

ALTERAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS CAUSADA PELA METIONINA E METIONINA SULFÓXIDO EM FÍGADO DE RATOS

SILVA, Tatiane Morgana¹; COSTA, Marcelo Zanusso²; SACCON, Tatiana³; PORTO, Natália⁴; STEFANELLO, Francieli Moro²

¹Universidade Federal de Pelotas/Medicina; ²Universidade Federal de Pelotas/Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos; ³Universidade Federal de Pelotas/Nutrição; ⁴Universidade Federal de Pelotas/Biotecnologia. tatianemorgana@gmail.com.

1 INTRODUÇÃO

A metionina (Met) é um aminoácido essencial para o crescimento e o desenvolvimento dos mamíferos; contudo, pode tornar-se tóxico quando em altas concentrações (Benevenga e Steele, 1984; Cooper, 1983; Mudd et al., 2001). Elevadas concentrações deste aminoácido e de seus metabólitos têm sido encontradas em diversos erros inatos do metabolismo, dentre eles na deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (Mudd et al., 2000, 2001, Augoustides-Savvopoulou et al., 2003). Pacientes hipermetioninêmicos apresentam danos hepático e diferentes níveis de disfunção neurológica, cujos mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda não foram completamente elucidados (Mudd et al., 2000; 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 (Loguercio e Federico, 2003; Kim et al., 2004; Tanikawa e Torimura, 2006). 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 se há uma relação entre os níveis de Met e um de seus metabólitos, a metionina sulfóxido (MetO), com alguns parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Utilizaram-se ratos Wistar de aproximadamente 29 dias, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPe), mantidos em ambiente com temperatura (20 - 24°C) e umidade (40 - 60%) controladas, água e alimento *ad libitum*, e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram alojados em gaiolas de manutenção do tipo padrão para ratos com dimensões de P49cmxL34cmxA16cm, com no máximo 5 animais por gaiola.

Os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina. Após o sacrifício o fígado foi removido e congelado em freezer -70°C . O tecido foi homogeneizado em tampão adequado para cada técnica no momento da realização dos ensaios bioquímicos. O efeito *in vitro* de diferentes concentrações de Met (0,02 – 2 mM), MetO (5 - 500 μM) e associação de Met 1 mM e MetO 500 μM (Mix) foi estudado nos seguintes parâmetros de estresse oxidativo:

Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico: 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 μmol de H_2O_2 /min/mg de proteína).

Determinação da atividade da superóxido dismutase: 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 proteica: As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

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

Considerando que pacientes hipermetioninêmicos apresentam alterações hepáticas, avaliamos o efeito da Met e/ou MetO em fígado de ratos. Os nossos resultados demonstraram que a Met (1 e 2 mM), MetO 500 μM e Mix aumentaram significativamente a atividade da superóxido dismutase em fígado de ratos ($P < 0,05$).

Além disso, a Met nas concentrações de 1 e 2 mM, bem como o Mix, promoveram aumento estatisticamente significativo na atividade da enzima catalase ($P < 0,05$); entretanto, a MetO não alterou a atividade desta enzima em fígado de ratos. Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e conteúdo tiólico total não sofreram modificações por nenhum dos compostos analisados em fígado de ratos.

4 CONCLUSÃO

Os dados demonstraram que Met e MetO alteram as defesas antioxidantes enzimáticas em fígado de ratos, sugerindo o estresse oxidativo como um possível mecanismo fisiopatológico das alterações hepáticas 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.

AUGOUSTIDES-SAVVOPOULOU, P.; LUKA, Z.; Karyda, S.; STABLER, S.P.; ALLEN, R.H.; PATSIAOURA, K.; PATSIAOURA, K.; WAGNER, C.; MUDD, H. Glycine N-methyltransferase deficiency: a new patient with a novel mutation. **J Inherit Metab Dis**, 26:745-59, 2003.

BENEVENGA, N.J.; STEELE, R.D. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. **Annu Rev Nutr**, 4:157-181, 1984.

COOPER, A.J.L. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. **Annu Rev Biochem**, 52:187-222, 1983.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Meth Enzymol**, 186:407-421, 1990.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, Vol. 32, No. 3:125-130, 2011.

KIM, Y.S.; JHON, D.Y.; LEE, K.Y. Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells. **Exp Mol Med**, 36:157-164, 2004.

LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. **Free Radic Biol Med**, 34:1-10, 2003.

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.

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.; 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**, 91:961-968, 2009.

TANIKAWA, K.; TORIMURA, T. Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. **Med Mol Morphol**, 39:22-27, 2006.

APOIO FINANCEIRO: PIBIC/CNPq e FAPERGS.