

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO**



Dissertação

**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***

Marcelo Zanusso Costa

Pelotas, 2013

MARCELO ZANUSSO COSTA

Dissertação

**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***

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção da Universidade
Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências
(Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Roselia Maria Spanevello

Pelotas, 2013

Universidade Federal de Pelotas
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**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***

elaborada por
Marcelo Zanusso Costa

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção)

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Rejane Giacomelli Tavares (UFPel)

Prof. Dr. William Peres (UFPel)

Pelotas, março de 2013

Dedico este trabalho aos meus pais, Rita e Antônio, por todas as oportunidades que me proporcionaram de estudar, pelo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais e Irmão, por proporcionarem condições de estudar, trabalhar e desenvolver meus conhecimentos, por me apoiarem. Obrigado pelo amor e carinho.

Aos meus familiares por toda preocupação, atenção e força em cada etapa de desenvolvimento profissional. Por toda ajuda até hoje. Faltam agradecimentos para todo incentivo. Obrigado pelo apoio.

A minha amiga Elisa Siqueira pela amizade, disposição, incentivo e as aulas de Química e Bioquímica como forma de preparo para a seleção de mestrado. Você foi o ponto de partida para este desafio. Obrigado.

A minha orientadora Prof^a. Francieli Moro Stefanello, pela oportunidade, por acreditar que eu poderia desenvolver este projeto, por todo o conhecimento e dedicação, também pela amizade e pela paciência ao longo desse período. Obrigado pelo desenvolvimento profissional e pessoal.

A minha co-orientadora Prof^a. Roselia Maria Spanevello pelos conhecimentos repassados, pela disposição, pela energia durante cada momento. Pelo exemplo profissional. Obrigado por orientar e acreditar neste trabalho.

Aos professores da academia e a todos meus alunos. Muito obrigado pela convivência, pelo carinho, pelo auxílio e por estudar e aprenderem junto comigo.

Aos professores, Alethéa Barchak, Márcia Mesko, Eliz Braganhol, Massako Takahashi Dourado, Luciano do Amarante, Airton Rombaldi e Angela Wyse por abrirem as portas a novos conhecimentos, por disponibilizarem seus laboratórios, ajudarem no meu desenvolvimento, nos experimentos e novos projetos. Obrigado pelo carinho, pela atenção e por serem exemplos de professores e pesquisadores.

Aos doutorandos, mestrandos e bolsistas de iniciação científica dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal, de Materiais e Catálise, Cultivo Celular, de Biomarcadores e ao de Neuroproteção e Doenças Metabólicas (UFRGS), por toda ajuda, pelos momentos de estudo, conhecimento, parceria e amizade. Obrigado por todo apoio e comprometimento.

Aos funcionários do Biotério Central, local que aprendi e desenvolvi além do projeto, o real sentido de respeito, parceria, profissionalismo, planejamento e

dedicação. Obrigado pelo ensino e por toda disposição prestada para andamento deste e outros projetos.

Aos meus amigos Tiago Hartwig e Carol Castro Neves, Esther Habeyche e Ox Sias D´avila, por cada momento que dispuseram a me ajudar, escutar e discutir sobre o futuro, sobre esses novos conhecimentos e também pelos momentos de lazer, que possibilitam renovar nossas forças e seguir firme nas atividades do dia a dia. Obrigado por cada Novo Ano.

A minha amiga e aluna, Aline Silveira Borges, pelo ano difícil, mas de reaproximação, de luta e de vontade de viver. Obrigado por todo carinho e por mostrar que uma amizade nunca se perde. Praticamente encerramos esse ciclo juntos.

Em especial aos meus primos Vinicius Costa que sempre me ajudou em todas minhas novas ideias, inclusive, na minha dissertação com suas imagens e seu talento, e ao meu primo Humberto Medeiros, pelas dicas e pelos seus conhecimentos veterinários, com os animais dos experimentos.

Agradeço aos auxílios financeiros recebidos para a execução deste trabalho.

“Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estivermos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

COSTA, Marcelo Zanusso. **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***. 2012. 56f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Diversos estudos têm demonstrando que a metionina e/ou seus metabólitos podem ser extremamente tóxicos quando encontrados em altas concentrações nos tecidos. Pacientes hipermetioninêmicos podem apresentar um grau variável de disfunção neurológica e alterações hepáticas, cujos mecanismos não são completamente estabelecidos. No presente estudo, investigamos se o estresse oxidativo é induzido pela metionina e/ou metionina sulfóxido em fígado de ratos Wistar de 29 dias de idade. O efeito *in vitro* de diferentes concentrações de metionina (20-2000 μ M), metionina sulfóxido (5-500 μ M) e da associação desses aminoácidos, bem como o efeito da administração aguda de metionina (0,4 g/Kg de peso corporal) e/ou metionina sulfóxido (0,1 g/Kg de peso corporal) foram avaliados sobre os seguintes parâmetros de estresse oxidativo: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de carbonilas e sulfidrilas, atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Nos estudos *in vivo*, os animais foram mortos 1 h e 3 h após a administração dos aminoácidos. Os resultados *in vitro* mostraram que a metionina 1000 e 2000 μ M, e a associação de metionina e metionina sulfóxido aumentaram significativamente a atividade da CAT. A atividade da SOD foi aumentada pela metionina 1000 e 2000 μ M, metionina sulfóxido 500 μ M e também pela associação destas. Em contraste, os níveis de TBARS, conteúdo de carbonilas e conteúdo tiólico total não foram alterados pelos compostos. Com relação aos estudos *in vivo*, a metionina e/ou metionina sulfóxido diminuíram os níveis de TBARS, o conteúdo tiólico total e a atividade da CAT, bem como alteraram a carbonilação proteica 1 h após as suas administrações. A atividade da SOD não foi modificada pelos compostos. Adicionalmente, demonstramos que metionina e/ou metionina sulfóxido aumentaram o conteúdo tiólico total e a atividade da SOD, diminuíram a atividade da CAT, porém não modificaram os demais parâmetros avaliados 3 h após as suas administrações. Em conjunto, nossos resultados mostram claramente que os aminoácidos avaliados alteram o estado redox em fígado de ratos jovens. Dessa forma, pode-se propor uma associação desses achados com a disfunção hepática observada em pacientes hipermetioninêmicos.

Palavras-chave: Metionina; Metionina sulfóxido; Estresse oxidativo; Fígado

ABSTRACT

COSTA, Marcelo Zanusso. **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***. 2012. 56f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

There are several studies demonstrating that the methionine and/or its metabolites can be extremely toxic when found in high concentrations in tissues. Hypermethioninemic patients may have a varying degree of neurological dysfunction and liver abnormalities, whose mechanisms are not fully established. In the present study we investigated whether oxidative stress is elicited *in vitro* and *in vivo* by methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO) in liver of young rats. The effect of different concentrations of Met (20-2000 μ M), MetO (5-500 μ M), as well as Mixture (Mix) (1000 μ M Met plus 500 μ M MetO), and of acute administration of Met (0.4 g/Kg of body weight) and/or MetO (0.1 g/Kg of body weight) were studied on the following oxidative stress parameters: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl content, total thiol content, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities. For *in vivo* studies, the animals were killed 1 h and 3 h after amino acids administration. *In vitro* studies showed that Met 1000 and 2000 μ M, and Mix significantly increased CAT activity. The activity of SOD was enhanced by Met 1000 and 2000 μ M, MetO 500 μ M and Mix. In contrast, TBARS levels, carbonyl and thiol content were not altered by Met, MetO and association of these compounds. Acute administration showed that Met, MetO and Met plus MetO decreased TBARS at 1 h after injection. Total thiol content decreased at 1 h and increased at 3 h after MetO and Met plus MetO administrations. Carbonyl content was enhanced by Met and reduced by MetO at 1 h. Met, MetO and Met plus MetO decreased CAT activity at 1 h and 3 h after administration. Besides, only MetO increased SOD activity. Our findings indicate that Met and/or MetO alter redox cellular state in liver of young rats. It is assumed that these data can be associated, at least partly, with the liver damage observed in hypermethioninemic patients.

Key words: Methionine; Methionine sulfoxide; Oxidative stress; Liver

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da L-metionina.....	17
Figura 2	Metabolismo da metionina.....	18
Figura 3	Estrutura química da metionina- <i>S</i> -sulfoxido e metionina- <i>R</i> -sulfoxido.....	19
Figura 4	Formação de espécies reativas.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

CBS – Cistationina β -sintase

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EIM – Erros inatos do metabolismo

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GNMT – Glicina-*N*-metiltransferase

GSH – Glutathiona reduzida

GPx – Glutathiona peroxidase

MAT – Metionina adenosiltransferase

MSR – Metionina sulfóxido redutase

SAH – S-adenosil-homocisteína

SAHH – S-adenosil-homocisteína hidrolase

SAM – S-adenosil-metionina

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNB – Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico

SUMÁRIO

PARTE I.....	2
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
PARTE II.....	12
INTRODUÇÃO.....	12
OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	15
3.2 Metionina e Metionina Sulfóxido.....	16
3.3 Hipermetioninemia.....	20
3.4 Estresse Oxidativo.....	21
PARTE III.....	27
ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
PARTE IV.....	48
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	55

INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças hereditárias que se caracterizam pela deficiência em uma proteína, normalmente uma enzima. Essa deficiência pode ser parcial ou total, como consequência, ocorre o acúmulo de substratos e seus derivados, muitas vezes tóxicos, sendo determinantes na identificação das rotas metabólicas afetadas (PIRO et al., 2009; DHERAI, 2012).

Existem diversos estudos demonstrando que a metionina e/ou seus metabólitos podem ser extremamente tóxicos quando encontrados em altas concentrações nos tecidos, isso porque possuem enxofre em sua estrutura, o qual é muito suscetível à oxidação por espécies reativas, principalmente em condições de estresse oxidativo (GARLICK, 2006; LUO; LEVINE, 2009; BJURSELL et al., 2011; BUTTERFIELD; SULTANA, 2011; LIANG et al., 2012; YAMADA et al., 2012).

