados em trabalhos da literatura (STEFANELLO et al. 2007). Após 12 h da última injeção, os animais foram submetidos à eutanásia e o sangue e fígado foram coletados para as posteriores análises bioquímicas.

## *2.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos séricos*

O sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 15 min para a obtenção do soro. No soro foram avaliados os níveis de glicose, colesterol total, triglicerídeos (TG) e ureia através de kits comerciais Labtest®.

## *2.4 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo*

O fígado foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 140 mM de KCl (pH 7,4) e centrifugado a 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para avaliar os seguintes parâmetros de estresse oxidativo:

- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): segundo o método de ESTERBAUER & CHEESEMAN (1990) o qual mede a formação de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica).
- Conteúdo tiólico total: avaliado pelo método de AKSENOV & MARKESBERY (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB).
- Atividade da catalase (CAT): mensurada conforme o método descrito por AEBI (1984), baseado na decomposição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Atividade da superóxido dismutase (SOD): avaliada pelo método de MISRA & FRIDOVICH (1972), baseado na auto-oxidação da adrenalina pela SOD.
- Atividade da glutational peroxidase (GPX): avaliada através de kit comercial (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, United Kingdom).

## *2.5 Análise estatística dos dados*

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $P < 0,05$ . Todos os dados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão.

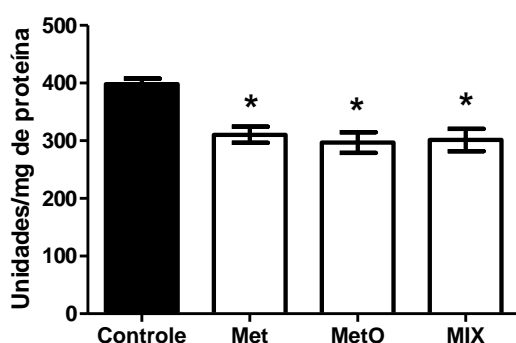
# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados demonstraram um aumento nos níveis de glicose e ureia nos animais dos grupos Met, MetO e MIX quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Um aumento nos níveis de triglicerídeos foi observado somente no grupo MetO ( $P < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de colesterol total entre os grupos avaliados (Tabela 1).

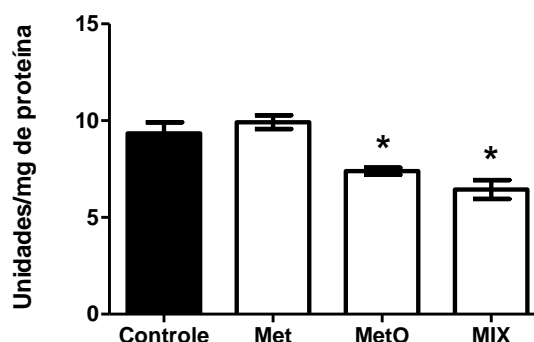
**Tabela 1:** Parâmetros bioquímicos em soro de ratos jovens submetidos ao tratamento crônico com Met, MetO e MIX. \*Diferente do grupo controle ( $P<0,05$ ).

Grupos	Glicose (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
Controle	95,3±3,1	44,0±2,4	26,2±0,8	40,11±4,4
Met	113,7±4,0*	43,6±1,1	32,2±2,9	75,1±5,6*
MetO	118,5±1,6*	37,7±1,1	38,0±1,8*	75,0±7,4*
MIX	126,4±2,2*	39,4±2,4	33,2±2,8	88,7±10,3*

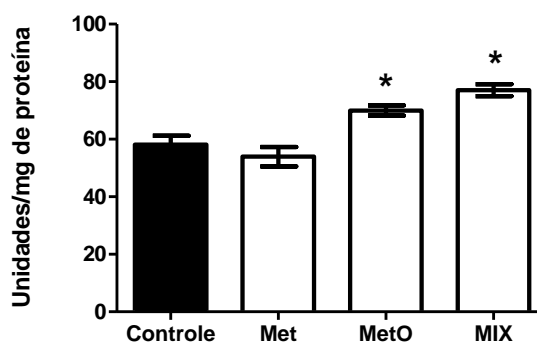
Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, não foram observadas alterações nos níveis de TBARS e do conteúdo tiólico total no fígado dos animais de nenhum grupo avaliado. Entretanto pode-se observar que nos grupos Met, MetO e MIX houve uma inibição significativa da atividade da CAT ( $P<0,05$ ) (Figura 1). A atividade da enzima SOD também foi diminuída nos grupos MetO e MIX ( $P<0,05$ ) (Figura 2). Por outro lado, houve um aumento significativo na atividade da enzima GPX em fígado de ratos tratados com MetO e MIX ( $P<0,05$ ) (Figura 3).



