

EXPOSIÇÃO CRÔNICA A METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO ALTERA OS NÍVEIS DE NITRITO E DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS JOVENS

ANITA ALMEIDA AVILA¹; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES²; BRUNA MATTOS³; LUIZA SPOHR⁴; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – anita_a_avila@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – mayara_sandrielly@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – brunamtt@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A metionina (Met) é um aminoácido essencial que participa de diversos processos biológicos fundamentais no organismo (SUAREZ et al., 2010). A enzima metionina adenosiltransferase (MAT) é responsável por metabolizar este aminoácido formando o produto S-adenosilmetionina (SAM) (FINKELSTEIN, 2006). A deficiência da MAT é a principal alteração genética encontrada em casos de hipermetioninemia, que por sua vez é caracterizada por um acúmulo tecidual de Met, juntamente com uma deficiência do produto SAM e um aumento de metabólitos como a metionina sulfóxido (MetO) (MUDD et al., 2001, 2000). Os pacientes hipermetioninêmicos podem manifestar disfunções neurológicas como déficit cognitivo, desmielinização, edema e retardo no desenvolvimento psicomotor (SURTEES et al., 1991). Entretanto, os mecanismos envolvidos nestas alterações ainda não são bem estabelecidos.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento da produção de oxidantes e/ou diminuição dos níveis de defesas antioxidantes. O desequilíbrio entre a formação e a remoção de espécies reativas pode levar a um dano oxidativo a biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, comprometendo assim a integridade celular (LIANG et al., 2012; VOGT, 1995). A Met, por ser um aminoácido sulfurado, é especialmente sensível a oxidação por espécies reativas. Neste contexto, estudos *in vitro* já demonstraram que a Met induz estresse oxidativo e altera importantes parâmetros do metabolismo energético (STRECK et al., 2002, 2003). Além disto, já foi demonstrado também que a administração aguda de Met e/ou MetO altera a atividade de enzimas antioxidantes em córtex cerebral de ratos (SOARES et al., 2017). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento crônico com Met e/ou MetO altera os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrito em estruturas cerebrais de ratos jovens.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados 28 ratos Wistar, os quais foram obtidos do Biotério Central da UFPEL. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas, água e ração *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os

procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEAA 3527).

2.2 Modelo experimental de hipermetioninemia

Os animais foram divididos em quatro grupos ($n=7$): (salina), Met (0,2 - 0,4 g/kg), MetO (0,05 - 0,1 g/kg) e 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. Após 12 horas da última injeção, os animais foram submetidos à eutanásia e o córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo foram coletados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as posteriores análises.

2.3 Quantificação das espécies reativas de oxigênio (ERO)

Este ensaio foi realizado segundo Ali et al. (1992). A oxidação de diacetato de dicloro-dihidrofluoresceína (DCFH-DA) para 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi usada para a detecção de ERO. A emissão de intensidade de fluorescência de DCF foi registrada a 525 e 488 nm de excitação após 30 min da adição de DCFH-DA ao meio. A quantificação de ERO foi expressa em $\mu\text{mol DCF}$ por mg de proteína.

2.4 Quantificação dos níveis de nitrito

Os níveis de nitrito foram avaliados em sobrenadante das estruturas cerebrais através de reação colorimétrica com Griess (STUEHR et al., 1989) em 540nm. A quantidade de nitrito foi expressa como μmol de nitrito por mg de proteína.

2.5 Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que os níveis de ERO tanto em hipocampo quanto em estriado aumentaram significativamente nos grupos Met, MetO e Met+MetO em comparação com o controle ($P<0,05$) (Figura 1). Não foram observadas diferenças nos níveis de ERO em córtex cerebral e cerebelo em nenhum dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Em hipocampo, pode-se observar que houve uma redução significativa dos níveis de nitrito nos animais tratados com MetO e Met+MetO quando comparado ao grupo controle ($P<0,05$) (Figura 2). Os animais tratados com Met, MetO, Met+MetO também tiveram uma redução nos níveis de nitrito em estriado em relação ao controle ($P<0,05$). Nenhuma alteração foi observada em córtex cerebral e cerebelo (Figura 2).

O aumento da produção de ERO pode danificar biomoléculas resultando em alterações celulares (BARBOSA, et al., 2010), as quais podem comprometer a função das estruturas cerebrais o que poderia implicar, pelo menos em parte, nos sintomas neurológicos de pacientes hipermetioninêmicos.

Além disto, cabe salientar que o nosso grupo de pesquisa já demonstrou anteriormente que elevadas doses de Met e/ou MetO é capaz de induzir estresse oxidativo em cérebro, fígado, rim de ratos jovens, bem como em cultivo primário de macrófagos (SANTOS, et al., 2016; SOARES et al., 2017a). Desta forma, podemos inferir que esse desequilíbrio nos níveis de espécies reativas em

diferentes estruturas cerebrais pode contribuir para a fisiopatologia da hipermetioninemia.