Nesse contexto, a hipermetioninemia ocorre em várias desordens metabólicas, dentre elas, na deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Nessa doença, a concentração plasmática de metionina pode atingir até 2.500 $\mu\text{mol/L}$, sendo que os valores normais estão em torno de 30 $\mu\text{mol/L}$. Elevadas concentrações de metabólitos, como a metionina sulfóxido, o metanotiol e o sulfeto de hidrogênio, também podem ser observadas no plasma e na urina dos pacientes afetados por essa doença (MUDD; LEVY; KRAUS, 2001). Embora alguns pacientes hipermetioninêmicos sejam assintomáticos, um número considerável apresenta alterações neurológicas como déficit cognitivo, edema e desmielinização cerebral, bem como danos hepáticos, cujas fisiopatologias ainda não estão completamente elucidadas (MUDD et al., 2000; MUDD; LEVY; KRAUS, 2001).

A toxicidade da metionina tem sido evidenciada através de estudos *in vitro* demonstrando que esse aminoácido induz estresse oxidativo e altera importantes parâmetros do metabolismo energético em cérebro de ratos (STRECK et al., 2002, 2003; STEFANELLO et al., 2005). Adicionalmente, estudos demonstram a hepato e neurotoxicidade da exposição aguda e crônica à metionina em ratos (STEFANELLO et al., 2009, 2011).

O estresse oxidativo, o qual é caracterizado pelo aumento da produção de oxidantes e/ou diminuição dos níveis de antioxidantes, é um importante processo que 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; FEDERICO, 2003; KIM et al., 2004; TANIKAWA; TORIMURA, 2006). Yalçinkaya, Unluçerçi e Uysal (2007) demonstraram que uma dieta suplementada com metionina aumenta o dano oxidativo e a hepatotoxicidade em ratos cronicamente tratados com etanol. Adicionalmente, tem sido demonstrado que o consumo excessivo de metionina pode provocar retardo no crescimento e induzir estresse oxidativo em fígado de ratos (MORI; HIRAYAMA, 2000).

A metionina e alguns metabólitos formados pela sua metabolização procuram estabelecer o estado redox celular, com isso estudos precisam ser desenvolvidos no intuito de esclarecer a função e de que forma cada metabólito interfere no ciclo da metionina, bem como para compreender o papel desses aminoácidos nas alterações hepáticas observadas nos pacientes hipermetioninêmicos, uma vez que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessas alterações são pouco conhecidos.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi estudar o efeito *in vitro* e *in vivo* da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de metionina e/ou metionina sulfóxido sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de sulfidrilas e carbonilas, atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)) em fígado de ratos jovens.
- Estudar o efeito *in vivo* da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens 1 h após a administração desses aminoácidos.
- Estudar o efeito *in vivo* da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens 3 h após a administração desses aminoácidos.

REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os primeiros relatos relacionados aos EIM datam por volta de 1909, quando Archibald Edward Garrod, médico inglês, publicou seu livro intitulado *Inborn errors of metabolism*, com seus estudos sobre doenças genéticas descrevendo sobre o albinismo, alcaptonúria, cistinúria e pentosúria (GARROD, 1909; PIRO et al., 2009; SHLOMI; CABILI; RUPPIN, 2009; DHERAI, 2012).

Os EIM são doenças hereditárias, a maioria autossômica recessiva, que se caracterizam pela deficiência em uma proteína, normalmente uma enzima (PIRO et al., 2009; DHERAI, 2012). Essa deficiência pode ser parcial ou total, como consequência disso ocorre o acúmulo de substratos e seus derivados, muitas vezes tóxicos, sendo determinantes na identificação das rotas metabólicas afetadas (DHERAI, 2012).

A gravidade da doença é proporcional à importância da rota metabólica afetada e também ao grau de deficiência na enzima. Os sintomas são variados e inespecíficos, podendo ser assintomáticos ou graves. De um modo geral, considera-se que quanto mais cedo os sintomas aparecerem, mais grave é a doença (DHERAI, 2012).

Foram descritos mais de 500 EIM, a maioria deles envolvem deficiência em processos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas.

Esses distúrbios podem ser divididos em 3 grandes grupos:

1. Distúrbios de síntese ou degradação de moléculas complexas: nessa categoria estão os erros que alteram a síntese ou catabolismo de moléculas complexas, onde incluem deficiências lisossômicas, peroxissomais, deficiências congênitas de glicosilação e erros na síntese de colesterol. As alterações presentes nesses distúrbios são permanentes e independem das intercorrências de sintomas (DHERAI, 2012).

2. Erros inatos do metabolismo intermediário: incluem aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos no ciclo da ureia e intolerâncias aos carboidratos. Os sintomas podem aparecer no período

neonatal ou mais tardiamente. O ciclo da doença pode ter intervalos livres de sintomas, ainda podem ter sinais agudos (vômito, coma, insuficiência hepática) ou crônicos (atraso de desenvolvimento, cardiomiopatia, entre outras) (DHERAI, 2012).

3. Doenças com déficit de energia: também são erros do metabolismo intermediário, contudo, os sintomas estão relacionados a erros referentes à produção e ou utilização de energia, incluem erros do ciclo de Krebs, glicogênese, cadeia respiratória, acidemias lácticas congênitas, como deficiências no complexo da piruvato desidrogenase e na enzima piruvato carboxilase, ainda deficiência na oxidação de ácidos graxos. Como sintomologia apresentam déficit de crescimento, hipoglicemia, miopatia, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, síndrome da morte súbita infantil ou malformação (DHERAI, 2012).

Apesar de raros quando considerados isoladamente, os EIM são frequentes, afetam um em cada mil recém-nascidos vivos, e representam 20% das mortes por doenças genéticas (DHERAI, 2012). Ainda, 1/3 dos casos são do metabolismo intermediário referente a aminoácidos, onde temos como exemplo a hipermetioninemia, objeto desse estudo.

Em um estudo espanhol, realizado na Galícia, com dados coletados no ano de 2000, foram analisados 140.818 recém-nascidos e a incidência de hipermetioninêmicos foi de 1 caso para 23.470 nessa região. Nesse estudo, foram identificados 6 casos, sendo 1 com deficiência na enzima cistationina β -sintase (CBS) e os outros 5 referentes a deficiência em MAT I/III, sendo assim, o número de casos para essa deficiência enzimática foi de 1 caso para 28.164 recém-nascidos (COUCE et al., 2008).

3.2 Metionina e Metionina Sulfóxido

A metionina (Figura 1) é um aminoácido essencial, dessa forma, deve ser incorporada na alimentação de recém-nascidos, principalmente, aqueles com menor idade gestacional. É fundamental no desenvolvimento adequado do sistema nervoso central pelo papel que exerce sobre a formação da mielina, na síntese de proteínas, no metabolismo do enxofre, na metilação e na regulação do equilíbrio redox. Sendo

assim, o controle no metabolismo da metionina é importante, para fornecer aminoácidos às diversas necessidades celulares (SUAREZ et al., 2010).

Como principal produto de sua oxidação, gera-se a metionina sulfóxido – com função de regulação e defesa celular – além de outros metabólitos.

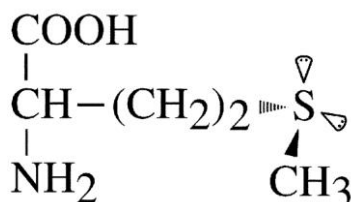


Figura 1 – Estrutura química da L-metionina.

A metionina possui enxofre em sua estrutura, muito suscetível à oxidação por espécies reativas de oxigênio (ERO). Essa suscetibilidade à oxidação e a atividade das enzimas que influenciam no ciclo da metionina, são fundamentais na regulação dessa rota metabólica, especialmente em condições de estresse oxidativo (LUO; LEVINE, 2009; BJURSELL et al., 2011; BUTTERFIELD; SULTANA, 2011; LIANG et al., 2012; YAMADA et al., 2012).

Além de compor proteínas ou ser oxidada, a metionina pode seguir outra direção entrando no ciclo que compreende uma série de conversões enzimáticas (Figura 3). No primeiro passo, a enzima MAT converte metionina em S-adenosil-metionina (SAM) que, por sua vez, doa grupos metila através da enzima glicina-*N*-metiltransferase (GNMT), uma das aproximadamente 60 metiltransferases, para uma grande variedade de aceptores desses grupamentos formando S-adenosil-homocisteína (SAH). O próximo passo é a formação de homocisteína e adenosina, através da enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase (SAHH) (MARTINOV et al., 2010; BJURSELL et al., 2011). A homocisteína pode ser metabolizada por duas vias, a de remetilação e de transulfuração. Na primeira, ela recebe um grupamento metila da betaína ou do 5-metil-tetrahidrofolato ressintetizando metionina. Já na outra, a enzima cistationina β-sintase (CBS) catalisa a conversão de homocisteína em cistationina, que é hidrolisada pela enzima cistationina γ-liase, formando cisteína ou ainda piruvato e sulfato. A via de transulfuração é irreversível (MARTINOV et al., 2010; BJURSELL et al., 2011).

