

EFEITO *IN VITRO* DA METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS

SILVA, Tatiane Morgana¹; COSTA, Marcelo Zanusso²; VASCONCELOS, Alana³; BARSCHAK, Alethéa Gatto⁴; STEFANELLO, Francieli Moro⁴

¹Bolsista CNPq/ Pibic, Graduanda em Medicina - UFPel

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - PPGBBio/UFPel

³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ/UFPel

⁴Professora do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos - CCQFA/UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. tatianemorgana@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A metionina é um aminoácido cuja concentração encontra-se aumentada em várias doenças metabólicas hereditárias, como na deficiência da metionina adenosiltransferase. Pacientes hipermetioninêmicos podem apresentar manifestações neurológicas incluindo deficiência cognitiva, retardo mental, edema cerebral e desmielinização, cujos mecanismos não estão completamente esclarecidos (Mudd et al., 2000; Mudd et al., 2001).

O estresse oxidativo, o qual é caracterizado pelo aumento da produção de oxidantes e/ou diminuição dos níveis de defesas antioxidantes, é um importante processo que tem sido relacionado à patogênese de algumas condições que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC), tais como epilepsia, esclerose múltipla, demência e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Halliwell, 2006; Mancuso et al., 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Diversos estudos *in vitro* demonstram que a metionina induz estresse oxidativo e altera importantes parâmetros do metabolismo energético como a produção de CO₂, a liberação de lactato e a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em encefálo de ratos (Streck et al., 2002, 2003; Stefanello et al., 2005). Além disso, foi mostrado que a administração aguda e crônica de metionina inibe a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase e aumenta a peroxidação lipídica em hipocampo de ratos (Stefanello et al., 2007a). Finalmente, a hipermetioninemia crônica provoca déficit de memória em ratos, aumenta a atividade da enzima acetilcolinesterase e reduz o conteúdo de importantes lipídeos de membrana (gangliosídeos, fosfolipídeos e colesterol) em cérebro de ratos (Stefanello et al., 2007b; Stefanello et al., 2007c).

Dessa forma, a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na hipermetioninemia possibilitará um maior entendimento das alterações neurológicas observadas nessa síndrome metabólica. Para tanto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito *in vitro* da metionina e/ou seu metabólito metionina sulfóxido sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram utilizados ratos Wistar de aproximadamente 30 dias, obtidos no Biotério da UFPel, mantidos em ambiente com temperatura (20 - 24°C) e umidade (40 - 60%) controladas, água e ração *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram submetidos à eutanásia e o córtex cerebral foi cuidadosamente removido e armazenado em freezer a -70°C. Posteriormente, o tecido cerebral foi homogeneizado em tampão adequado para a realização dos

ensaios bioquímicos. O efeito *in vitro* de diferentes concentrações de metionina (Met) (0,02 – 2 mM), metionina sulfóxido (MetO) (5 - 500 μ M), bem como da mistura (Mix) (1 mM Met + 500 μ M MetO) foi estudado nos seguintes parâmetros de estresse oxidativo:

Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): Foi realizada pelo método de Esterbauer e Cheeseman (1990), o qual mede a formação de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica). Quando aquecida em presença de ácido tiobarbitúrico, essa substância forma um composto corado que é medido espectrofotometricamente em 532 nm. Para a curva de calibração utilizou-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano, seguindo o mesmo tratamento das amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBARS/mg proteína.

Medida do conteúdo tiólico total: Foi determinada pelo método de Aksenov e Markesbery (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.

Determinação da atividade da catalase: Realizou-se conforme o método descrito por Aebi (1984), baseado na decomposição de H_2O_2 , acompanhada a 240 nm, à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de catalase (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μ mol de H_2O_2 /min/mg de proteína).

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD): O método utilizado seguiu o descrito por Spitz e Oberley (1989). Os reagentes em presença da superóxido dismutase sofrem inibição da oxidação e a atividade enzimática é mensurada espectrofotometricamente em 420 nm. Uma unidade de atividade de superóxido dismutase é definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg proteína.

Determinação protéica: As proteínas foram determinadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

Análise estatística: Os resultados obtidos neste estudo foram analisados através do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”). Os dados bioquímicos foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de múltiplas comparações de Duncan quando indicado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a Met, na concentração de 2 mM, aumentou em torno de 40% a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase ($P < 0,05$). Entretanto, a MetO e o Mix não alteraram a atividade da enzima. Além disso, Met (1 e 2 mM) e o Mix aumentaram significativamente a atividade da catalase em torno de 45% ($P < 0,05$), contudo MetO não alterou a atividade dessa enzima. Em contraste, os níveis de substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico, medida de lipoperoxidação, e o conteúdo tiólico total não foram alterados por nenhum dos compostos analisados.

4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode-se concluir que Met e MetO alteram as defesas antioxidantes enzimáticas em córtex cerebral de ratos, sugerindo o estresse oxidativo como um possível mecanismo fisiopatológico das alterações cerebrais presentes na hipermetioninemia.

5 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth Enzymol**, 105:121-126, 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. **Neurosci Lett**, 302:141-145, 2001.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Meth Enzymol**, 186:407-421, 1990.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, 97:1634-1658, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 2007.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol Reagent. **J Biol Chem**, 193:265-275, 1951.
- MANCUSO, M.; COPPEDE, F.; MIGLIORE, L.; SICILIANO, G.; MURRI, L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. **J Alzheimers Dis**, 10:59-73, 2006.
- MUDD, S.H.; JENDEN, D.J.; CAPDEVILA, A.; ROCH, M.; LEVY, H.L.; WAGNER, C. Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. **Metabolism**, 49:1542-1547, 2000.
- MUDD, S.H.; LEVY, H.L. KRAUS, J.P. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, pp. 2007-2056, 2001.
- SPITZ, D.R.; OBERLEY, L.W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Anal Biochem**, 179:8-18, 1989.
- STEFANELLO, F.M.; SCHERER, E.B.S.; KUREK, A.G.; MATTOS, C.B.; WYSE, A.T.S. Effect of hypermethioninemia on some parameters of oxidative stress and on Na⁺, K⁺ - ATPase activity in hippocampus of rats. **Metab Brain Dis**, 22: 172-182, 2007a.
- STEFANELLO, F.M.; MONTEIRO, S.C.; MATTÉ, C.; SCHERER, E.B.S.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T.S. Hypermetioninemia increases cerebral acetylcholinesterase activity and impairs memory in rats. **Neurochem Res**, 32: 1868-1874, 2007b.
- STEFANELLO, F.M.; KREUTZ, F.; SCHERER, E.B.; BREIER, A.C.; VIANNA, L.P.; TRINDADE, V.M.T.; WYSE, A.T.S. Reduction of gaggliosides, phospholipids and cholesterol content in cerebral cortex of rats by chronic hypermetioninemia. **Int J Dev Neurosci**, 25:473-477, 2007c.
- STRECK, E.L.; ZUGNO, A.I.; TAGLIARI, B.; WANNMACHER. C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. **Metab Brain Dis**, 17:83-91, 2002.

STRECK, E.L.; DELWING, D.; TAGLIARI, B.; Matté, C.; WANNMACHER. C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. **Neurochem Int**, 43:597-602, 2003.

APOIO FINANCEIRO: PIBIC/CNPq e FAPERGS.