

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Efeito da administração aguda de metionina e metionina sulfóxido sobre
parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens**

Melina Godoy Porto Tavares

Pelotas, 2014

MELINA GODOY PORTO TAVARES

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE METIONINA E METIONINA
SULFÓXIDO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Orientadora de Estágio: Pathise Souto Oliveira

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T231e **Tavares, Melina Godoy Porto.**
Efeito da administração aguda de metionina e metionina sulfóxido sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens / Melina Godoy Porto Tavares. – 40f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Francieli Moro Stefanello.

1. Biotecnologia. 2. Bioquímica. 3. Metionina. 4. Metionina sulfóxido. 5. Estresse oxidativo. 6. Córtex cerebral. I. Stefanello, Francieli Moro. II. Título.

CDD: 572.36

Banca examinadora:

Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Profa. Dra. Rejane Giacomelli Tavares

Mestranda Pathise Souto Oliveira

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, cujo amor, compreensão e dedicação possibilitaram minha formação pessoal e profissional; meus irmãos, pela compreensão; e ao meu namorado, pelo incentivo, parceria e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Elisa e ao meu padrasto Cristiano, base para que me tornasse quem sou hoje, por proporcionarem condições de estudar, pela presença fundamental, paciência, educação, carinho, incentivo e por me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Aline e Pedro, pelo carinho e compreensão.

A minha orientadora acadêmica professora Francieli Moro Stefanello, pela oportunidade de ingresso no estágio, pela orientação durante o período da graduação e na realização deste trabalho, além disso, por todo conhecimento e dedicação, também pela paciência ao longo desse período, contribuindo para meu crescimento profissional.

A minha orientadora de estágio Pathise Souto Oliveira pelos conhecimentos repassados, disposição e paciência.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biomarcadores pelos agradáveis momentos e pelo auxílio durante o meu estágio.

A todos os familiares e amigos que tornaram meus dias mais felizes.

Meu carinho e gratidão!

RESUMO

TAVARES, Melina Godoy Porto Tavares. **Efeito da administração aguda de metionina e metionina sulfóxido sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens**. 2014. 40f. Monografia – Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Muitos estudos têm comprovado que a metionina (Met) e/ou seus metabólitos podem ser extremamente tóxicos quando presentes em elevadas concentrações nos tecidos. Pacientes com hipermetioninemia podem apresentar diferentes graus de disfunção neurológica, cuja fisiopatologia não está bem esclarecida. No presente estudo nós investigamos o efeito *in vivo* da Met e metionina sulfóxido (MetO) sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. Os animais foram divididos em 4 grupos: salina, Met 0,4 g/Kg, MetO 0,1 g/Kg e Met 0,4 g/Kg + MetO 0,1 g/Kg (Mix), sendo eutanasiados 1 h após injeção subcutânea dos compostos. Os resultados mostraram que o Mix aumentou significativamente os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, marcador de lipoperoxidação. Ainda, Met, MetO e Mix reduziram a atividade da enzima catalase. Entretanto, o conteúdo de tióis totais e de carbonilas não foi alterado por nenhum dos compostos. Em conjunto, esses dados indicam que Met e/ou MetO, *in vivo*, alteram o estado redox celular, por induzir a peroxidação lipídica e reduzir defesas antioxidantes enzimáticas. Desta forma, podemos reforçar o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia do dano cerebral observado na hipermetioninemia.

Palavras-chave: Metionina; Metionina sulfóxido; Estresse oxidativo; Córtex cerebral.

ABSTRACT

TAVARES, Melina Godoy Porto Tavares. **Acute administration of methionine and methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters in cerebral cortex of rats.** 2014. 40f. Monografia – Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

High plasma levels of methionine (Met) and its metabolites may occur in several inborn errors of metabolism, such as in methionine adenosyltransferase deficiency. Some hypermethioninemic patients can present a variable degree of neurological dysfunction; however, the exact mechanisms involved in these alterations remain elusive. Therefore, in the present we investigated whether oxidative stress is elicited by Met and/or methionine sulfoxide (MetO) in cerebral cortex homogenates of young rats. The *in vivo* effect of Met, MetO, as well as Mixture (Mix) studied on the following oxidative stress parameters: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total thiol group, carbonyl content, and the activity of antioxidant enzyme catalase. The animals were divided into groups: saline, Met 0.4 g/Kg, MetO 0.1 g/Kg and Met 0.4 g/Kg + MetO 0.1 g/Kg and were euthanized 1 h after injection. Results showed that Mix increased TBARS levels, while Met and MetO did not modify this parameter. In addition, Met, MetO and Mix decreased CAT activity. However, total thiol group and carbonyl content were not altered by Met, MetO and Mix. These data indicate that Met and/or MetO alter lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defenses in cerebral cortex of rats, suggesting the oxidative stress as one possible pathophysiological mechanism of the brain damage observed in hypermethioninemic patients.

Key words: Methionine; Methionine sulfoxide; Oxidative stress; Cerebral cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da L-metionina e metionina-S-sulfóxido.....	15
Figura 2. Metabolismo da metionina.....	16
Figura 3. Formação de espécies reativas.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

CBS – Cistationina β -sintase

EIM – Erros inatos do metabolismo

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GNMT – Glicina-*N*-metiltransferase

GSH – Glutathiona reduzida

GPx – Glutathiona peroxidase

MAT – Metionina adenosiltransferase

Met – Metionina

MetO – Metionina sulfóxido

MSR – Metionina sulfóxido redutase

RL – Radicais livres

SAH – S-adenosil-homocisteína

SAHH – S-adenosil-homocisteína hidrolase

SAM – S-adenosil-metionina

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1 Erros inatos do metabolismo.....	13
3.2 Hipermetioninemia.....	13
3.3 Metionina e metionina sulfóxido.....	15
3.4 Radicais livres e estresse oxidativo.....	17
4. ARTIGO.....	21
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) representam cerca de 10% de todas as doenças hereditárias, sendo caracterizados por um defeito específico, normalmente enzimático, que, por consequência, pode levar ao bloqueio de alguma via metabólica no organismo (SEYMOUR et al., 1997; KARAM; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2001; AMÂNCIO et al., 2007).

Diversos estudos evidenciam que a metionina (Met) e/ou seus metabólitos podem ser extremamente tóxicos quando presentes em elevadas concentrações nos tecidos (MUDD et al., 2001; GARLICK, 2006). Nesse contexto, a hipermetioninemia ocorre em muitas desordens metabólicas, dentre elas, na deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Nessa doença, os pacientes podem apresentar concentrações plasmáticas de Met de até 2.500 $\mu\text{mol/L}$, sendo que, em condições normais, encontram-se por volta de 30 $\mu\text{mol/L}$. As altas concentrações de metabólitos, como a metionina sulfóxido (MetO), também podem ser encontrados no plasma e na urina dos pacientes afetados pela doença (MUDD et al., 2001).