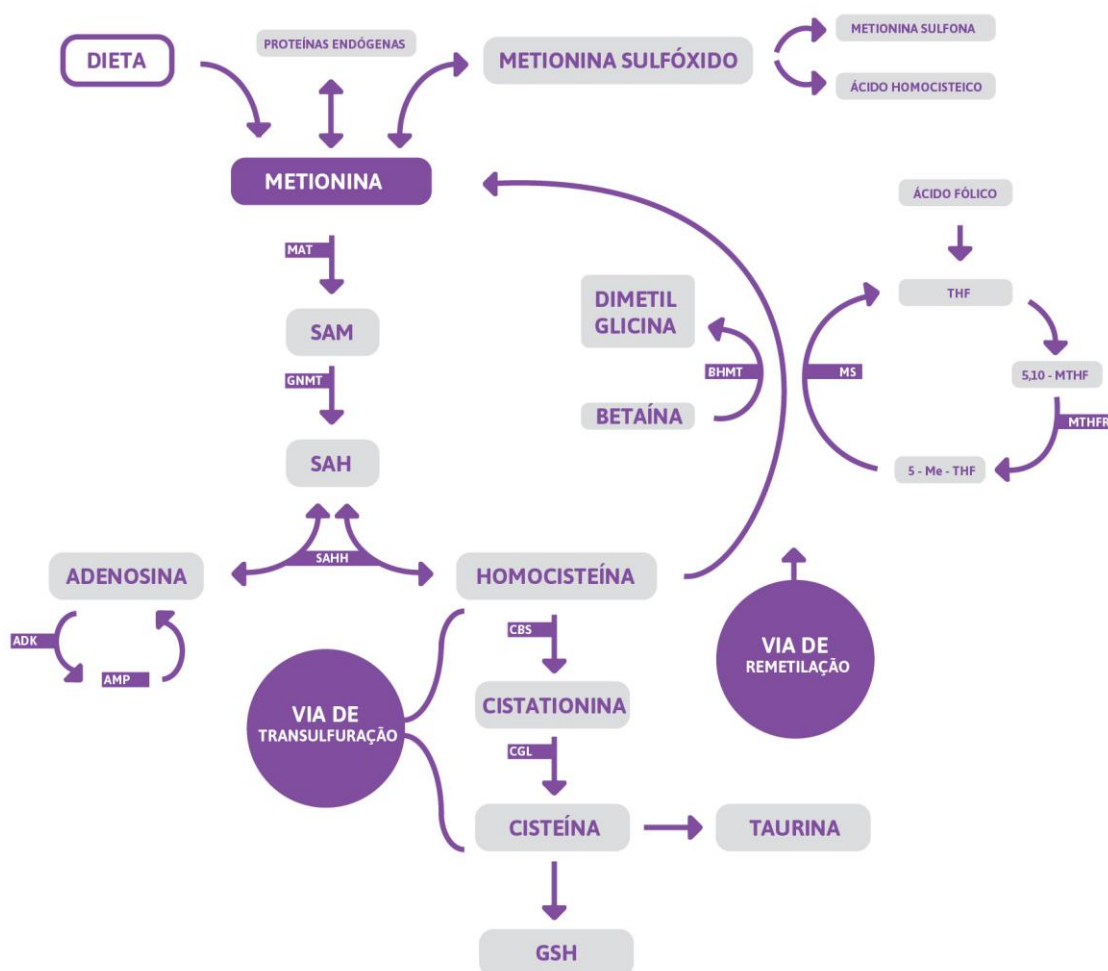


Figura 2 – Metabolismo da metionina (Adaptado de YAMADA et al., 2012).

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 metionina pode ser considerada uma fonte de compostos antioxidantes, que atuam na defesa contra as espécies reativas como forma de equilibrar o estado redox. Como já apresentado, durante sua rota metabólica alguns compostos antioxidantes podem ser formados, entre eles cisteína que ainda pode formar

glutathiona reduzida (GSH) ou ser oxidada a taurina. Entretanto, o consumo excessivo de metionina pode suprimir a ingestão de alimentos e provocar retardo no crescimento, ainda induzir lesões oxidativas no fígado, encefalopatia hepática, fígado graxo e danos às membranas de eritrócitos (MORI; HIRAYAMA, 2000; LUO; LEVINE, 2009; BJURSELL et al., 2011; LIANG et al., 2012; YAMADA et al., 2012). A suplementação de metionina também provoca alterações no sistema redox hepático, induzindo a peroxidação lipídica e o acúmulo de ferro, e ainda alterando a atividade das enzimas CAT e glutathiona peroxidase (GPx) em ratos (MORI; HIRAYAMA, 2000).

A metionina sulfóxido, um dos metabólitos da metionina, quer em proteína ou como aminoácido livre, existe de duas formas chamadas de diastereômeros, metionina-*S*-sulfóxido, encontrada em mamíferos, e metionina-*R*-sulfóxido (Figura 3). Esse aminoácido representa cerca de 4-10% da metionina total (ZHAO; KIM; LEVINE, 2012). Pode também, ser subsequentemente oxidado formando metionina sulfona e ácido homocisteico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).



Figura 3 – Estrutura química da metionina-*S*-sulfóxido e metionina-*R*-sulfóxido.

Sabe-se que a conversão de metionina para metionina sulfóxido é reversível. A redução de metionina sulfóxido em metionina proporciona uma neutralização de espécies reativas e maior proteção para a célula. Praticamente todos os organismos têm metioninas sulfóxidos redutases (MSR), enzimas que catalisam a redução de metionina sulfóxido à metionina. Em mamíferos, encontramos MSR do tipo A, que é responsável por catalisar a redução da metionina-*S*-sulfóxido (LUO; LEVINE, 2009; ZHAO; KIM, LEVINE, 2012). No entanto, a oxidação da metionina em metionina sulfóxido tem sido sugerida como importante agente no envelhecimento, causa de

doenças e como método de regulação de atividades proteicas, devido à produção de radicais livres na reação (SAUNDERS; STITES, 2012).

3.3 Hipermetioninemia

A hipermetioninemia pode ser originada principalmente de duas formas: não genética ou ser proveniente de EIM (BJURSELL et al., 2011).

A conversão de metionina em homocisteína ocorre em 3 etapas enzimáticas principais, que podem ser afetadas nos EIM (BJURSELL et al., 2011; MUDD, 2011).

Na primeira etapa, pode ocorrer à deficiência da enzima MAT, na qual alguns pacientes afetados podem ser assintomáticos. Já na segunda etapa, podemos encontrar a deficiência na enzima GNMT. A deficiência de GNMT resulta em acúmulo de SAM, já que a metilação é afetada de forma importante. A sintomatologia nesse caso é discreta e pode ocorrer dano hepático. Na terceira etapa do ciclo podem ocorrer dois EIM. A SAHH afeta a hidrólise de SAH em homocisteína e adenosina. O quadro clínico é grave, apresentando disfunção hepática, miopatia e desenvolvimento psicomotor anormal. Por fim, tem-se a deficiência da CBS, onde há interrupção da conversão de homocisteína em cistationina. Dessa forma, o acúmulo de homocisteína resulta em hipermetioninemia pela via de remetilação. O quadro clínico também é grave apresentando anormalidades esqueléticas, retardo mental, descolamento de lentes ópticas e tromboembolias (BJURSELL et al., 2011).

Dos 4 erros do metabolismo no ciclo da metionina, a MAT é a causa mais comum de hipermetioninemia isolada. A supressão ou redução da atividade dessa enzima é considerada uma doença autossômica recessiva rara, decorrente de mutações no gene MAT1A, responsável por codificar as subunidades catalíticas das duas isoenzimas presente no fígado de mamíferos adultos (MAT I e MAT III). É bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual de metionina de forma persistente e pela falta do produto SAM, consequentemente níveis normais de homocisteína ou pouco elevada são encontrados, o que proporciona um desequilíbrio no estado redox nessa rota metabólica (SUN; LAM; WONG, 2012). A concentração normal de metionina no plasma é de 30 $\mu\text{mol/L}$, quando hipermetioninêmico, o paciente pode apresentar concentrações de até 2.500 $\mu\text{mol/L}$ (MUDD, 2011). Metabólitos como a metionina sulfóxido também podem encontrar-se

elevados no plasma e na urina dos pacientes afetados (COUCE et al., 2008; BJURSELL et al., 2011; MUDD, 2011).

A maioria dos indivíduos afetados pela doença, ainda nos primeiros anos de vida, não apresenta sintomas clínicos, mas alguns deles, com deficiência enzimática mais acentuada, apresentam problemas de desenvolvimento neurológico, retardo mental, odor corporal característico, tumores hepáticos, insuficiência hepática, problemas circulatórios, tremor, distonia, dificuldade de linguagem. O diagnóstico deve ser feito numa triagem durante o período neonatal, onde o nível de metionina deve ser detectado na corrente sanguínea do recém-nascido (COUCE et al., 2008; SUAREZ et al., 2010; SUN; LAM; WONG, 2012; YAMADA et al., 2012).

Muitos aspectos desse EIM ainda não estão claros, com isso, o tratamento prescrito é principalmente a redução do consumo de metionina, com objetivo de estabelecer a normalidade dos níveis desse aminoácido, em função de uma deficiência total ou parcial da enzima MAT. Outra possibilidade de tratamento, que pode responder em alguns casos, é a administração de SAM, mesmo sem a restrição de metionina (COUCE et al., 2008; SUAREZ et al., 2010; SUN; LAM; WONG, 2012; YAMADA et al., 2012).

3.4 Estresse Oxidativo

Radicais livres são definidos como qualquer elemento químico que exista de forma independente e que em sua camada orbital mais externa possua um ou mais elétrons desemparelhados, sendo altamente instáveis e quimicamente muito reativos. Entre eles encontramos ânion superóxido, radical hidroxila, radical peroxil, radical alcóxil, bem como o óxido nítrico. Contudo, existem algumas espécies não radicais, que não possuem esse desemparelhamento de elétrons, porém sua ação pode ser tão prejudicial quanto dos radicais livres, como o peróxido de hidrogênio e oxigênio *singlet* (ELLAH, 2011). Dessa forma, o conjunto de espécies não radicais e radicais livres classifica-se como espécies reativas, sendo as de oxigênio e de nitrogênio, as mais importantes derivadas do metabolismo (ELLAH, 2011; ZOU et al., 2010).

As ERO são geradas continuamente no metabolismo, sobretudo na cadeia respiratória mitocondrial, onde em funcionamento normal, 2-5% do oxigênio consumido é incompletamente reduzido. Além disso, essas espécies são formadas

no processo inflamatório, pela exposição solar (raios UV), radiação ionizante e poluição (Figura 4) (ELLAH, 2011; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2011; SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011).

