

METIONINA E METIONINA SULFÓXIDO ALTERAM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATOS JOVENS – ESTUDO *IN VIVO*

TATIANE MORGANA DA SILVA¹; MARCELO ZANUSSO COSTA²; MELINA GODOY PORTO TAVARES³; GREGORI REINHARDT⁴; PATHISE SOUTO OLIVEIRA⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – tatianemorgana@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marcelozanusso@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – melina.gpt@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – gregorinr@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – pathisesouto@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Metionina (Met) é um aminoácido essencial para o crescimento e desenvolvimento dos mamíferos, e é um importante composto na junção de diversas rotas metabólicas (LEE; GLADYSHEV, 2011). Entretanto, há diversos estudos mostrando que altas concentrações de Met resultam em aminoacidemia, colestase, cirrose, hipoglicemia, aterogênese e/ou morte (ZHANG et al., 2004).

Elevadas concentrações desse aminoácido têm sido encontradas em diversos erros inatos do metabolismo, dentre eles na deficiência da enzima metionina adenosiltransferase, nos quais metabólitos como metionina sulfóxido (MetO) e metanotiol também podem estar aumentados no plasma e urina dos pacientes afetados. Pacientes hipermetioninêmicos apresentam danos hepático, como cirrose e esteatose, assim como diferentes níveis de disfunção neurológica, cujos mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda não foram completamente elucidados (MUDD et al., 2001).

O estresse oxidativo, que é caracterizado por um desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas e a capacidade antioxidante celular (HALLIWELL, 2011), tem sido reconhecido como um fator fundamental nas diversas mudanças fisiopatológicas observadas em doenças hepáticas, como a hepatite aguda, a cirrose hepática e o carcinoma hepatocelular (TANIKAWA; TORIMURA, 2006). Além disso, estudos demonstraram que elevada concentração de espécies reativas podem promover estresse oxidativo e dano celular (HALLIWELL, 2011).

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* têm reconhecido o dano oxidativo como um fator fundamental em uma variedade de mudanças fisiopatológicas observada em diferentes formas de dano hepático crônico (HA et al., 2010). YALÇINKAYA et al. (2007) demonstraram que uma dieta suplementada com Met pode aumentar a hepatotoxicidade e o dano oxidativo no fígado de ratos tratados com etanol. Estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa demonstraram que a exposição prolongada à metionina induz estresse oxidativo e promove alterações histológicas em fígado, bem como aumenta as aminotransferases, a fosfatase alcalina e a glicose em soro de ratos (STEFANELLO et al., 2009).

Considerando o que foi exposto, a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na hipermetioninemia possibilitará um maior entendimento das alterações hepáticas observadas nos pacientes hipermetioninêmicos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar a relação *in vivo* entre os níveis de Met e um de seus metabólitos, a metionina

sulfóxido (MetO), bem como a associação entre Met e MetO, perante alguns parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens.

2. METODOLOGIA

Animais: Foram utilizados ratos Wistar de aproximadamente 29 dias, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas, água e alimento *ad libitum*, e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Modelo experimental: Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo I (controle); Grupo II (tratado com Met 0,4 g/kg); Grupo III (tratado com MetO 0,1 g/kg) e Grupo IV (tratado com 0,4 g/kg + MetO 0,1 g/kg). Os ratos receberam uma única injeção subcutânea de Met e/ou MetO dissolvidas em salina. Os animais do Grupo I receberam um volume equivalente de salina. Metade dos animais foi decapitada 1 h após a injeção e a outra metade 3 h após o tratamento.

Após o sacrifício o fígado foi removido e congelado em freezer. O tecido foi homogeneizado em tampão adequado para cada técnica no momento da realização dos ensaios bioquímicos.

Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): Foi realizada pelo método de ESTERBAUER; CHEESEMAN (1990), o qual mede a formação de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica). Os resultados foram expressos como nmol de TBARS/mg de proteína.

Medida do conteúdo tiólico total: Foi determinada pelo método de AKSENOV; MARKESBERRY (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

Medida do conteúdo de carbonilas: O método utilizado foi conforme descrito por REZNICK; PACKER (1994). A presença do grupamento carbonila é um indicativo de modificação oxidativa de proteínas. A medida do dano foi feita por leitura de absorbância a 370 nm. Os dados foram expressos em nmol de carbonilas/mg de proteína.

Determinação da atividade da catalase (CAT): Realizou-se conforme o método descrito por AEBI (1984), baseado na decomposição de H₂O₂, acompanhada a 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades de CAT (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 µmol de H₂O₂ /min/mg de proteína).