Os efeitos tóxicos da Met têm sido demonstrados por meio de estudos *in vitro*, os quais relacionam as altas concentrações desse aminoácido com alterações oxidativas e sobre parâmetros do metabolismo energético cerebral em ratos (STRECK et al., 2002, 2003; STEFANELLO et al., 2005). Além disso, outros estudos demonstram a toxicidade cerebral e hepática da exposição aguda e crônica à metionina em ratos (STEFANELLO et al., 2009, 2011).

O estresse oxidativo, o qual se caracteriza pela ocorrência de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, apresenta um papel fundamental nas mudanças fisiopatológicas que afetam o sistema nervoso central (SNC), tais como esclerose múltipla, demência, doenças neurodegenerativas e doenças metabólicas hereditárias (MANCUSO et al., 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; MACHADO et al., 2011). Compreender esse fato torna-se possível uma vez que o cérebro é extremamente vulnerável ao dano oxidativo, pois apresenta uma elevada demanda de oxigênio. Além disso, possui a presença de neurotransmissores auto-oxidáveis, membrana neural rica em ácidos graxos poliinsaturados, um elevado nível de ferro e possui uma capacidade antioxidante modesta (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Considerando o exposto acima, faz-se necessário buscar um maior entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas alterações neurológicas observadas em pacientes hipermetioninêmicos. Sendo assim, neste trabalho avaliaremos os efeitos da Met e de um de seus metabólitos sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos submetidos ao modelo experimental de hipermetioninemia aguda.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi estudar o efeito *in vivo* da Met e MetO sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito da administração aguda de Met e/ou MetO sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), medida de lipoperoxidação, em córtex cerebral de ratos jovens 1 h após a administração desses aminoácidos.
- Avaliar o efeito da administração aguda de metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o conteúdo de tióis totais e de carbonilas, marcadores da oxidação protéica, em córtex cerebral de ratos jovens 1 h após a administração desses aminoácidos.
- Estudar o efeito da administração aguda de Met e/ou MetO sobre a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em córtex cerebral de ratos jovens 1 h após a administração desses aminoácidos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Erros inatos do metabolismo

Os EIM são alterações genéticas, em sua maioria autossômica recessivas, caracterizada por um defeito específico, normalmente enzimático, que por consequência pode levar ao bloqueio de alguma via metabólica no organismo (SEYMOUR et al., 1997; KARAM; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2001; AMÂNCIO et al., 2007). Essas alterações resultam na diminuição parcial ou total da atividade enzimática, ocasionando bloqueio das rotas metabólicas, podendo ocorrer tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais, ambos com doenças subsequentes (DHERAI, 2012).

A incidência isolada dessas doenças metabólicas é baixa, no entanto, em conjunto são muito frequentes, podendo atingir um em cada mil recém-nascidos vivos (SEYMOUR et al., 1997; AMÂNCIO et al., 2007). Atualmente, já foram descritos mais de 500 EIM, a maior parte deles envolvem deficiência em processos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas (EL HUSNY; FERNANDES-CALDATO, 2006).

Os EIM podem ser divididos clinicamente em distúrbios da síntese ou catabolismo de moléculas complexas, do metabolismo intermediário e defeitos de produção ou utilização de energia. Alguns EIM são diagnosticados através de triagem neonatal, e em outros casos após os primeiros sintomas da doença que ocorrem geralmente na infância (SOUZA; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2002). Dentre os EIM mais frequentes estão os de aminoácidos como a hipermetioninemia, que será o alvo deste estudo.

3.2 Hipermetioninemia

A hipermetioninemia pode ser proveniente de uma doença metabólica hereditária ou ter origem não genética (BJURSELL et al., 2011).

Normalmente, a Met é convertida em homocisteína em 3 etapas enzimáticas principais, as quais podem estar comprometidas nos EIM (BJURSELL et al., 2011).

Na etapa inicial, pode ocorrer a deficiência da enzima MAT. Na segunda etapa, tem-se a deficiência na enzima glicina-N-metiltransferase (GNMT), resultando em acúmulo de S-adenosil-metionina (SAM), uma vez que a metilação é afetada de forma importante. Já na terceira etapa podem ocorrer dois EIM: a deficiência da S-adenosil-homocisteína hidrolase (SAHH), que afeta a hidrólise de S-adenosil-homocisteína (SAH) em homocisteína e adenosina, bem como a deficiência da cistationa β -sintase (CBS), que interrompe a conversão de homocisteína em cistationina (BJURSELL et al., 2011).

A deficiência da MAT é a causa mais comum de hipermetioninemia isolada. Essa deficiência é considerada uma doença autossômica recessiva rara, que ocorre devido a uma mutação genética no gene MAT1A, responsável por codificar as subunidades catalíticas das duas isoenzimas presentes no fígado de mamíferos adultos (MAT I e MAT III). Caracteriza-se bioquimicamente pelo acúmulo tecidual de Met e pela ausência do produto SAM. As altas concentrações de metabólitos, como a MetO também podem ser encontrados no plasma dos pacientes afetados (MUDD et al., 2001).

A maior parte dos indivíduos afetados pela doença não apresentam sintomas clínicos, mas alguns deles demonstram manifestações neurológicas incluindo deficiência cognitiva, retardo mental, edema e desmielinização cerebral, bem como alterações hepáticas, cujos mecanismos não estão completamente esclarecidos (CHAMBERLIN et al., 1996; MUDD et al., 2000, 2001). O diagnóstico pode ser realizado através de uma triagem durante o período neonatal, detectando o nível de Met na corrente sanguínea do recém-nascido. Outra forma de diagnosticar a doença é realizando a determinação da atividade da enzima hepática. Alterações nos níveis plasmáticos de SAM, na presença de uma alta concentração de Met, também podem auxiliar no diagnóstico (CHIEN et al., 2005; COUCE et al., 2008; SUAREZ et al., 2010).

Ainda não se sabe claramente muitos aspectos desse EIM, mas o tratamento prescrito é baseado em uma dieta restrita em Met, com o objetivo de evitar os efeitos tóxicos ocasionados pelo acúmulo desse aminoácido. No entanto, essa restrição pode restringir ainda mais os níveis de SAM, levando a um agravamento dos danos neurológicos presentes nos pacientes portadores dessa doença (CHIEN et al., 2005; COUCE et al., 2008; SUAREZ et al., 2010).