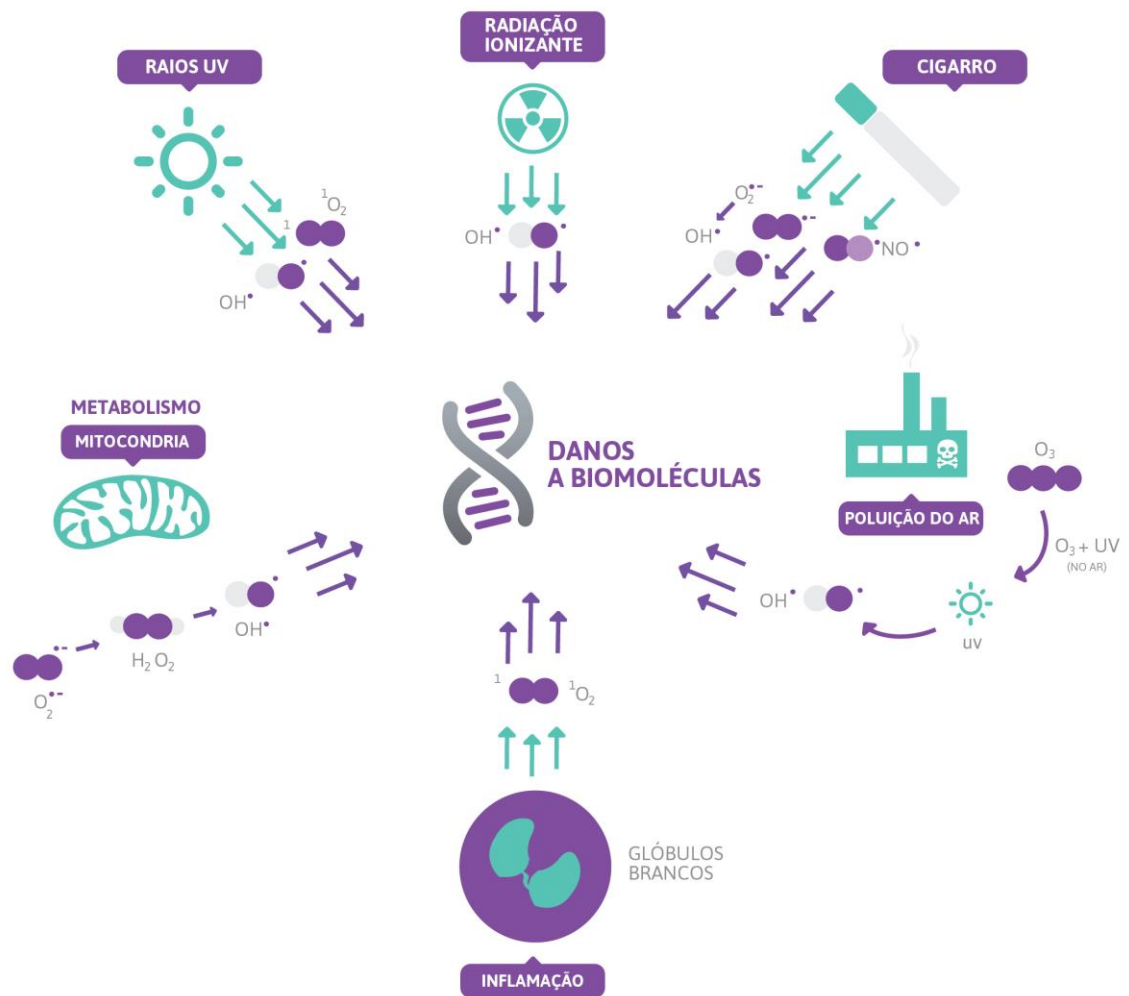


Figura 4 - Formação de espécies reativas.

A formação de espécies é fisiologicamente importante no processo fagocitário, de sinalização celular, de regulação de proteínas e resposta imunológica, no entanto, uma completa inibição de sua formação ou sua produção em excesso pode ser extremamente perigosa ao organismo, já que, por serem altamente reativas, podem provocar reações em cadeia e oxidar moléculas como lipídeos,

proteínas e DNA. Adicionalmente, estão associadas a diversas patologias como, disfunção hepática, inflamações, comprometimento imunológico, carcinogênese, podendo ainda causar dano ou morte celular (ZHANG et al., 2010; ZOU et al., 2010; ELLAH, 2011; BUTTERFIELD; SULTANA, 2011; SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011).

As membranas biológicas são vulneráveis aos ataques das espécies reativas, pois são compostas de lipídeos e proteínas. A peroxidação lipídica dessas membranas altera a estrutura celular, uma vez que interfere na permeabilidade da membrana e altera a seletividade nas trocas iônicas. Consequentemente ocorre a liberação e formação de produtos citotóxicos como malondialdeído, principal produto da peroxidação lipídica, 4-hidroxinonenal, entre outros. Essas substâncias induzem diretamente danos aos hepatócitos, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células fusiformes e fibrinogênese, que podem comprometer a função de moléculas e ocasionar danos celulares (ELLAH, 2011).

Os aminoácidos contendo enxofre, como metionina e cisteína, são os principais alvos de ERO, sendo altamente susceptíveis à oxidação. Esse processo pode tornar as proteínas inativas ou não funcionais, como resultado de mudanças estruturais e mau funcionamento catalítico (SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011). Adicionalmente, as espécies reativas podem danificar proteínas transmembrana, como enzimas, receptores e canais iônicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

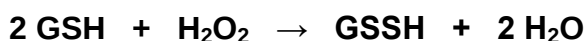
Visando a manutenção dos níveis de espécies reativas e a proteção celular dos efeitos danosos dessas espécies, o organismo possui defesas antioxidantes, que retardam ou previnem a oxidação de substratos. Dessa maneira, os antioxidantes atuam como protetores da oxidação de biomoléculas e impedem que a reação em cadeia se propague provocando danos celulares, podendo ser enzimáticos e não enzimáticos (SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011).

Nas defesas enzimáticas temos a superóxido dismutase (SOD), essa enzima apresenta isoenzimas contendo íons cobre e zinco (CuZnSOD) presente no citosol e com manganês (MnSOD) presente na mitocôndria. Essas isoenzimas catalisam a mesma reação, porém possuem estruturas diferentes (ELLAH, 2011).

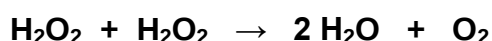
A SOD neutraliza o radical ânion superóxido formando peróxido de hidrogênio e oxigênio, conforme a reação abaixo:



Como produto dessa reação tem-se o peróxido de hidrogênio, o qual precisa ser removido à medida que é produzido. Essa remoção deve ocorrer, uma vez que, a reação dessa espécie com ânion superóxido forma radical hidroxila, o qual é o mais reativo radical livre e não pode ser neutralizado por defesas enzimáticas. Diante disso, o organismo possui outras enzimas que juntamente com a SOD articulam esse sistema de defesa, a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Assim, o peróxido de hidrogênio pode ser removido principalmente pela GSH-Px, utilizando glutathione reduzida (GSH). Essa enzima localiza-se nas membranas celulares e está presente em grande quantidade no fígado (ELLAH, 2011).



Da mesma forma, a remoção de peróxido de hidrogênio pode ocorrer pela CAT, contudo ela atua diretamente no peróxido de hidrogênio. Está presente na maioria dos tecidos, e também em sua maior parte no fígado. A CAT localiza-se nos peroxissomos, que são estruturas constituintes de muitas enzimas que produzem peróxido de hidrogênio, e também no citosol. Como produto da reação é formado água e oxigênio conforme apresentado abaixo (ELLAH, 2011):



As defesas não enzimáticas utilizam estratégias diferentes de proteção do organismo, sendo compostos com capacidade de neutralizar a ação das espécies reativas. Como exemplos desse tipo de defesa antioxidante temos o alfa-tocoferol, ácido ascórbico, GSH, polifenóis, melatonina, bilirrubina, luteína, entre outros (AYAN et al., 2011; BUTTERFIELD; SULTANA, 2011; ELLAH, 2011; KIM et al., 2012).

A GSH, além de ser um cofator das enzimas GPx, está envolvida em inúmeros processos metabólicos, incluindo o metabolismo do ascorbato, prevenção da oxidação de grupamentos tióis de proteínas, modulação da transdução de sinal, regulação da resposta imune e manutenção do estado redox celular. É sintetizada no citosol de todas as células animais, sendo o principal antioxidante endógeno do hepatócito (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; YUAN; KAPLOWITZ, 2009).

Podemos definir estresse oxidativo quando a produção de espécies reativas – causada por presença de toxinas ou ainda por ativação excessiva do metabolismo como em casos de inflamações crônicas – possui um balanço positivo em relação às defesas antioxidantes, ou ainda, quando essas mesmas defesas encontram-se com níveis diminuídos, por mutações enzimáticas ou ainda por deficiência de antioxidantes provenientes da dieta, apresentando o mesmo balanço negativo em relação às espécies reativas (ZOU et al., 2010; BUTTERFIELD; SULTANA, 2011; ELLAH, 2011).

O fígado, um dos maiores órgãos do corpo humano, está situado na cavidade abdominal. Apresenta uma variedade de tipos celulares como os hepatócitos, células endoteliais, de Kupffer, estreladas e natural *killer* hepáticas. Dentre as funções desse órgão destacam-se: metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos, armazenamento de vitaminas, secreção de sais e ácidos biliares, inativação e detoxificação de xenobióticos e metabólitos (LIEBERMAN; MARKS, 2009).

É importante salientar que o fígado possui elevada resistência ao dano oxidativo, pois dispõe de altos níveis de antioxidantes e adapta-se com facilidade às alterações metabólicas (GENET; KALE; BAQUER, 2002). No entanto, produtos formados a partir da oxidação de lipídeos, como o malondialdeído e 4-hidroxinonenal, já foram observados e detectados em locais ativos de fibrinogênese, mostrando que produtos da peroxidação lipídica podem estimular a formação de fibrinogênio. Esses danos são responsáveis por liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativação de células fusiformes e fibrinogênese, além disso, podem provocar disfunção celular e danos a biomoléculas (ELLAH, 2011).