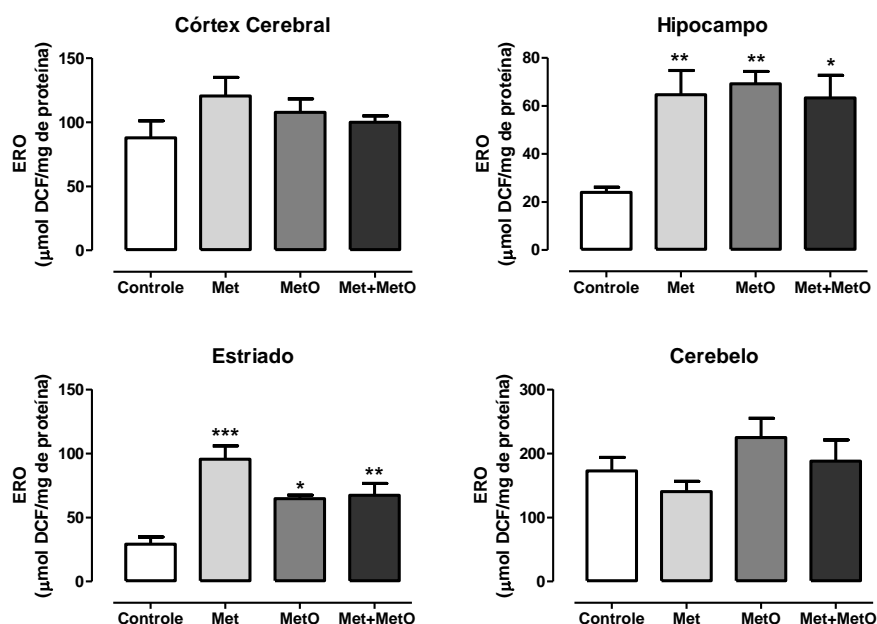


Figura 1: Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo de ratos jovens tratados cronicamente com metionina (Met), metionina sulfóxido (MetO) e associação de metionina e metionina sulfóxido (Met+MetO). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ diferente do controle.

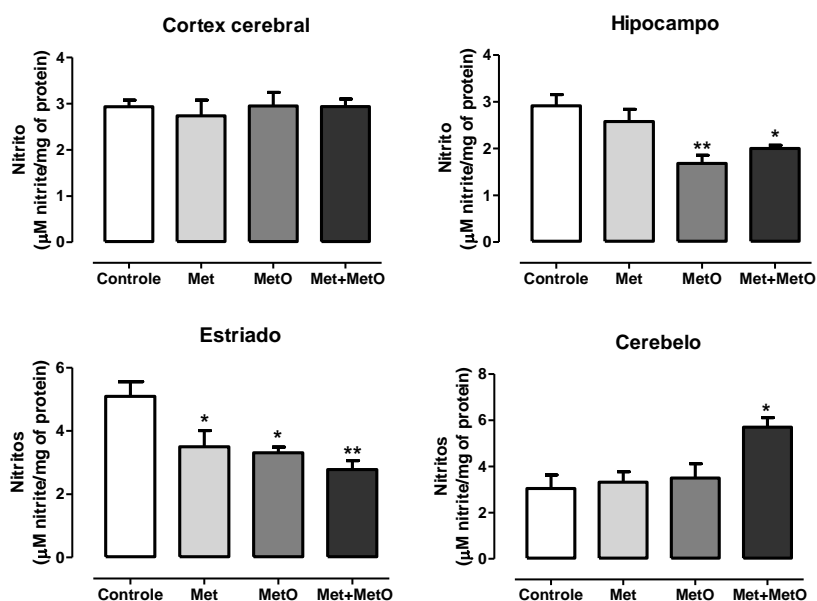


Figura 2: Níveis de nitritos em córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo de ratos jovens tratados cronicamente com metionina (Met), metionina sulfóxido (MetO) e associação de metionina e metionina sulfóxido (Met+MetO). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ diferente do controle.

4. CONCLUSÕES

A administração crônica de Met e/ou MetO modifica os níveis de espécies reativas de oxigênio e de nitrito em hipocampo e estriado de ratos jovens. Estas

alterações podem estar associadas com as disfunções neurológicas encontradas em pacientes hipermetioninêmicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI SF, LEBEL CP, BONDY SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology** 13:637–648.
- BARBOSA, K.; COSTA, N.; ALFENAS, R.; PAULA, S.; MINIM, V.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- FINKELSTEIN, J. D. Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, v.136, n.6, p. 1750S-1754S, 2006.
- LIANG, X.; KAYA, A.; ZHANG, Y.; LE, D. T.; HUA, D.; GLADYSHEV V. N. Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins. **BMC Biochemistry**, v. 13, n. 21, p. 1-23, 2012.
- MUDD, S. H.; LEVY, H. L.; 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.; LEVY, H.L. KRAUS, J.P. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, p. 2007-2056, 2001.
- SANTOS, L.; SILVA, T.; AZAMBUJA, J.; RAMOS, P.; OLIVEIRA, P.; SILVEIRA, E.; PEDRA, N.; GALDINO, K.; COUTO, C.; SOARES, M.; TAVARES, R.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, F.; BRAGANHOL, E. Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 69-78, 2016.
- SOARES, M.; OLIVEIRA, P.; DEBOM, G.; MATTOS, B.; POLACHINI, C.; BALDISSARELLI, J.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M.; TAVARES, R.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R. Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. **Amino Acids**, v. 49, n. 1, p. 129-138, 2017.
- SOARES, M.; VIAU, C.; SAFFI, J.; COSTA, M.; SILVA, T.; OLIVEIRA, P.; AZAMBUJA, J.; BARSCHAK, A.; BRAGANHOL, E.; WYSE, A.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO. Acute administration of methionine and/or methionine sulfoxide impairs redox status and induces apoptosis in rat cerebral cortex. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n.5, p. 1693–1703, 2017.
- SUAREZ, O. L.; PICO, M.L. C.; MUÑUZURI, A. P.; RAMOS, D. E. C.; LORENZO, J. R. F. Hipermetioninemia em el recién nacido pretérmino. Estudio de los factores predisponentes. **Anales de Pediatría**, v. 72, n. 3, p. 179-184, 2010.
- SURTEES, R.; LEONARD, J.; AUSTIN, S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. **Lancet**, v. 338, n.1, p. 1550–1554, 1991.
- VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools targets, and reversal. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 18, n. 1, p. 93-105, 1995.