3.3 Metionina e Metionina Sulfóxido

A Met é um aminoácido (Figura 1) essencial para o crescimento e desenvolvimento adequado dos mamíferos, sendo metabolizada normalmente no fígado. Esse aminoácido possui um papel fundamental no desenvolvimento adequado do SNC pela função que exerce sobre a formação da mielina, na síntese proteica, no metabolismo do enxofre, na manutenção das metilações biológicas e na regulação do equilíbrio redox, desse modo, seu metabolismo deve ser rigorosamente controlado, para fornecer aminoácidos às diversas necessidades celulares (SUAREZ et al., 2010).



Figura 1 - Estrutura química da metionina e metionina-S-sulfóxido.

O primeiro passo no metabolismo desse composto é catalisado pela MAT, que converte Met em SAM que, por sua vez, doa grupamento metila, através da enzima GNMT, para uma grande variedade de aceptores formando SAH. No próximo passo ocorre à hidrólise de SAH em homocisteína e adenosina, através da SAHH (MUDD et al., 2001; MARTINOV et al., 2010; BJURSSSEL et al., 2011). A homocisteína pode ser metabolizada pelas vias de remetilação e de transulfuração. Na primeira, esse composto recebe um grupamento metila da betaína ou do 5-metil-tetrahydrofolato formando Met. Na transulfuração, a enzima CBS catalisa a conversão de homocisteína em cistationina, que é hidrolisada a cisteína pela enzima cistationina γ -liase (STIPANUK, 2004; MARTINOV et al., 2010; BJURSELL et al., 2011). A cisteína participa da formação da glutathiona reduzida (GSH), um importante antioxidante não enzimático, ou pode ser oxidada a sulfatos e taurina (SCHAFFER; TAKAHASHI; AZUMA, 2000; FINKELSEIN, 2006) (Figura 2).

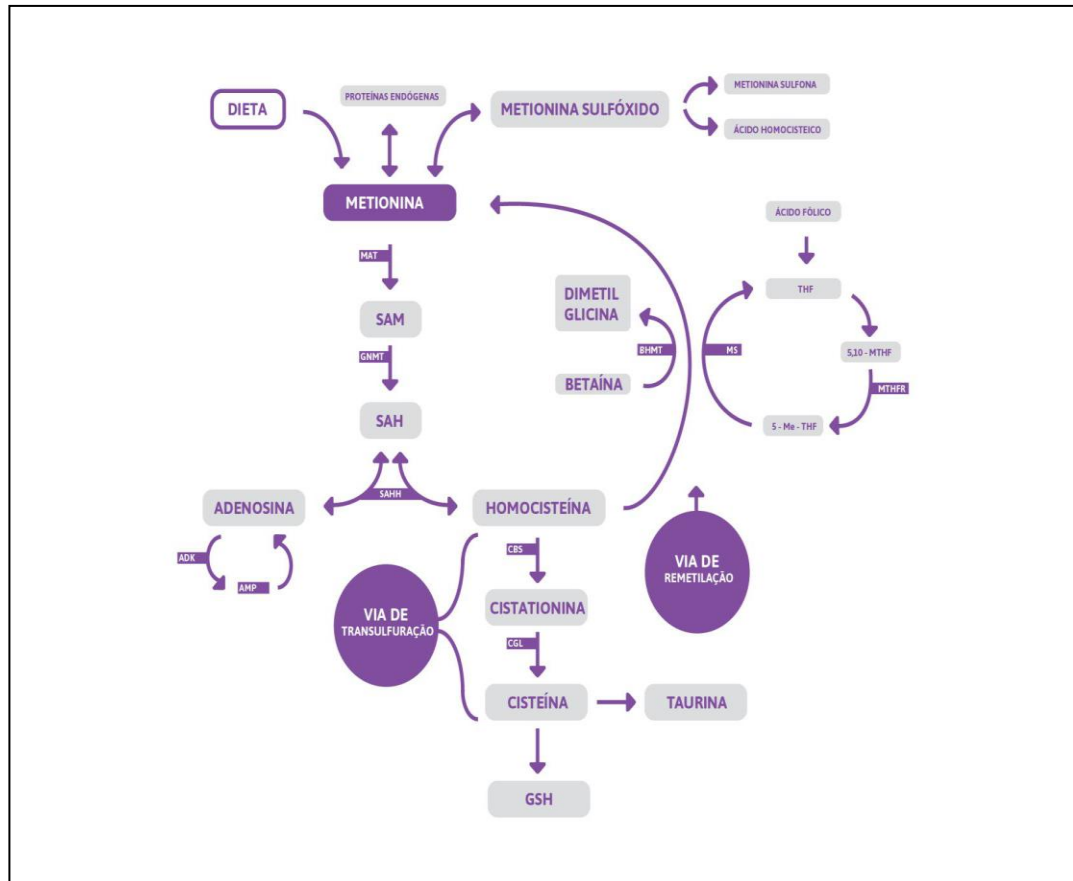


Figura 2 - Metabolismo da metionina (COSTA, 2013).

MAT - metionina adenosiltransferase; **SAM** - S-adenosil-metionina; **GNMT** - glicina-*N*-metiltransferase; **SAH** - S-adenosil-homocisteína; **SAHH** - S-adenosil-homocisteína hidrolase; **ADK** - adenosina cinase; **AMP** - adenosina monofosfato; **CBS** - cistationina β -sintase; **CGL** - cistationina γ -liase; **BHMT** - betaína homocisteína metiltransferase; **MS** - metionina sintase; **THF** - tetrahidrofolato; **5,10-MTHF** - 5,10-metilenotetrahidrofolato; **MTHFR** - metilenotetrahidrofolato redutase; **5-Me-THF** - 5-metiltetrahidrofolato.

A Met apresenta enxofre em sua estrutura, sendo particularmente suscetível à oxidação por espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas nos sistemas biológicos (VOGT, 1995; LIANG et al., 2012). Também é fonte de compostos antioxidantes, que promovem a defesa contra espécies reativas, tais como a GSH, taurina, cisteína, com o intuito de equilibrar o estado redox celular (PRUDOVA et al., 2005; WATERLAND, 2006). A concentração de SAM é um ponto chave na regulação do ciclo da Met, podendo atuar ativando ou inibindo enzimas importantes, regulando assim, a velocidade da rota metabólica (FINKELSTEIN, 2006).

Um dos metabólitos da Met, a MetO, encontrada em proteínas ou como aminoácido livre, apresenta-se de duas formas chamadas de diastereômeros, sendo uma delas a metionina-S-sulfóxido (Figura 1), presentes em mamíferos, e a metionina-R-sulfóxido. Esse aminoácido representa em torno de 4-10% do conteúdo total de Met (ZHAO; KIM; LEVINE, 2012).