Os hepatócitos são constituídos de muitas mitocôndrias, o que aumenta a produção de espécies reativas, contudo, características específicas de cada patologia parecem determinar se o estresse oxidativo é causa ou consequência. Estudos observando possíveis danos ao fígado são de extrema importância pela capacidade dessa glândula em interferir no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos, seja desintoxicando o organismo ou participando dos mecanismos de defesa. Do mesmo modo, distúrbios como aminoacidopatias e lesões hepáticas ainda são bastante estudados com objetivo de esclarecer e direcionar novos conhecimentos sobre os processos metabólicos envolvidos no sistema anti e pró-oxidante nesse tecido (GYAMFI et al., 2008, ELLAH, 2011, FERREIRA et al., 2012).

Considerando que a relação do dano oxidativo e a disfunção hepática presente em diversas doenças metabólicas, como na hipermetioninemia, ainda não é totalmente compreendida, a investigação *in vitro* e *in vivo* do efeito da metionina e metabólitos sobre parâmetros de estresse oxidativo pode ser uma importante ferramenta no auxílio ao entendimento dessa possível associação.

Capítulo 1

ARTIGO CIENTÍFICO

Todos os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma do artigo científico submetido ao periódico internacional conforme Anexo 1.

Methionine and/or methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in liver of young rats: *in vitro* and *in vivo* studies

Marcelo Zanusso Costa¹, Tatiane Morgana da Silva¹, Natália Porto Flores¹, Felipe Schmitz², Emilene Barros da Silva Scherer², Alethéa Gatto Barschak¹, Angela Terezinha de Souza Wyse², Roselia Maria Spanevello¹, Francieli Moro Stefanello^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil

²Laboratório de Neuroproteção e Doença Metabólica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, 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

In the present study we investigated whether oxidative stress is elicited *in vitro* and *in vivo* by methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO) in liver of young rats. The effect of different concentrations of Met (20-2000 μ M), MetO (5-500 μ M), as well as Mixture (Mix) (1000 μ M Met plus 500 μ M MetO), and of acute administration of Met (0.4 g/Kg of body weight) and/or MetO (0.1 g/Kg of body weight) were studied on the following oxidative stress parameters: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl content, total thiol content, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities. *In vitro* studies showed that Met 1000 and 2000 μ M, and Mix significantly increased CAT activity. The activity of SOD was enhanced by Met 1000 and 2000 μ M, MetO 500 μ M and Mix. In contrast, TBARS levels, carbonyl and thiol content were not altered by Met, MetO and association of these compounds. Acute administration showed that Met, MetO and Met plus MetO decreased TBARS at 1 h after injection. Total thiol content decreased at 1 h and increased at 3 h after MetO and Met plus MetO administrations. Carbonyl content was enhanced by Met and reduced by MetO at 1 h. Met, MetO and Met plus MetO decreased CAT activity at 1 h and 3 h after administration. Besides, only MetO increased SOD activity. Our findings indicate that Met and/or MetO alter redox cellular state in liver of young rats.

Key words: Methionine, Methionine Sulfoxide, Oxidative Stress, Liver

INTRODUCTION

Methionine (Met) is an important dietary amino acid for the normal growth and development of mammals, and it is a versatile compound at the junction of several metabolic pathways [1, 2]. On the other hand, there are many reports showing that high levels of Met have been implicated in aminoacidemia, cholestasis, cirrhosis, hypoglycemia, atherogenesis, and/or death [3-6].

Hypermethioninemia 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 can present hepatic alterations as cirrhosis and steatosis, whose underlying mechanisms are not completely established [7,8].

It is known that oxidative stress occurs when there is an imbalance between pro- and antioxidants in favor of the former, which implicates a loss of redox signaling. There is considerable evidence showing that reactive species in elevated concentration may promote oxidative stress and cellular damage [9]. Several *in vivo* and *in vitro* data have recognized oxidative damage as a fundamental factor in a variety of pathophysiological changes observed in different forms of chronic liver injury [10, 11]. In this way, Yalçinkaya and colleagues [12] demonstrated that Met-supplemented diet might augment hepatotoxicity and oxidative damage in liver of ethanol-treated rats. Moreover, hepatic prooxidant/antioxidant status can be modified in rats treated with high Met diet [13, 14]. Additionally, we have previously demonstrated that chronic administration of Met induces oxidative damage and histological alterations in rat liver [15].

Considering that high Met levels and its metabolites, such as MetO, can be present in plasma of hypermethioninemic patients, the purpose of the present study was to investigate the *in vivo* and *in vitro* effects of Met and/or MetO on some parameters of oxidative stress,

namely thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total thiol content (SH), protein carbonyl content, as well as on catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities in liver of rats. We also attempted to verify the synergistic effect between Met and MetO.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and reagents

Wistar rats with 29-day-old 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 Ethics Committee and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil. The chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

***In vitro* studies**

For the *in vitro* studies, untreated 29-day-old rats were used. Met was added to the assay at different concentrations (in the range of 20 to 2000 μM), MetO at concentrations of 5 to 500 μM and the association of Met 1000 μM plus MetO 500 μM (Mix). Control samples were performed without the addition of metabolites.

Methionine and methionine sulfoxide administration

For acute treatment, 29-day-old Wistar rats received a single subcutaneous injection of Met (0.4 g/Kg of body weight) and/or MetO (0.1 g/Kg of body weight), and control rats received an equivalent volume of saline. The animals were killed 1 h or 3 h after injection by decapitation without anesthesia. Drugs were dissolved in saline and buffered to pH 7.4.

Tissue and homogenate preparation

Animals were killed by decapitation, the liver 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. For *in vitro* studies, the homogenates were separately incubated at 37°C for 1 h with Met (20 - 2000 µM), MetO (5 - 500 µM) and Mix (1000 µM Met + 500 µM MetO).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS, a measure of lipid peroxidation, was determined according to Esterbauer and Cheeseman [16]. Briefly, homogenates were mixed with trichloroacetic acid 10% and thiobarbituric acid 0.67% and heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS was determined by the absorbance 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 [17], which is based on the reduction of DTNB by thiols, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at

412 nm. Briefly, homogenate 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

Oxidatively modified proteins present an enhancement of carbonyl content [18]. In this study, protein carbonyl was assayed by the method of Reznick and Packer [19], 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 [20]. H_2O_2 disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer as 240 nm for 90 s. One unit of the enzyme is defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity was reported as units per mg protein.

Superoxide dismutase assay (SOD)

SOD activity was measured by the method of Marklund [21]. This method is based on the autoxidation of pyrogallol which is highly dependent on $\text{O}_2^{\bullet-}$. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation and the specific activity was reported as units per mg protein.

Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry et al. [22] 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

Firstly, we determined the *in vitro* effect of Met and/or MetO on some parameters of oxidative stress in rat liver. As can be seen in Table I, TBARS, total thiol group, carbonyl content were not altered by Met, MetO and association between these compounds ($P > 0.05$). Regarding the activities of two important antioxidant enzymes, we could observe that Met 1000 and 2000 μM ($P < 0.01$) and Mix ($P < 0.01$) significantly increased CAT activity when compared to control group (Figure 1). In contrast, no alteration was observed in CAT activity by MetO ($P > 0.05$). Figure 2 shows that SOD activity was enhanced by Met 1000 and 2000 μM ($P < 0.01$), MetO 500 μM ($P < 0.05$) and association between Met 1000 μM and MetO 500 μM ($P < 0.01$).

Next, we investigated the effect of acute exposure of Met and/or MetO on lipoperoxidation and proteins oxidative damage in liver of rats. Figure 3 shows that 1 h after administration Met, MetO and the association between Met and MetO significantly decreased TBARS levels ($P < 0.01$), but did not alter this parameter at 3 h ($P > 0.05$). Sulphydryl content was decreased by MetO and Met plus MetO at 1 h ($P < 0.01$); in contrast, it was significantly

higher at 3 h ($P<0.01$) than in control group. Besides, Met increased carbonyl content ($P<0.01$) and MetO decreased this parameter at 1h ($P<0.01$); however, no change was observed at 3 h after administration ($P>0.05$). As can be shown in Figure 4, the activity of CAT was significantly reduced by Met, MetO and Met plus MetO at 1 h ($P<0.01$) and 3 h ($P<0.01$) after injection of these compounds amino acid. In addition, the activity of SOD was enhanced only at 3 h by MetO administration ($P<0.01$).

DISCUSSION

Hepatic impairments can occur in hypermethioninemia, but the pathophysiologic mechanisms of these alterations are still poorly known. In this way, consumption of excessive Met promotes oxidative/nitrosative injuries in liver, hepatic encephalopathy, altered erythrocyte morphology, and the resultant splenic hemosiderosis in rats [23-26]. Additionally, we have previously demonstrated that chronic hypermethioninemia promotes oxidative stress, histological alterations in liver and changes in serum biochemical parameters [15].

Herein, we initially investigated the effect of exposing liver homogenates to Met and/or MetO, at similar concentrations as to those found in hypermethioninemic patients, on various oxidative stress parameters. Lipid peroxidation was evaluated in liver tissue by TBARS assay, which identify mainly malondialdehyde, a final product of fatty acid peroxidation [27]. Our results showed that Met and/or its metabolite did not alter TBARS levels. In addition, we demonstrated that these compounds did not modify two markers of protein oxidation, sulphhydryl and carbonyl content, in liver of young rats.

With regard to the antioxidant defense system, we observed that high Met concentrations (1000 and 2000 μM) and the association between Met and MetO increased CAT and SOD activities. We also demonstrated that SOD activity was augmented by MetO

500 μ M. It is known that CAT, located in the peroxisomes, has a predominant role in controlling the concentration of hydrogen peroxide and SOD, a group of metal-containing enzymes, is one of the most effective intracellular enzymatic antioxidants, which converts superoxide anion to hydrogen peroxide [28]. Thus, we could speculate that an increased SOD activity decreased superoxide levels and increased hydrogen peroxide levels, leading to a higher CAT activity. Corroborating with our data, Ferreira and colleagues [29] showed that hyperprolinemia significantly increased SOD and CAT activity in rat liver. Furthermore, we cannot rule out that the enzymatic activities were activated by Met and MetO directly.