**Figura 1:** Atividade da enzima CAT em fígado de ratos jovens submetidos à administração crônica de Met, MetO e MIX. \*Diferente do grupo controle ( $P<0,05$ ).



**Figura 2:** Atividade da enzima SOD em fígado de ratos jovens submetidos à administração crônica de Met, MetO e MIX. \*Diferente do grupo controle ( $P<0,05$ ).



**Figura 3:** Atividade da enzima GPX em fígado de ratos jovens submetidos à administração crônica de Met, MetO e MIX. \*Diferente do grupo controle ( $P<0,05$ ).

Os efeitos da administração crônica de Met sobre parâmetros de estresse oxidativo corroboram com os achados prévios do nosso grupo de pesquisa (STEFANELLO et al., 2009). Sabe-se que a enzima SOD catalisa a dismutação do radical superóxido, formando  $H_2O_2$  que é reduzido pelas enzimas CAT e GPX formando compostos não reativos (BIRBEN et al., 2012). Sendo assim, uma diminuição da atividade da SOD e da CAT poderia levar a um aumento nos níveis dessas espécies reativas no fígado. Em contraste, ocorreu um aumento da atividade da GPX, sugerindo um provável efeito compensatório ao acúmulo de  $H_2O_2$ .

Com relação ao perfil bioquímico sérico, os elevados níveis de aminoácidos na corrente sanguínea poderiam justificar o aumento da glicemia, provavelmente pela ativação da gliconeogênese, assim como o aumento da síntese de TG e de ureia, as quais estão diretamente relacionadas ao tecido hepático.

#### 4. CONCLUSÃO

A administração crônica de Met e/ou MetO alterou o perfil bioquímico e parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens, sugerindo uma possível associação destes achados com as alterações hepáticas presentes na hipermetioninemia. Porém, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nestas alterações.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, n.1 p.121-126, 1984.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.302, n.2-3, p.141-145, 2001.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ Journal**, v.5, n.1, p.9-19, 2012.
- COSTA, M.Z.; SILVA, T.M.; FLORES, N.P.; SCHMITZ, F.; SCHERER, E.B.S.; VIAU, C.M.; SAFFI, J.; BARSCHAK, A.G.; WYSE, A.T.; SPANEVELLO, R.M.; STEFANELLO, F.M. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 384, n.1-2, p 21-28, 2013.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, n.1, p.407-421, 1990.
- KIM, Y.S.; JHON, D.Y.; LEE, K.Y. Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells. **Experimental e Molecular Medicine**, v.36, n.2, p.157-164, 2004.
- LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.34, n1, p1-10, 2003.
- MUDD, S.H.; JENDEN, D.J.; CAPDEVILA, A.; ROCH, M.; LEVY, H.L.; WAGNER, C. Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. **Metabolism**, v.49, n.12, p.1542-1547, 2000.
- MUDD, S.H. Hypermethioninemias of Genetic and Non-Genetic Origin: A Review. **American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)**, v.157, n.1, p.3-32, 2011.
- MISRA HP, FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.10, p.3170-3175, 1972.
- STEFANELLO, F.M.; MATTÉ, C.; SCHERER, E.B.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v.160, n.1, p.1-4, 2007.
- STEFANELLO, F.M.; MATTÉ, C.; PEDERZOLLI, C.D.; KOLLING, J.; MESCKA, C.P.; LAMERS, M.L.; DE ASSIS, A.M.; PERRY, M.L.; DOS SANTOS M.F.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T. Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. **Biochimie**, v.91, n.1, p.961-968, 2009.