As metioninas sulfóxidos redutases (MSR) presentes em praticamente todos os organismos são enzimas que catalisam a redução de MetO a Met, conferindo uma proteção celular e neutralização de espécies reativas. Entretanto, a oxidação da Met em MetO tem sido apontada como um agente importante no processo de envelhecimento, causa de doenças e como regulador de atividades proteicas (STADTMAN, 2004; KOC & GLADYSHEV, 2007).

Alterações no metabolismo da Met estão associadas com muitas patologias, como câncer, anemias, doenças neurodegenerativas e anormalidades no desenvolvimento (MARTINOV et al., 2010).

Existem muitos trabalhos que abordam os efeitos neurotóxicos causados pela Met por induzir estresse oxidativo e alterar importantes parâmetros do metabolismo energético como a produção de CO₂, a liberação de lactato e a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em cérebro de ratos (STRECK et al., 2002, 2003; STEFANELLO et al., 2005). Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a exposição prolongada à Met promove dano oxidativo e alterações histológicas em fígado de ratos (STEFANELLO et al., 2009). Mais recentemente, demonstramos que elevadas concentrações de Met e MetO *in vivo* e *in vitro* modificam a homeostase do fígado devido ao fato de alterar o estado redox celular (COSTA et al., 2013).

3.4 Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres (RL) são definidos como qualquer elemento químico com elétrons desemparelhados em sua camada orbital mais externa, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Os RL são altamente reativos e iniciam reações em cadeia por extrair um elétron de uma molécula das proximidades a fim de completar seus próprios orbitais. Entre eles encontramos o ânion superóxido, radical peroxila, radical hidroxila, radical alcóxila, bem como o óxido nítrico.

Entretanto, existem espécies igualmente reativas, que não possuem elétrons desemparelhados na sua última camada, contudo sua ação pode ser tão prejudicial quanto dos RL, sendo estes classificados como espécies reativas. A terminologia ERO é comumente usada para incluir radicais e não radicais contendo oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

As ERO são geradas constantemente no metabolismo, principalmente na cadeia respiratória mitocondrial, sendo que cerca de 2-5% do oxigênio consumido são convertidos nessas espécies. Ainda, são formadas de forma deliberada no processo inflamatório, pela exposição solar (UV), drogas, radiação ionizante, poluente do ar e outras substâncias químicas (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007; HALLIWELL, 2011) (Figura 3).

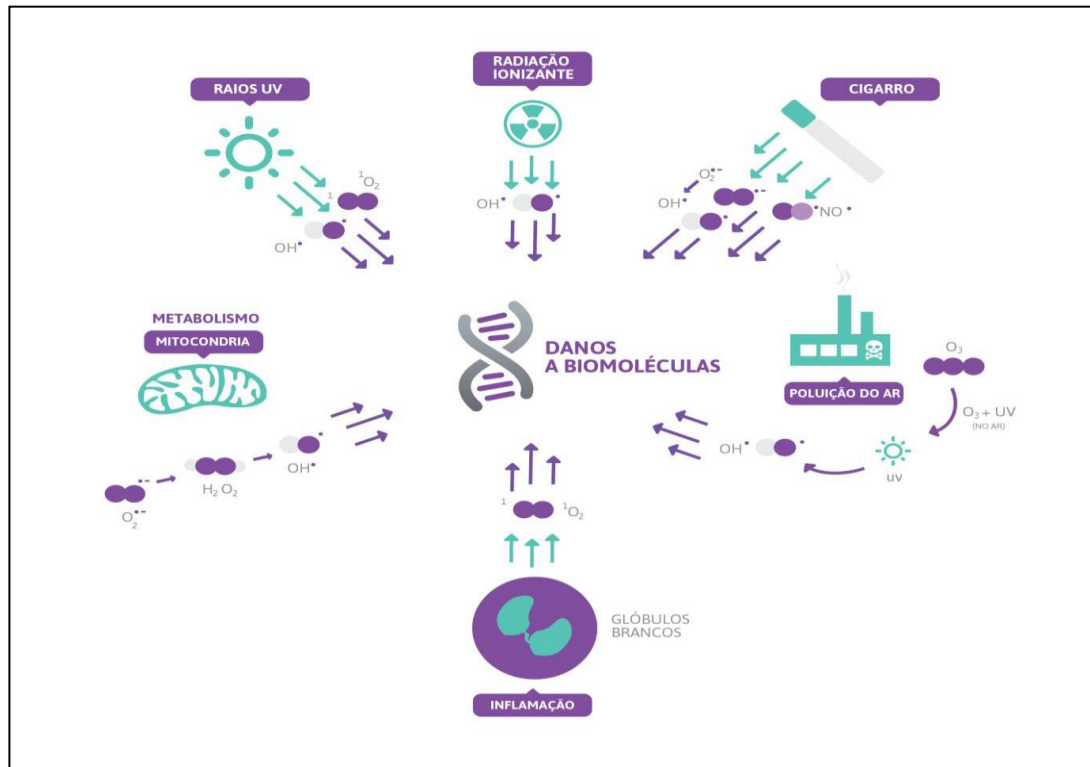


Figura 3 - Formação de espécies reativas (COSTA, 2013).

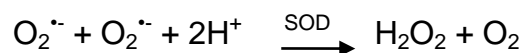
Fisiologicamente, essas espécies exercem um importante papel no processo fagocitário, na sinalização celular, na regulação de proteínas e na resposta imunológica, apesar disso, a sua produção de forma excessiva pode tornar-se extremamente perigosa ao organismo, uma vez que, são altamente reativos, podendo provocar reações em cadeia e oxidar diversas biomoléculas, como

proteínas, lipídeos e até mesmo os ácidos nucleicos. Além disso, existem evidências de que as ERO podem estar associadas direta ou indiretamente às doenças como, inflamações, disfunção hepática, carcinogênese, podendo também causar dano ou morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007; ELLAH, 2011).

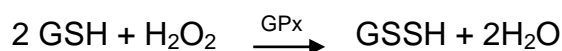
A fim de promover a manutenção dos níveis de ER e a proteção celular dos efeitos nocivos dessas espécies, o nosso organismo apresenta mecanismos de defesa antioxidante, que tem por função inibir e/ou reduzir a oxidação de substratos. Dessa forma, os antioxidantes agem como agentes protetores da oxidação de biomoléculas e impedem que a reação em cadeia se propague. Usualmente, esse sistema pode ser dividido em enzimático e não enzimático. No último caso, é composto por uma grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ser de origem endógena ou dietética (KOURY & DONANGELO, 2003; HALLIWELL & WHITEMAN, 2004; SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011).