In quest for a better understanding of the *in vitro* studies, we evaluated the effect of acute administration of Met and/or MetO in liver of young rats. Doses of Met and MetO administered were chosen in order to induce high plasma levels of these compounds similar to those found in hypermethioninemic patients [30, 31]. As described by Stefanello and colleagues [31], the plasmatic concentration of Met is maximal at 15 min after a single injection of this amino acid and it remains relatively high at 3 h later.

Our findings showed that Met and/or MetO administration significantly decreased TBARS levels when measured at 1 h after injection, but not at 3 h. We cannot establish the mechanism by which these compounds reduced TBARS, but it has been shown that Met and other amino acids are subject to free radical-mediated oxidation by metal- catalyzed reactions, mitochondrial respiration, and other processes generating reactive species [2]. Similar data were found in liver of rats chronically exposed to proline [29].

Oxidation of cellular protein-bound sulfhydryl groups from specific cysteine residues are employed to verify protein damage [17, 32]. In the present study, we observed that sulphhydryl content was decreased by MetO and Met plus MetO at 1 h, but it was augmented at 3 h. It is possible that a compensatory effect had occurred to overcome the reduction on thiol total groups elicited 1 h after administration. Beyond sulphhydryl content, carbonyl group

generation is currently used as a marker of protein oxidation. It is formed by a variety of oxidative pathways, as direct oxidation of side chains of some amino acid residues and adduction of reactive aldehydes derived from oxidation of polyunsaturated fatty acids [33]. We demonstrated that Met increased carbonyl content and MetO decreased this parameter at 1h; however, it returned to control values at 3 h after administration. Since liver is resistant to damage by free radical attack, because present high antioxidant defenses [34], it may be reasonable to conceive that the alterations in markers of protein damage detected in present work may be a consequence from tissue adaptation.

Finally, animals exposed to acute administration of Met and/or MetO present a reduction in CAT activity measured 1 and 3 h after injection. In contrast, the activity of SOD was enhanced only at 3 h after MetO administration. The imbalance in enzyme system may lead to accumulation of hydrogen peroxide with subsequent hydroxyl radical generation [28].

In conclusion, in the present study, we demonstrate that high Met and MetO levels modify liver homeostasis by the alteration of redox cellular state. In addition, data show that Met and MetO do not exhibit synergistic effect on oxidative stress. Another important aspect to be focused is the discrepancy in relation to the results obtained *in vivo* and *in vitro*. The lack of uniformity in the profile of oxidative stress parameters may be a reflection of the route of administration, dose and time of exposure, absorption and metabolism of Met and MetO in the organism. Therefore, the mechanisms and biological significance of these *in vitro* and *in vivo* findings need further studies to be fully understood.

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

- [1] Finkelstein J.D. Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. *J. Nutr.* (2006) **136**,1750S-1754S.
- [2] Lee B.C., Gladyshev V.N. The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry. *Free Radic. Biol. Med.* (2011) **50**, 221-227.
- [3] Regina M., Korhonen V.P., Smith T.K., Alakuijala L., Eloranta T.O. Methionine toxicity in the rat in relation to hepatic accumulation of S-adenosylmethionine: prevention by dietary stimulation of the hepatic transsulfuration pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* (1993) **300**, 598-607.
- [4] Moss R.L., Haynes A.L., Pastuszyn A., Glew R.H. Methionine infusion reproduces liver injury of parenteral nutrition cholestasis. *Pediatr. Res.* (1999) **45**, 664-668.
- [5] Halsted C.H., Villanueva J.A., Devlin A.M. Folate deficiency, methionine metabolism, and alcoholic liver disease. *Alcohol* (2002) **27**, 169-172.
- [6] 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. *J. Nutr.* (2004) **134**, 825-830.
- [7] Avila M.A., Berasain C., Torres L., Martín-Duce A., Corrales F.J., Yang H., Prieto J., Lu S.C., Caballería J., Rodés J., Mato J.M. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* (2000) **33**, 907-914.
- [8] 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*, McGraw-Hill, 8th ed., New York. 2001, pp. 2007-2056.
- [9] Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* (2011) **32**,125-130.

- [10] Ha H.L., Shin H.J., Feitelson M.A., Yu D.Y. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* (2010) **16**, 6035-6043.
- [11] Nair J., Srivatanakul P., Haas C., Jedpiyawongse A., Khuhaprema T., Seitz H.K., Bartsch H. High urinary excretion of lipid peroxidation-derived DNA damage in patients with cancer-prone liver diseases. *Mutat. Res.* (2010) **683**, 23-28.
- [12] Yalçinkaya S., Unlüçerçi Y., Uysal M. Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* (2007) **58**, 455-459.
- [13] Toborek M., Kopieczna-Grzebieniak E., Drózd M., Wieczorek M. Increased lipid peroxidation and antioxidant activity in methionine-induced hepatitis in rabbits. *Nutrition* (1996) **12**, 534-537.
- [14] Mori N., Hirayama K. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J. Nutr.* (2000) **130**, 2349-2355.
- [15] 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* (2009) **91**, 961-968.
- [16] Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.* (1990) **186**, 407-421.
- [17] 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. *Neurosci. Lett.* (2001) **302**, 141-145.
- [18] Stadtman E.R., Levine R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* (2003) **25**, 207-218.

- [19] 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*, Birkhäuser Verlag, Basel, Swiss. 1993, pp. 425-437.
- [20] Aebi H. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* (1984) **105**, 121-126.
- [21] Marklund S.L., Pyrogallol Autoxidation, in: Greenwald R.A. (Eds.). *Handbook for oxygen radical research*, CRC Press, Boca Raton, USA. 1985, pp 243-247.
- [22] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951) **193**, 265-275.
- [23] Benevenga N. J., Steele R. D. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Annu. Rev. Nutr.* (1984) **4**, 157-181.
- [24] Yalcinkaya S., Unlucerci Y., Giris M., Olgac V., Dogru-Abbasoglu S., Uysal M. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: protective effect of taurine. *Nutrition* (2009) **25**, 436-444.
- [25] Higashi T. Impaired metabolism of methionine in severe liver diseases. II. Clinical and experimental studies on role of impaired methionine metabolism in pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Gastroenterol. Jpn.* (1982) **17**, 125-134.
- [26] Lynch S.M., Strain J.J. Increased hepatic lipid peroxidation with methionine toxicity in the rat. *Free Radic. Res. Commun.* (1989) **5**, 221-226.
- [27] Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* (1979) **95**, 351-358.
- [28] Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 4th ed., New York, 2007.

- [29] Ferreira A.G., da Cunha A.A., Machado F.R., Pederzolli C.D., Dalazen G.R., de Assis A.M., Lamers M.L., dos Santos M.F., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T. Experimental hyperprolinemia induces mild oxidative stress, metabolic changes, and tissue adaptation in rat liver. *J. Cell. Biochem.* (2012) **113**, 174-183.
- [30] Dever J.T., Elfarra A.A. In Vivo Metabolism of L-Methionine in Mice: Evidence for Stereoselective Formation of Methionine-*d*-Sulfoxide and Quantitation of Other Major Metabolites. *Drug Metab. Dispos.* (2006) **34**, 2036-2043.
- [31] Stefanello F.M., Matté C., Scherer E.B.S., Wannmacher C.M.D., Wajner M., Wyse A.T.S. Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. *J. Neurosci. Methods* (2007) **160**, 1-4.
- [32] Davies M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) **305**, 761-770.
- [33] Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A.. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* (2006) **10**, 389-406.
- [34] Genet S., Kale R.K., Baquer N.Z. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: Effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol. Cell. Biochem.* (2002) **236**, 7-12.

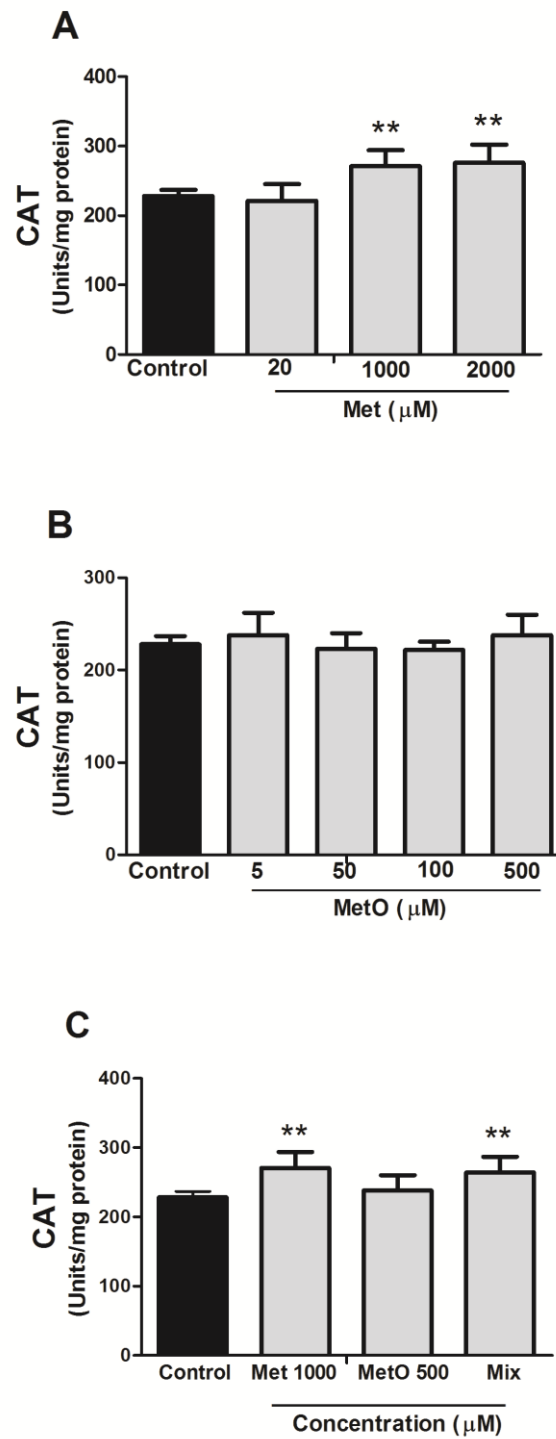


Figure 1. *In vitro* effect of Met and/or MetO on CAT activity in liver of rats. Data are mean $\pm$ S.D. (n=5-6) for independent experiments performed in duplicate. ** $P < 0.01$ compared to control group (Duncan multiple range test).