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD): A atividade da SOD foi determinada através do kit RANSOD-SD125 da Randox. Os resultados foram expressos em unidades da SOD/mg de proteína.

Detecção das espécies reativas de oxigênio (ERO): A detecção das ERO foi realizada por coloração de células hepáticas com 10 µM de 2',7'- diclorofluoresceína (DCF) diacetato por 30 min a 37°C. Os comprimentos de onda foram de 488 nm e

530/30 nm respectivamente. Dados foram coletados em escala logarítmica e analisados usando o software Cell Quest Pro®.

Determinação proteica: As proteínas foram determinadas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

Análise estatística: Os resultados obtidos neste estudo foram analisados estatisticamente por meio do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”), através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste múltiplo de Duncan quando indicado, ao nível mínimo de 95% de significância ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo de sulfidrilas, que indica dano a proteínas, diminuiu na presença de Met e Met mais MetO após 1 h de administração ($P < 0,01$), enquanto o seu valor foi significativamente maior do que o grupo controle após 3 h ($P < 0,01$). Além do conteúdo de tióis totais, a medida do conteúdo de carbonilas é frequentemente utilizada como marcador de oxidação de proteínas. Verificamos que a Met aumenta o conteúdo de carbonilas, enquanto MetO diminui esse parâmetro 1 h após administração ($P < 0,01$). Contudo, nenhuma alteração foi observada após 3 h de administração dos compostos.

Nossos resultados mostraram que, 1 h após a administração subcutânea, Met, MetO e a associação entre ambos os compostos diminuíram significativamente os níveis de TBARS ($P < 0,01$), mas não houve modificação desse parâmetro após 3 h. Em relação às enzimas antioxidantes, a atividade da CAT foi significativamente reduzida pela Met, MetO e Met mais MetO, 1 h ($P < 0,01$) e 3 h ($P < 0,01$) após a injeção desses compostos. Entretanto, a atividade da SOD foi aumentada somente 3 h após a administração de MetO ($P < 0,01$). Por fim, nós avaliamos a produção de ERO por oxidação de DCF. Nesse parâmetro, Met, MetO e associação de ambos diminuíram a produção de ERO após 1 h ($P < 0,01$) e 3 h ($P < 0,01$) de administração subcutânea.

O exato mecanismo pelo qual os compostos alteram esses parâmetros de estresse oxidativo não foi possível esclarecer neste estudo. Entretanto, uma das hipóteses para explicar esses resultados é que a redução da peroxidação lipídica e atividade da CAT podem estar associados com a redução das ERO. Além disso, outro importante aspecto a ser considerado é que as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo foram diferentes em 1 e 3 h. Essas diferenças podem ser atribuídas ao metabolismo da Met, visto que o maior produto da Met é a MetO (LEE; GLADYSHEV, 2011). Além disso, MetO pode ser metabolizada em ácido homocisteico e metionina sulfona (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), sugerindo que outros metabólitos podem estar interferindo nesses resultados.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, nós demonstramos que a Met e MetO modificam a homeostase hepática por alterar o estado redox celular. Além disso, ao analisar os dados em conjunto, Met e MetO parecem ter mais efeito antioxidante que pró-oxidante nos tempos de 1 e 3 h. Os mecanismos e a significância biológica desses dados precisam de mais estudos para serem totalmente esclarecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.302, p.141-145, 2001.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, p.407-421, 1990.
- HA, H.L.; SHIN, H.J.; FEITELSON, M.A.; YU, D.Y. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v.16, p.6035-6043, 2010.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, p.125-130, 2011.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 4th ed., 2007.
- LEE, B.C.; GLADYSHEV, V.N. The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry. **Free Radical in Biological Medicine**, v.50, p.221-227, 2011.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; KRAUS J.P., Disorders of transsulfuration. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 2001. 8th ed., p.2007-2056.
- REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M.U. (Eds.). **Free Radicals: From Basic Science to Medicine**. Swiss: Birkhäuser Verlag, 1993. p.425-437.
- 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, p.961-968, 2009.
- TANIKAWA, K.; TORIMURA, T. Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. **Med Mol Morphol**, v.39, p.22-27, 2006.
- ZHANG, R.; MA, J.; XIA, M.; ZHU, H.; LING, W. Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes. **Journal of Nutrition**, v.134, p.825-830, 2004.
- YALÇINKAYA, S.; UNLÜÇERÇİ, Y.; UYSAL, M. Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.58, p.455-459, 2007.