No sistema de defesa não enzimático utilizam-se diferentes estratégias de proteção do organismo, sendo compostos que possuem capacidade de neutralizar a ação das ER, que inclui a GSH como principal composto antioxidante intracelular, o α -tocoferol, os polifenóis, o ácido ascórbico, a melatonina, a bilirrubina, o urato e o ácido lipóico (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

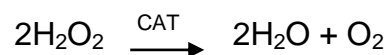
Como parte do sistema de defesa enzimático pode-se citar as enzimas superóxido dimutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx). A enzima SOD catalisa a dismutação de dois radicais superóxido, formando H_2O_2 e O_2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



As enzimas CAT e GPx atuam juntamente com a SOD articulando esse sistema de defesa, ou seja, impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Esse é removido principalmente pela GPx, utilizando GSH. Essa enzima é encontrada nas membranas celulares e está presente em grande quantidade no fígado (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



A CAT atua diretamente na redução do peróxido de hidrogênio em água como forma de prevenção da formação do radical hidroxila. Possui afinidade somente por moléculas de baixo peso molecular, não sendo capaz de metabolizar moléculas maiores como os peróxidos lipídicos. A CAT é encontrada em maior atividade nos tecidos com grande quantidade de peroxissomo, como no fígado, mas também pode ser encontradas em menor quantidade no citosol e na fração microsomal da célula (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



Normalmente, ocorre um equilíbrio entre a produção de ER e os sistemas de defesas antioxidantes (DROGE, 2002). Entretanto, quando há um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da alta geração de RL ou em detrimento da velocidade de remoção desses, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O cérebro é extremamente suscetível à ação dos RL e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo. Esse órgão apresenta um baixo nível de defesas antioxidantes, um alto conteúdo lipídico, um alto gasto de oxigênio por unidade de massa de tecido e alto nível de ferro em algumas áreas particulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Sendo assim, inúmeros trabalhos têm demonstrado a participação do estresse oxidativo na fisiopatologia de diversas doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, e esclerose múltipla e a esclerose lateral amiotrófica (MANCUSO et al., 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007) e também de erros inatos do metabolismo de aminoácidos (MACHADO et al., 2011; FERREIRA et al., 2012). É necessário frisar que estas doenças podem ser tanto geradoras de ERO quanto resultantes de um desequilíbrio na produção dessas espécies (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

4. ARTIGO

Acute administration of methionine and methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters in cerebral cortex of rats

Melina Godoy Porto Tavares¹, Tatiane Morgana da Silva¹, Marcelo Zanusso Costa¹, Pathise Souto Oliveira¹, Marta Gazal², Angela T.S. Wyse³, Rosélia Maria Spanevello⁴, Francieli Moro Stefanello¹

¹Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

²Centro de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

³Laboratório de Neuroproteção e Doença Metabólica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

*Address reprint requests to: Francieli Moro Stefanello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, Cep: 96010-900

Phone: 55 53 32757355

Fax: 55 53 32757354

Email: fmstefanello@gmail.com

Abstract

High plasma levels of methionine (Met) and its metabolites may occur in several inborn errors of metabolism, such as in methionine adenosyltransferase deficiency. Some hypermethioninemic patients can present a variable degree of neurological dysfunction; however, the exact mechanisms involved in these alterations remain elusive. Therefore, in the present we investigated whether oxidative stress is elicited by Met and/or methionine sulfoxide (MetO) in cerebral cortex homogenates of young rats. The *in vivo* effect of Met, MetO, as well as Mixture (Mix) studied on the following oxidative stress parameters: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total thiol group, carbonyl content, and the activity of antioxidant enzyme catalase (CAT). The animals were divided into four groups: saline, Met 0.4 g/Kg, MetO 0.1 g/Kg and Met 0.4 g/Kg + MetO 0.1 g/Kg and were euthanized 1 h after injection. Results showed that Mix increased TBARS levels, while Met and MetO did not modify this parameter. Total thiol group and carbonyl content were not altered by Met, MetO and Mix. In addition, Met, MetO and Mix decreased CAT activity. These data indicate that Met and/or MetO induce lipid peroxidation and alter enzymatic antioxidant defenses in cerebral cortex of rats, suggesting the oxidative stress as one possible pathophysiological mechanism of the brain damage observed in hypermethioninemic patients.

Key words: Methionine; Methionine sulfoxide; Oxidative stress; Cerebral cortex

Introduction

High methionine (Met) levels has been encountered in various inherited disorders such as methionine adenosyltransferase deficiency, in which metabolites as methionine sulfoxide (MetO) and methanethiol can also be increased in plasma and urine of affected patients. Some hypermethioninemic patients present neurological symptoms, including mental retardation, cognitive deficit and cerebral edema; however, the exact mechanisms involved in these alterations remain poorly understood (Mudd et al., 2000, 2001).

Oxidative stress arises as a result of an imbalance between antioxidant system (enzymatic and non-enzymatic) and reactive oxygen species (ROS) production. There is considerable evidence showing that high levels of free radicals may promote oxidative stress and cellular damage. Under normal conditions, the organism has antioxidant defense mechanisms action again ROS produced. In this situation, the first line of antioxidant enzymes involved are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) (Halliwell, 2011). At this point, it has been found lipid, protein and DNA oxidative damage, as well as reduced concentrations of enzymatic and non-enzymatic defenses in various common acute and chronic neurodegenerative pathologies, such as seizures, cerebral ischemia, demyelination, dementia and Alzheimer's disease (Li et al., 2013; Halliwell, 2006).

Despite a great deal of works on the neurotoxic effects of Met, the mechanisms behind these actions remains to be elucidated. However, *in vitro* studies have begun to identify some of the actions of Met to induce brain damage. In this context, we have previously demonstrated that this amino acid induces oxidative stress, reduces brain energy metabolism and inhibits Na^+, K^+ -ATPase activity in rat hippocampus *in vitro* (Stefanello et al., 2005; Streck et al., 2002, 2003). In addition,

hepatic and cerebral alterations have been described in animals submitted to hypermethioninemia model (Stefanello et al., 2011, 2009).

In the present study we investigated the *in vivo* effect of Met and MetO on some parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total thiol content, protein carbonyl content, as well as on catalase (CAT) activity in cerebral cortex of rats in order to clarify the underlying mechanisms inducing neurotoxic effects of these compounds.

Materials and Methods

Chemicals

Met and MetO were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and the highest purity.

Animals

Male Wistar rats, aged 29 days old, weighing between 80-120 g, were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12/12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room. Rats had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology and was approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil.

***In vivo* studies**

For the *in vivo* treatment the animals were divided into four groups: Group I (control); Group II (treated with Met 0.4 g/kg of body weight); Group III (treated with MetO 0.1 g/kg of body weight) and Group IV (treated with Met 0.4 g/kg + MetO 0.1 g/kg of body weight) (Costa et al., 2013). The rats received a single subcutaneous injection of Met and/ or MetO dissolved in saline and buffered to pH 7.4. The animals of Group I received an equivalent volume of saline. The animals were euthanized 1 h after injection.