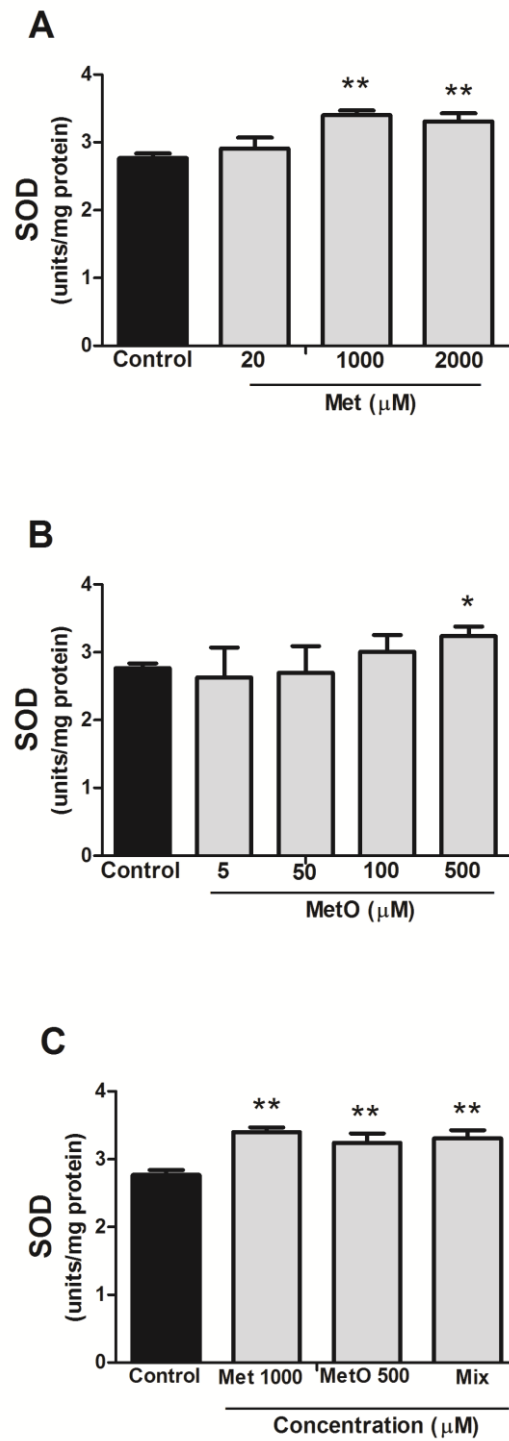


Figure 2. *In vitro* effect of Met and/or MetO on SOD activity in liver of rats. Data are mean $\pm$ S.D. (n=5-6) for independent experiments performed in duplicate. * P <0.05; ** P <0.01, compared to control group (Duncan multiple range test).

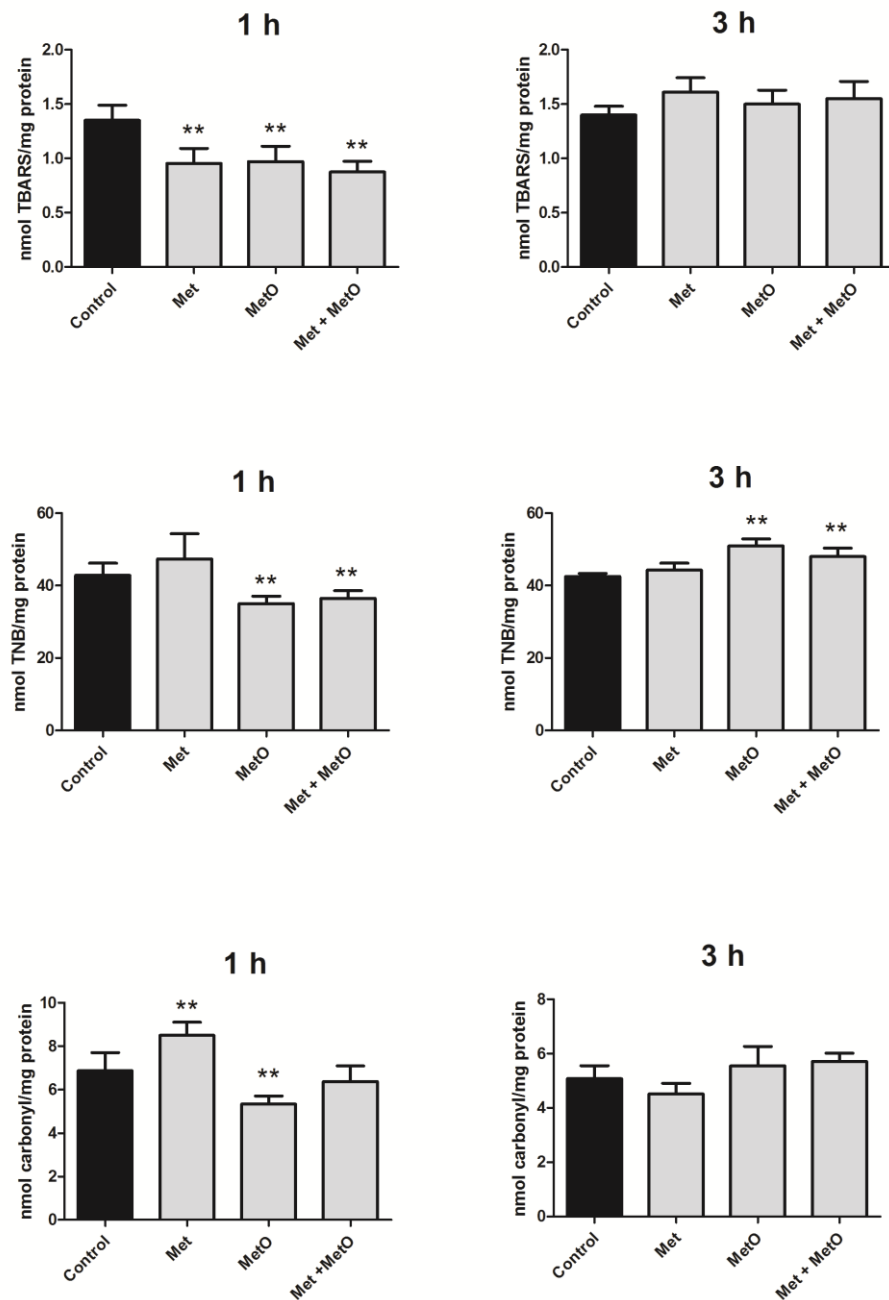


Figure 3. *In vivo* effect of Met and/or MetO on TBARS, sulfhydryl and carbonyl content in rat liver 1 h or 3 h after administration. Data are mean $\pm$ S.D. (n=5-7) for independent experiments (animals) performed in duplicate. The levels of TBARS were reported as nmol malonaldehyde per mg protein, sulfhydryl content as nmol TNB per mg protein, carbonyl content as nmol of carbonyl per mg protein. ** $P < 0.01$ compared to control group (Duncan multiple range test).

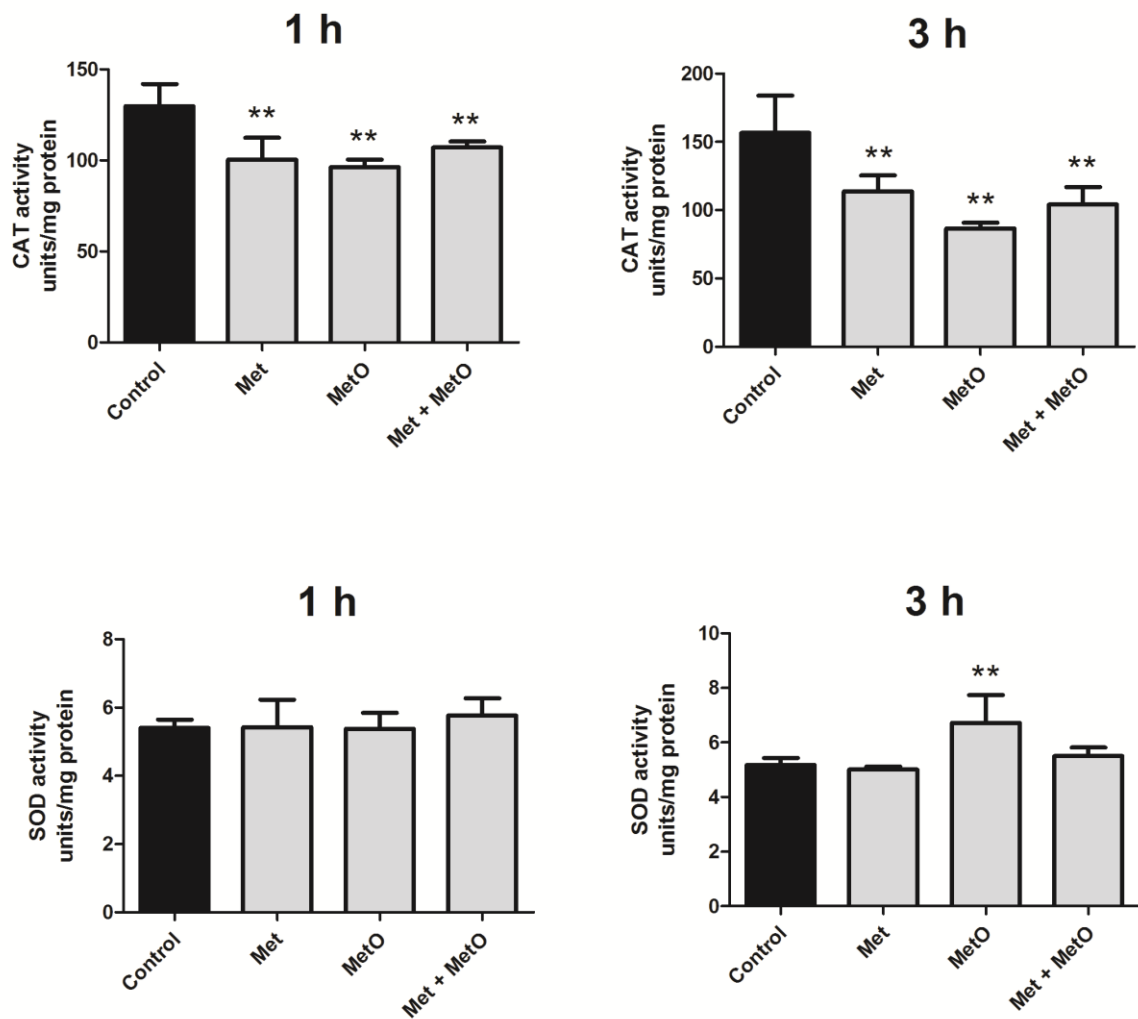


Figure 4. *In vivo* effect of Met and/or MetO on CAT and SOD activities in rat liver 1 h or 3 h after administration. Data are mean $\pm$ S.D. (n=5-7) for independent experiments (animals) performed in duplicate. ** $P < 0.01$ compared to control group (Duncan multiple range test).

