

## 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 AVILA<sup>1</sup>; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>2</sup>; BRUNA MATTOS<sup>3</sup>; LUIZA SPOHR<sup>4</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>5</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – anita\_a\_avila@hotmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – mayara\_sandrielly@hotmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – brunamtt@hotmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com*

<sup>6</sup>*Universidade 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-adenosilmotionina (SAM) (FINKELSTEIN, 2006). A deficiência da MAT é a principal alteração genética encontrada em casos de hipermotioninemia, 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 hipermotioninêmicos 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 (CEEA 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 °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  $\mu\text{mol}$  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

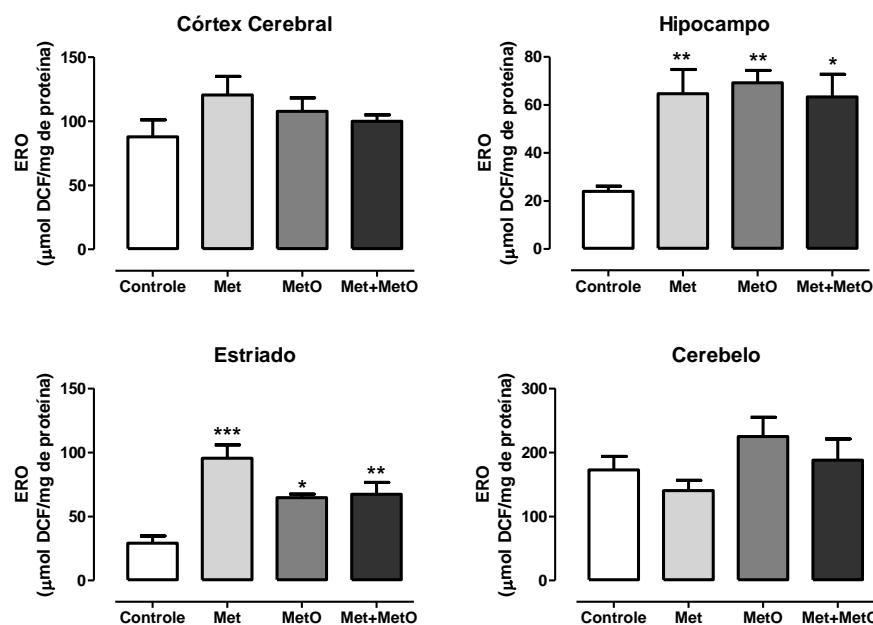
Os resultados demonstraram que os níveis de ERO tanto em hipocampo quanto em estriado aumentaram significativamente nos grupos Met, MetO e Met+MetO em comparação com o controle ( $P<0,05$ ) (Figura 1). Não foram observadas diferenças nos níveis de ERO em córtex cerebral e cerebelo em nenhum dos grupos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

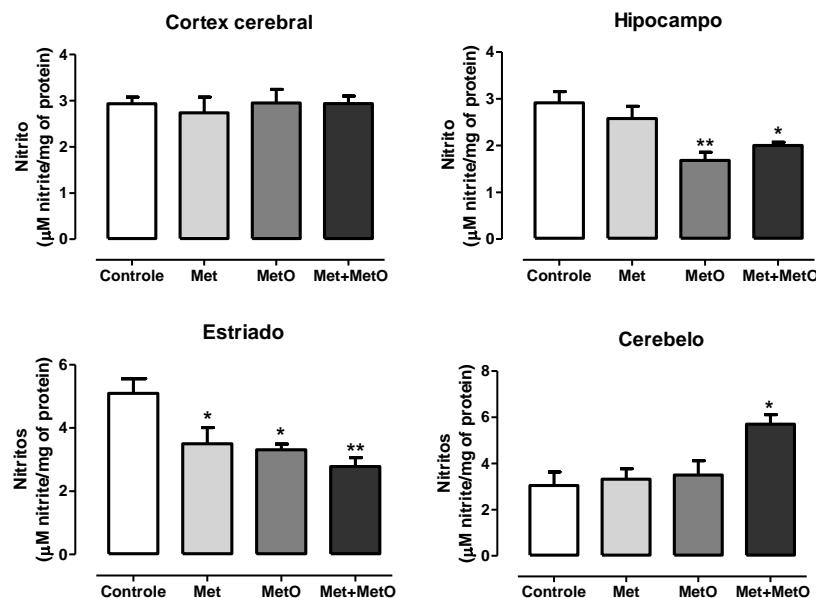
O aumento da produção de ERO pode danificar biomoléculas resultando em alterações celulares (BARBOSA, et al., 2010), as quais podem comprometer a função das estruturas cerebrais o que poderia implicar, pelo menos em parte, nos sintomas neurológicos de pacientes hipermetioninêmicos.

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 methion 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 metionine and/or methionine sulfoxide impairs redox status and induces apoptosis in rat cerebral córtex. **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.