Tissue and homogenate preparation

Animals were killed by decapitation. The cerebral cortex was dissected and homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 x g for 10 min at 4°C, the pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the measurements.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS, a measure of lipid peroxidation, was determined according to Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, homogenates were mixed with trichloroacetic acid 10 % and thiobarbituric acid 0.67 % and heated in a boiling water bath for 25 min. After centrifugation, TBARS was determined in supernatant at 535 nm. Results were reported as nmol of TBARS per mg protein.

Total sulfhydryl content

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery (2001), which is based on the reduction of DTNB by thiols and in turn becomes oxidized (disulfide) generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, homogenates were added to PBS buffer pH 7.4 containing EDTA. The reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Results were reported as nmol TNB/mg protein.

Carbonyl assay

Protein carbonyl was assayed by the method of Reznick and Packer (1994), which is based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Results were reported as nmol carbonyl/mg protein.

Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984). H_2O_2 disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer at 240 nm for 90 s. One unit of the enzyme is defined as 1 μ mol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity was reported as units per mg protein.

Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry et al., (1951) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the F-test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC compatible computer. Values of $P < 0.05$ were considered to be significant.

Results

We investigated the effect of acute exposure of Met and/or MetO on lipoperoxidation, protein oxidative damage and CAT activity in rat cerebral cortex. Figure 1 shows that 1 h after administration, the association between Met and MetO significantly increased TBARS levels, however Met and MetO did not alter this parameter [$F(3,18) = 3.89$, $P < 0.05$]. No change was observed in sulfhydryl [$F(3,16) = 1.01$, $P > 0.05$] and carbonyl content [$F(3,15) = 2.03$, $P > 0.05$] by Met, MetO and Met plus MetO after 1 h (Figure 2). As can be seen in Figure 3, CAT activity was significantly reduced by Met, MetO and Met plus MetO 1 h after the injection of these amino acid [$F(3,16) = 6.86$, $P < 0.01$].

Discussion

Hypermethioninemic patients exhibit various degrees of neurological symptoms, whose pathomechanisms are poorly understood. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of acute administration of Met and its metabolite on lipid peroxidation, oxidative damage to proteins and on antioxidant enzyme activity in the cerebral cortex of young rats. To our knowledge, this study is the first to investigate the contribution of MetO and the association between Met and MetO to brain alterations found in hypermethioninemia. The doses administered of Met and MetO

were chosen in order to mimic the tissue levels of these compounds present in affected patients (Stefanello et al., 2007a; Costa et al., 2013).

It is well known that reactive intermediates generated under conditions of oxidative stress cause the oxidation of polyunsaturated fatty acids in membrane lipid bilayers, leading eventually to the formation of aldehydes. Among these, the malondialdehyde (MDA), one the most abundant, is used as a marker for the peroxidation of lipids, measured by TBARS assay (Pizzimenti et al., 2013). In our study, we demonstrated that Met plus MetO significantly increased TBARS levels 1 h after administration, but Met and MetO alone did not affect this parameter. Corroborating with these findings, we have previously showed that Met, at 1 h after injection, does not change lipid peroxidation in hippocampus of rats (Stefanello et al., 2007b).

Proteins are major targets for ROS and secondary by-products of oxidative stress (Dalle-Donne et al., 2006). Protein oxidation can be determined using biological markers such as measure of sulfhydryl groups, which is employed to verify protein damage to sulphhydryl groups (Aksenov and Markesbery, 2001) and carbonyl content, formed mainly by oxidation of side chains of some amino acid residues (Dalle-Donne et al., 2006). Our results showed that Met and/or MetO did not alter these parameters in cerebral cortex, suggesting that acute administration of these compounds did not induce oxidative damage to protein.

Regarding CAT activity, it was observed that this enzyme activity was significantly reduced by acute administration of Met and/or MetO. CAT play critical role in protecting cells against the toxic effects of hydrogen peroxide (Halliwell and Gutteridge, 2007). Since nervous system is sensitive to free radical damage due to rich content of oxidizable fatty acids and relatively low content of antioxidants

(Halliwell and Gutteridge, 2007), it is conceivable to suggest that a reduction of CAT activity could increase hydrogen peroxide levels, contributing to the brain damage.

Taken together, these results provides evidence that Met and/or MetO administration induce oxidative damage in rat cerebral cortex, since provoke lipid peroxidation and alter enzymatic antioxidant defenses. In case our findings could be extrapolated to the human condition, it is supposed that these effects could be involved in the neurological symptoms found in hypermethioninemic patients.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS – Brazil) and Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil).

References

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*, 105: 121-126.
- Aksenov MY, Markesbery WR. 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 302: 141-145.
- Costa MZ, da Silva TM, Flores NP, Schmitz F, da Silva Scherer EB, Viau CM, Saffi J, Barschak AG, de Souza Wyse AT, Spanevello RM, Stefanello FM. 2013. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol Cell Biochem*, 384: 21-28.
- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*, 10: 389-406.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol*, 186: 407-421.
- Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97: 1634-1658.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 4th ed., New York.
- Halliwell B. 2011. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol Sci*, 32: 125-130.
- Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. 2013. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*, 14: 24438-24475.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.

- Mudd SH, Jenden DJ, Capdevila A, Roch M, Levy HL, Wagner C. 2000. Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. *Metabolism*, 49: 1542-1547.
- Mudd SH, Levy HL, Skovby F. 2001. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, vol. 2, pp 1279-1327.
- Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, Minelli R, Dianzani C, Lepore A, Gentile F, Barrera G. 2013. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol*, 4: 242.
- Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 233: 357-363.
- Stefanello FM, Chiarani F, Kurek AG, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse AT. 2005. Methionine alters Na⁺,K⁺-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci*, 23: 651-656.
- Stefanello FM, Matté C, Scherer EBS, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse AT. 2007a. Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. *J Neurosci Methods*, 160: 1-4.
- Stefanello FM, Scherer EB, Kurek AG, Mattos CB, Wyse AT. 2007b. 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.
- Stefanello FM, Matté C, Pederzolini CD, Kolling J, Mescka CP, Lamers ML, de Assis AM, Perry ML, dos Santos MF, Dutra-Filho CS, Wyse AT. 2009. Hypermetioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. *Biochimie*, 91: 961-968.

- Stefanello FM, Ferreira AG, Pereira TC, da Cunha MJ, Bonan CD, Bogo MR, Wyse AT. 2011. Acute and chronic hypermethioninemia alter Na^+, K^+ -ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. *Int J Dev Neurosci*, 29: 483-488.
- Streck EL, Zugno AI, Tagliari B, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse AT. 2002. Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Metab Brain Dis*, 17: 83-91.
- Streck EL, Delwing D, Tagliari B, Matté C, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse AT. 2003. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem Int*, 43: 597-602.

