

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO SOBRE INJÚRIA CELULAR E STATUS REDOX EM CULTIVO PRIMÁRIO DE ASTRÓCITOS

MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES¹; NATHALIA STARK PEDRA²;
NATÁLIA PONTES BONA³; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA⁴; FRANCIELI
MORO STEFANELLO⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas– mspereirasoares@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas– nathaliastark@hotmail.com

³ Universidade federal de Pelotas – natinhabona@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre- julianahazambuja@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas- fmstefanello@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas- rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A metionina (Met) é um aminoácido sulfurado, proteinogênico e essencial para o crescimento e desenvolvimento saudável. A oxidação da Met até metionina sulfóxido (MetO) é um processo fisiológico que pode acontecer na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WILLKE, 2014). Sabe-se que elevadas concentrações da Met e MetO, como encontrado na hipermetioninemia podem ser tóxicas a diversos órgãos e tecidos do organismo. A hipermetioninemia pode ocorrer em virtude de distúrbios metabólicos hereditários como na deficiência da enzima Metionina Adenosiltransferase ou em condições não genéticas como prematuridade e baixo peso ao nascer (ROMER et al., 2012). Pacientes hipermetioninêmicos podem apresentar várias características clínicas, tais como retardo mental e motor, déficit cognitivo e dismorfia facial (ROMER et al., 2012; MUDD, 2011). Estas observações foram corroboradas por estudos experimentais em animais, onde elevadas doses de Met e MetO induziram morte celular cerebral, déficit cognitivo e alterações em diversos sistemas biológicos em cérebro de ratos jovens (NURU et al., 2018; SOARES et al., 2017).

Os astrócitos possuem diversas funções cruciais no sistema nervoso central como a sustentação e nutrição de neurônios, manutenção da homeostase cerebral, liberação de neurotransmissores, participação na barreira hematoencefálica e regulação de respostas imunes inatas e adaptativas (COLOMBO e FARINA, 2016). Além disso, os astrócitos parecem ser capazes de proteger as outras células do sistema nervoso do estresse oxidativo. Esse papel protetor pode surgir de vários fatores como o seu conteúdo relativamente alto de antioxidantes, transporte e metabolismo de aminoácidos e glicose e transporte de vitamina C (WILSON, 1997).

Considerando que os mecanismos envolvidos nas disfunções neurológicas associadas a hipermetioninemia permanecem pouco compreendidos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* da exposição a Met e/ou MetO sobre a integridade celular e em parâmetros de estresse oxidativo em cultura primária de astrócitos.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo primário de astrócitos

Foram utilizados ratos *Wistar* obtidos do Biotério Central da UFPel. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEAA 6210-2017). Ratos *Wistar* com 1-2

dias foram utilizados para obtenção de astrócitos corticais os quais foram cultivados e mantidas com meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GOTTFRIED, 1999). As células foram mantidas em condições padrões (5% CO₂, 37°C e atmosfera umidificada) durante 15 dias, recebendo troca periódica de meio de cultivo até receberem os tratamentos.

2.2 Tratamento com metionina e metionina sulfóxido

Os astrócitos foram tratados com as concentrações de 1 e 2 mM de Met, 0,5 mM de MetO e com associação da Met 1 e 2 mM com a MetO 0,5 mM. As células foram expostas a essas concentrações por 72h. Após o tratamento, a integridade celular e parâmetros de estresse oxidativo foram analisadas.

2.3 Teste de iodeto de propídeo

O dano celular foi avaliado por análise de imagem fluorescente de captação de iodeto de propídeo (IP). No final dos tratamentos, as culturas de células astrocíticas foram incubadas com IP (7,5 µM) durante 1 h. A fluorescência IP foi excitada a 515-6 560 nm utilizando um microscópio invertido (Olympus IX71, Tóquio, Japão) equipado com um filtro de rodamina padrão. As imagens foram capturadas usando uma câmera digital conectada ao microscópio.

2.4 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo

Após os tratamentos, o lisado celular foi preparado para avaliar conteúdo tiólico total (SH), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), nitritos e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) foram mensurados em células viáveis semeadas em placas de 96 poços.

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 $P < 0,05$. Todos os dados foram expressos com média \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na figura 1, não foi possível observar morte celular por necrose em nenhuma condição experimental após 72h de tratamento.