Figures

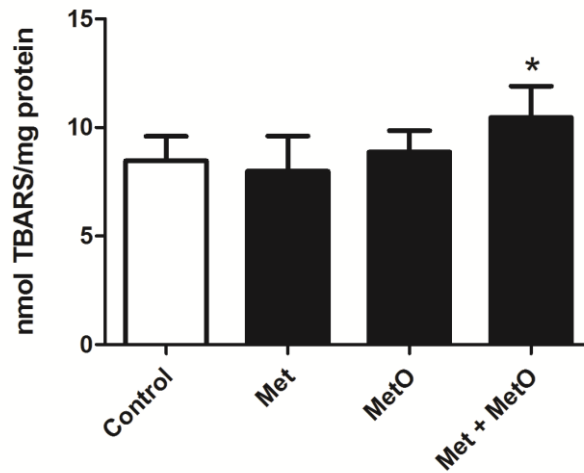


Figure 1. *In vivo* effect of methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO) on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in cerebral cortex of rats. The levels of TBARS were reported as nmol TBARS per mg protein. Data are mean \pm S.D. (n=5-6) for independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$ compared to control group (Duncan multiple range test).

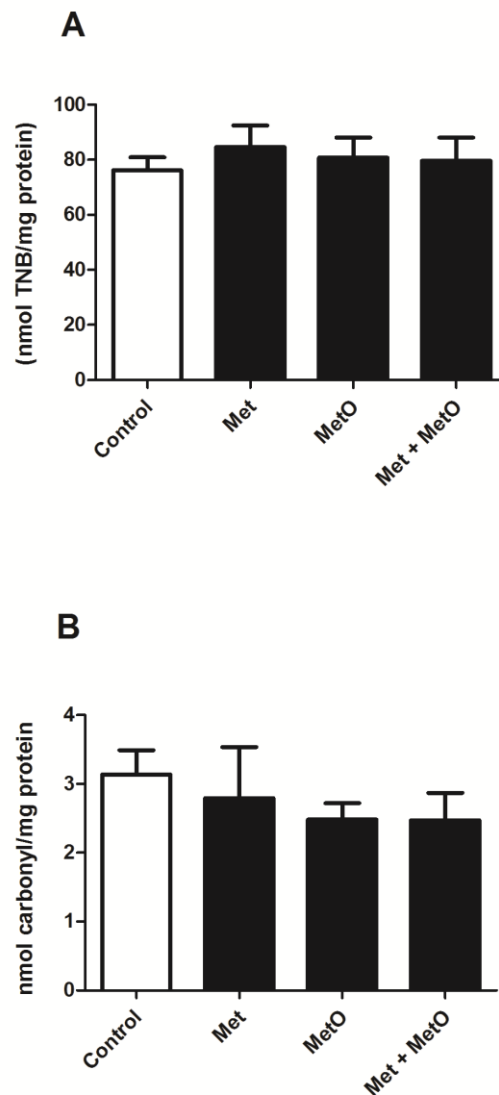


Figure 2. *In vivo* effect of methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO) on total thiol (A) and carbonyl content (B) in cerebral cortex of rats. Total thiol group was reported as nmol TNB per mg protein and carbonyl content as nmol of carbonyl per mg protein. Data are mean \pm S.D. (n=4-7) for independent experiments performed in duplicate. No significant difference between groups, $P > 0.05$ (Duncan multiple range test).

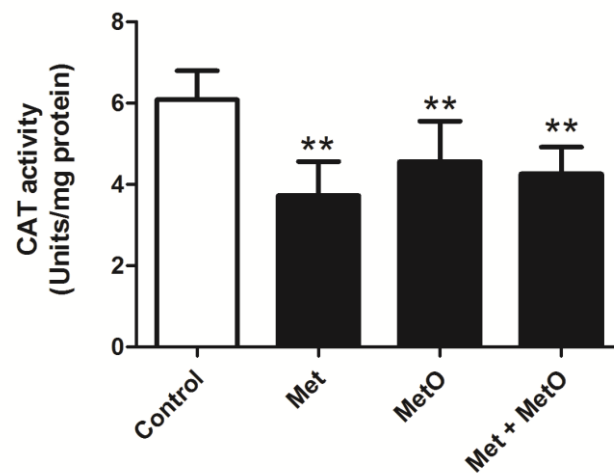


Figure 3. *In vivo* effect of methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO) on catalase (CAT) activity in cerebral cortex of rats. Data are mean \pm S.D. (n=4-6) for independent experiments performed in duplicate. ** $P < 0.01$ compared to control group (Duncan multiple range test).

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nesse trabalho, concluímos que:

- A associação de Met e MetO aumenta os níveis de TBARS 1 h após a administração;
- A Met e/ou MetO diminuem a atividade da CAT 1 h após a administração desses compostos;
- Os conteúdos de tióis totais e de carbonilas não foram modificados pelos compostos testados.

Em conjunto, demonstramos que a administração aguda de Met e/ou MetO altera a lipoperoxidação e a atividade da enzima antioxidante CAT em córtex cerebral de ratos. Dessa forma, podemos sugerir um envolvimento do dano oxidativo nas alterações cerebrais observadas na hipermetioninemia.

6. REFERÊNCIAS

AMÂNCIO, F.A.M.; SCALCO, F.B.; COELHO, C.A.R.; Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo em um hospital universitário. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v.43, n.3, p.169-174, 2007.

BJURSELL, M.K.; BLOM, H.J.; CAYUELA, J.A.; ENGVALL, M.L.; LESKO, N.; BALASUBRAMANIAM, S.; BRANDBERG, G.; HALLDIN, M.; FALKENBERG, M.; JAKOBS, C.; SMITH, D.; STRUYS, E.; DOBELN, U.V.; GUSTAFSSOM, C.M.; LUNDEBERG, J.; WEDELL, A. Adenosine Kinase Deficiency Disrupts the Methionine Cycle and Causes Hypermethioninemia, Encephalopathy, and Abnormal Liver Function. **The American Journal of Human Genetics**, v.89, p.507–515, 2011.

CHAMBERLIN, M.E.; UBAGAI, T.; MUDD, S.H.; WILSON, W.L.; LEONARD, J.V.; CHOU, J. Y. Demyelination of the brain is association with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. **Journal of Clinical Investigation**. v.98, p.1021-1027, 1996.

CHIEN, Y. H.; CHIANG, S.C.; HUANG, A.; HWU, W. L. Spectrum of hypermethioninemia in neonatal screening. **Early Human Development**. v.81, p.529-533, 2005.

COSTA, M. Z. Avaliação do efeito da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens: estudos *in vitro* e *in vivo*. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Mar 2013.