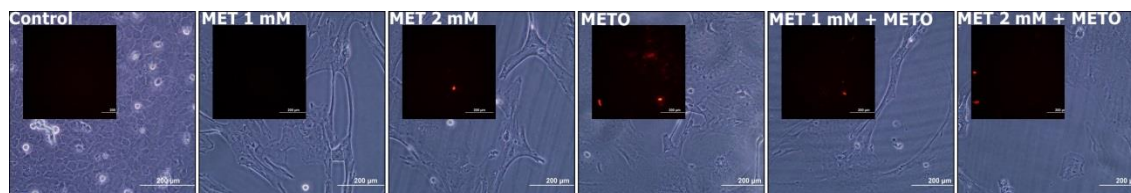


Figura 1: Incorporação de iodeto de propídeo em cultivo primário de astrócitos tratados por 72 h com metionina (Met) 1 e 2mM e/ ou metionina sulfóxido (MetO) 0,5 mM.

Em relação aos resultados de estresse oxidativo, pode-se observar na figura 2 que houve uma redução dos níveis de EROS quando as células são expostas a MetO ou associação da Met + MetO ($P < 0,05$ Figura 2A). Por outro lado, os níveis de nitritos foram significativamente aumentado em todas as condições experimentais quando comparadas com o controle (DMEM) ($P < 0,05$ Figura 2B). Quando os astrócitos foram tratados com Met 2 mM, MetO e a associação da Met + MetO foi possível observar uma redução do conteúdo tiólico

total ($P<0,05$, Figura 2C) bem como um aumento dos níveis de TBARS ($P<0,05$ Figura 2D).

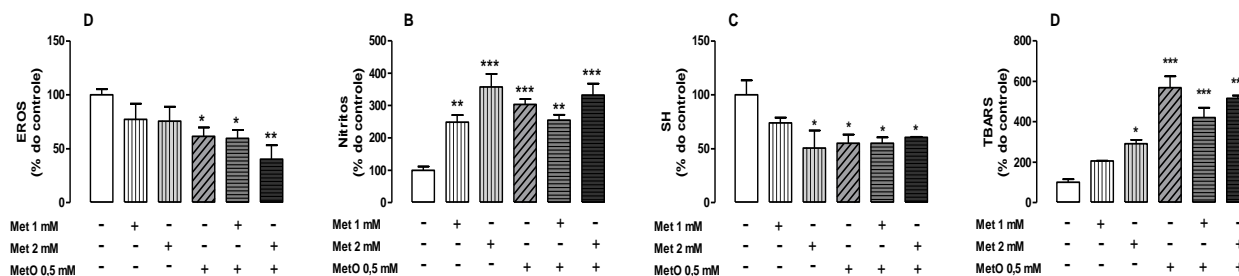


Figura 2: Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) (A), nitritos (B), conteúdo tiólico total (C) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (D) em cultivo primário de astrócitos tratados por 72 h com metionina (Met) 1 e 2mM e/ ou metionina sulfóxido (MetO) 0,5 mM. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. * $P<0,05$ ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ quando comparado com controle (DMEM).

Com relação a atividade das enzimas antioxidantes, não foi possível observar alterações na atividade da SOD ($P>0,05$ Figura 3 A). Em contrapartida, houve uma redução da atividade da CAT após o tratamento das células com Met 1 e 2 mM e/ou MetO 0,5 mM ($P<0,05$ Figura 3B).