COSTA, M. L.; DA SILVA, T. M.; FLORES, N. P.; SCHMITZ, F.; SHERER, E. B. S.; VIAU, C. M.; SAFFI, J.; BARSCHAK, A. G.; WYSE, A. T. S.; SPANEVELLO, R. M.; STEFANELLO, F. M. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 384, p.21-28, 2013.

COUCE, M. L.; BÓVEDA, M. D.; CASTINEIRAS, D. E.; CORRALES, F. J.; MORA M. I.; FRAGA, J. M.; MUDD, S. H. Hypermethioninemia due to methionine adenosyltransferase I/III (MAT I/III) deficiency: Diagnosis in an expanded neonatal screening programme. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.31, p.233-239, 2008.

DHERAI, A.J. Inborn Errors of Metabolism and Their Status in India. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.32, p.263-279, 2012.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p.47-95. 2002.

EL HUSNY, A.S.; FERNANDES-CALDATO, M.C. Inborn errors of metabolism: Literature review. **Revista Paranaense de Medicina** v.20, p.41-45, 2006.

ELLAH, M. R. A. The Role of Liver Biopsy in Detection of Hepatic Oxidative Stress. **Veterinary Medicine International**, v.2011, p.1-7, 2011.

FERREIRA, A. G.; DA CUNHA, A. A.; SCHERER, E. B.; MACHADO, F. R.; DA CUNHA, M. J.; BRAGA, A.; MUSSULINI, B. H.; MOREIRA, J. D.; WOFCHUK, S.; SOUZA, D. O.; WYSE, A. T. Evidence that hyperprolinemia alters glutamatergic homeostasis in rat brain: neuroprotector effect of guanosine. **Neurochemical Research**, v 37, p.205-13, 2012.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FINKELSTEIN, J. D. Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.1750S–1754S, 2006.

GARLICK, P.J. Toxicity of methionine in humans. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.1722S-1725S, 2006.

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**. 4. Ed. New York: Oxford UK, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, n. 2, p.231-55, 2004.

KARAM, S. M.; SCHWARTZ, I. V. D.; GIUGLIANI, R. Introdução e aspectos clínicos. In: Carakushansky G, editor. **Doenças genéticas em pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan p. 155-8, 2001.

KOC, A.; GLADYSHEV, V. N. Methionine sulfoxide reduction and the aging process, **Annals of the New York Academy of Sciences**. USA, v.1100, p.383–386, abr, 2007.

KOURY, J.C., DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.433-41, 2003.

LIANG, X.; KAYA, A.; ZHANG, Y.; LE, D.T.; HUA, D.; GLADYSHEV V.N. Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins. **BMC Biochemistry**, v.13, n.21, p.1-23, 2012.

MACHADO, F. R.; FERREIRA, A. G.; DA CUNHA, A. A.; TAGLIARI, B.; MUSSULINI, B. H.; WOFCHUK, S.; WYSE, A. T. Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺, k⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C. **Metabolic Brain Disease**, v.26, p.61-67, 2011.

MANCUSO, M.; COPPEDE, F.; MIGLIORE, L.; SICILIANO, G.; MURRI, L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.10, p.59-73, 2006.

MARTINOV, M.V.; VITVITSKY, V.M.; BANERJEE, R.; ATAULLAKHANOV, F.I. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1804, p.89-96, 2010.

MUDD, S. H.; JENDEN, D. J.; CAPDEVILA, A.; ROCH, M.; LEVY, H. L.; WAGNER, C. Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. **Metabolism**, v.49, p.1542-1547, 2000.

MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; KRAUS, J.P. Disorders of transsulfuration. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, New York: McGraw-Hill, 8 ed, pp. 2007-2056, 2001.

PRUDOVA, A.; MARTINOV, M. V.; VITVITSKY, V. M.; ATAULLAKHANOV, F. I.; BANERJEE, R. Analysis of pathological defect in methionine metabolism using a simple mathematical model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1741, p.331-338, 2005.

SCHAFFER, S.; TABAKASHI, K.; AZUMA, J. Role of osmoregulation in the actions of taurine, **Amino Acids**, v.19, p.527-546, 2000.

SEYMOR, C. A.; COCKBURN, F.; THOMASON, M. J.; LITTLEJOHNS, P.; CHALMERS, R. A.; LORD, J.; ADDISON, G. M.; WILCOX, A. H.; BAIN, M. D. Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review. **Health Technology Assessment**. v.1, n.11, pp. 1-112, 1997.

SMITH, C.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 980 p.

SOUZA, C.F.M.; SCHWARTZ, I. V.; GIUGLIANI, R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, p.129-37, 2002.

SREEKUMAR, P.G.; HINTON, D.R.; KANNAN, R. Methionine sulfoxide reductase A: Structure, function and role in ocular pathology. **World Journal of Biological Chemistry**, v.2, n.8, p.184-192, 2011.

STADTMAN, E. R. "Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation," **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 423, n. 1, pp. 2-5, 2004.

STEFANELLO, F. M.; CHIARANI, F.; KUREK, A.G.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. Methionine alters Na⁺,K⁺-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.23, p.651-656, 2005.

STEFANELLO, F.M.; MATTÉ, C.; PEDERZOLLI, C.D.; KOLLING, J.; MESCKA, C.P.; LAMERS, M.L.; ASSIS, A.M.; PERRY, M.L.; SANTOS, M.F.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.S. Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. **Biochimie**, v.91, p.961-968, 2009.

STEFANELLO, F.M.; FERREIRA, A.G.K.; PEREIRA, T.C.B.; CUNHA, M.J.; BONAN, C.D.; BOGO, M.R.; WYSE, A.T.S. Acute and chronic hypermethioninemia alter Na^+, K^+ -ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.29, p.483-488, 2011.

STIPANUK, M. H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. **Annual Review Nutrition**, v. 24, p.539-577, 2004.

STRECK, E.L.; ZUGNO, A.L.; TAGLIARI, B.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. **Metabolic Brain Disease**, v.17, p.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. **Neurochemistry International**, v.43, p.597-602, 2003.

SUAREZ, O. L.; PICO, M.L.C.; MUÑUZURI, A.P.; RAMOS, D.E.C.; LORENZO, J.R.F. Hipermetioninemia en el recién nacido pretérmino. Estudio de los factores predisponentes. **Anales de Pediatría**, v.72, n.3, p.179-184, 2010.

WATERLAND, R. A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **Journal of Nutrition**. v.136, p.1706S-1710S, 2006.

VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools targets, and reversal, **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 18, p. 93-105, 1995.

ZHAO, H.; KIM, G.; LEVINE, R.L. Methionine sulfoxide reductase contributes to meeting dietary methionine requirements. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.522, p.37-43, 2012.