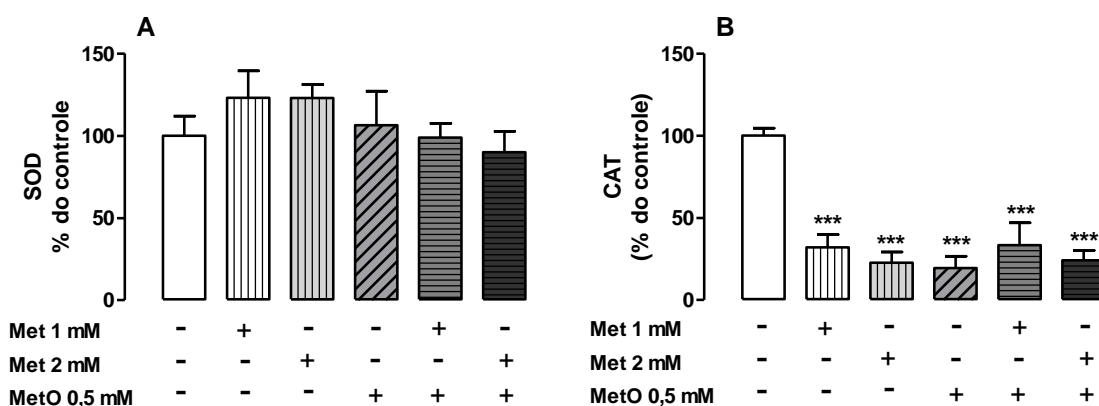


Figura 3: Atividade da superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (B) em cultivo primário de astrócitos tratados por 72 h com metionina (Met) 1 e 2mM e/ ou metionina sulfóxido (MetO) 0,5 mM. Os dados estão expressos como média \div erro padrão. *** $P<0,001$ quando comparado com controle (DMEM).

Já é bem estabelecido que o estresse oxidativo é uma condição envolvida na patogênese de várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas. Algumas características do cérebro o fazem particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, como o grande consumo de oxigênio, o qual representa 20% do total de O^2 consumido em repouso por um indivíduo adulto (WILSON, 1997). Dentro desse contexto, os astrócitos desempenham um papel importante na defesa antioxidante no sistema nervoso central e são as células mais resistentes ao estresse oxidativo (VASILE et al., 2017).

A diminuição dos níveis de EROS pode estar envolvido com uma resposta endógena compensatória dos astrócitos, uma vez que estas células possuem elevados níveis de glutathiona, uma molécula com potente atividade antioxidante, além de elevada atividade da glutathiona peroxidase que é capaz de detoxificar o peróxido de hidrogênio, corroborando assim a redução na atividade da enzima

CAT (WILSON, 1997). Por outro lado, o aumento nos níveis de nitritos podem favorecer a produção de espécies reativas de nitrogênio, com consequente redução do conteúdo tiólico total e aumento TBARS, um marcador de peroxidação lipídica. Dessa forma, embora não tenha sido observado morte celular, a presença de estresse oxidativo mediado pelo aumento de espécies reativas de nitrogênio pode estar envolvido no processo de astrogliose reativa, um evento em resposta a qualquer dano cerebral, caracterizado principalmente pela presença de uma grande número de astrócitos reativos e de maior tamanho (PEKONY e NILSSON, 2005).

4. CONCLUSÕES

Níveis elevados de Met e/ou MetO, induzem estresse oxidativo em astrócitos sugerindo que esses aminoácidos podem alterar a homeostase redox das células gliais. Esta alteração pode estar associada com as disfunções neurológicas presentes a hipermetioninemia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLOMBO, E.; FARINA, C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. **Trends in Immunology**, v. 37, n.9, p.608-620, 2016.
- GOTTFRIED, C; VALENTIM, L.; SALBEGO, C.; KARL, J.; WOFCHUK, S.T.; RODNIGHT, R. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Research**, v. 833, n.2, p 142-149, 1999
- 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
- NURU, M.; MURADASHVILI, NINO.; KALANI, A.; LOMINADZE, D.; TYAGI, N. High methionine, low folate and low vitamin B6/B12 (HM-LF-LV) diet causes neurodegeneration and subsequent short term memory loss. **Metabolic Brain Disease**, 2018.
- PEKONY, M.; NILSSON, M. Astrocyte Activation and Reactive Gliosis. **Glia**, v.50, n. 1, p.427–434, 2005.
- ROMER, P.; WEINGARTNER, J.; DESAGA, B.; KUBEIN-MEESBURG, D.; REICHENEDER, C. PROF, P. Effect of excessive methionine on the development of the cranial growth plate in newborn rats. **Archives of Oral Biology**, v.57, n.9, p 1225-1230, 2012.
- SOARES, M.S.P.; VIAU, C.M.; SAFFI, J.; COSTA, M.Z.; DA SILVA, T.M.; OLIVEIRA, P.S.; AZAMBUJA, J.H.; BARSCHAK, A.G.; BRAGANHOL, E.; S WYSE, A.T.; SPANEVELLO, R.M.; STEFANELLO, F.M.; 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.
- VASILE, F.; DOSSI, E.; ROUACH, N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. **Brain Structure and Function**, v. 222, n.1, p. 2017-2029, 2017.
- WILLKE, T. Methionine production—a critical review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98. n.1,p.9893–9914, 2014.
- WILSON, J. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.75, n.1, p.1149-1163, 1997.