Table I. Effect *in vitro* of Met and/or MetO on TBARS levels, total thiol content, protein carbonyl content in liver of young rats

Groups	TBARS	Total thiol content	Carbonyl content
Control	1.40 ± 0.56	27.53 ± 1.35	3.16 ± 0.44
Met 20µM	1.34 ± 0.26	28.38 ± 0.57	3.26 ± 0.22
Met 1000µM	1.45 ± 0.83	30.55 ± 1.18	3.41 ± 0.31
Met 2000µM	1.49 ± 0.19	28.18 ± 0.77	3.32 ± 0.36
Control	1.40 ± 0.56	27.53 ± 1.35	3.16 ± 0.44
MetO 5µM	1.33 ± 0.15	28.50 ± 1.14	3.25 ± 0.65
MetO 50µM	1.34 ± 0.15	27.16 ± 1.74	3.23 ± 0.63
MetO 100µM	1.36 ± 0.07	27.80 ± 1.58	3.27 ± 0.60
MetO 500µM	1.41 ± 0.10	27.30 ± 2.60	3.45 ± 0.79
Control	1.40 ± 0.56	27.53 ± 1.35	3.16 ± 0.44
Met 1000µM	1.45 ± 0.83	30.55 ± 1.18	3.41 ± 0.31
Met 500µM	1.41 ± 0.10	27.30 ± 2.60	3.45 ± 0.79
Mix	1.33 ± 0.07	28.92 ± 4.20	3.13 ± 0.12

Data are expressed as mean ± S.D. (n = 4-5) for independent experiments performed in duplicate. The levels of TBARS were reported as nmol malonaldehyde per mg protein, thiol content as nmol TNB per mg protein and carbonyl content as nmol of carbonyl per mg protein. No significant difference between groups, $P > 0.05$ (Duncan multiple range test). Mix – Met 1000 µM + MetO 500µM.

CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos nessa dissertação, concluímos que:

- A metionina e/ou metionina sulfóxido *in vitro* aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, porém não alteraram parâmetros como a peroxidação lipídica, o conteúdo de carbonilas e de sulfidrilas em fígado de ratos.
- A metionina e/ou metionina sulfóxido diminuíram os níveis de TBARS, o conteúdo tiólico total e a atividade da CAT, bem como alteraram a carbonilação proteica 1 h após as suas administrações. A atividade da SOD não foi modificada pelos compostos.
- A metionina e/ou metionina sulfóxido aumentaram o conteúdo tiólico total e a atividade da SOD, diminuíram a atividade da CAT, porém não modificaram os demais parâmetros avaliados 3 h após as suas administrações.

Em conjunto, demonstramos que elevadas concentrações de metionina e/ou metionina sulfóxido podem modificar a homeostase do fígado por alterar o estado redox celular. Também mostramos que esses aminoácidos não possuem efeito sinérgico sobre os parâmetros de estresse oxidativo avaliados nesse trabalho. Outro ponto importante de ser comentado é a discrepância observada entre os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo*, o que poderia ser atribuído à via de administração, dose, tempo de exposição, bem como ao metabolismo da metionina e metionina sulfóxido no organismo. Portanto, os mecanismos e a importância biológica desses achados precisam ser ainda mais investigados para que sejam totalmente compreendidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYAN, F.; AYTAÇ, E.; SAYGILI, S.; GENÇ, H.; KARACA, Ç.; BAYRAK, I.; UZUN, H.; SALIHOGLU, Z.; ERDAMAR, S.; SÖZER, V.; ALTUG, T.; SEYMEN, P.; SEYMEN, H. O. Effects of lycopene on oxidative stress and remnant liver histology after partial hepatectomy in rats. **Turkish Journal Gastroenterology**, v.22, n.4, p.408-413, 2011.

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.

BUTTERFIELD, D.A.; SULTANA, R. Methionine-35 of A β (1–42): Importance for Oxidative Stress in Alzheimer Disease. **Journal of Amino Acids**, v.2011, p.1-10, 2011.

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.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

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

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.K.; CUNHA, A.A.; MACHADO, F.R.; PEDERZOLLI, C.D.; DALAZEN, G.R.; ASSIS, A.M.; LAMERS, M.L.; SANTOS, M.F.; FILHO, C.S.D.; WYSE, A.T.S. Experimental Hyperprolinemia Induces Mild Oxidative Stress, Metabolic Changes, and Tissue Adaptation in Rat Liver. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.113, p.174-183, 2012.

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.

GARROD, A.E. **Inborn errors of metabolism**. 1. ed. London:Oxford University Press, 1909.

GENET, S.; KALE, R.K.; BAQUER, N.Z. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: Effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.236, p.7-12, 2002.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.393, p.561-564, 2010.

GYAMFI, M. A.; DAMJANOV, I.; FRENCH, S.; WAN, Y.J.Y. The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p.981-995, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 4. ed. New York: Oxford UK, 2007.

KARNEBEEK, C.D.M.; STOCKLER, S. Treatable inborn errors of metabolism causing intellectual disability: A systematic literature review. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.105, p.368–381, 2012.

KIM, J.E.; CLARCK, R. M.; PARK, Y.; LEE, J.; FERNANDEZ, M. L. Lutein decreases oxidative stress and inflammation in liver and eyes of guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. **Nutrition Research and Practice**, v.6, n.2, p.113-119, 2012.

KIM , Y.S.; JHON, D.Y.; LEE, K.Y. Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v.36, p.157-164, 2004.

LEE, B.C.; GLADYSHEV, V.N. The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry. **Free radical biology and medicine**, v.50, p.221-227, 2011.

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.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A.D. **Marks' Basic Medical Biochemistry: A clinical Approach**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.34, p.1-10, 2003.

LUO, S.; LEVINE, R. L. Methionine in proteins defends against oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 23, p.464-472, 2009.

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.

MORI, N.; HIRAYAMA, K. Long-Term Consumption of a Methionine-Supplemented Diet Increases Iron and Lipid Peroxide Levels in Rat Liver. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.2349-2355, 2000.

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**. 8.ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

PIRO, A.; TAGARELLI, A.; TAGARELLI, G.; LAGONIA, P.; QUATTRONE, A. Archibald Edward Garrod: the physician father of biochemistry. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.58, p.427-437, 2009.

ROSA, D.P.; BONA, S.; SIMONETTO, D.; ZETTLER, C.; MARRONI, C.A.; MARRONI, N.P. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.47, n.1, p.72-78, 2010.

SAUNDERS, C.C.; STITES E.W. An electrophoretic mobility shift assay for methionine sulfoxide in proteins. **Analytical Biochemistry**, v.421, p.767-769, 2012.

SHLOMI, T.; CABILI, M.N.; RUPPIN, E. Predicting metabolic biomarkers of human inborn errors of metabolism. **Molecular Systems Biology**, v.5, p.1-8, 2009.

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.

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.

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(3), p.179-184, 2010.

SUN, A.; LAM, C.; WONG, D.A. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism. **Advances in Pediatrics**, v.59, p.209–245, 2012.

TANIKAWA, K.; TORIMURA, T. Studies on oxidative stress in liver disease: important future trends in liver research. **Medicine Molecular Morphological**, v.39, p.22-27, 2006.

THEDA, C. Use of amplitude integrated electroencephalography (aEEG) in patients with inborn errors of metabolism – A new tool for the metabolic geneticist. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.100, p.42-48, 2010.

YALÇINKAYA, S.; UNLUÇERÇİ, Y.; UYSAL, M. Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. **Experimental and Toxicologic Pathologic**, v.58, p.455-459, 2007.

YAMADA, H.; AKAHOSHI, N.; KAMATA, S.; HAGIVA, Y.; HISHIKI, T.; NAGAHATA, Y.; MATSUURA, T.; TAKANO, N.; MORI, M.; ISHIZAKI, Y.; IZUMI, T.; KUMAGAI, Y.; KASAHARA, T.; SUEMATSU, M.; ISHII, I. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine γ -lyase, an animal model of cystathioninuria. **Free Radical Biology and Medicine**, v.52, p.1716–1726, 2012.

YUAN, L.; KAPLOWITZ, N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. **Molecular Aspects of Medicine**, v.30, p. 29-41, 2009.

ZHANG, C.; JIA, P.; JIA, Y.; WEISSBACH, H.; WEBSTER, K. A.; HUANG, X.; LEMANSKI, S. L.; ACHARY, M.; LEMANSKI, L.F. Methionine Sulfoxide Reductase A (MsrA) Protects Cultured Mouse Embryonic Stem Cells From H_2O_2 - Mediated Oxidative Stress. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.111, p.94-103, 2010.

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.

ZOU, W.; ROTH, R. A.; YOUNIS, H. S.; BURGOON, L. D.; GANEY, P. E. Oxidative stress is important in the pathogenesis of liver injury induced by sulindac and lipopolysaccharide cotreatment. **Toxicology**, v.272, p.32-38, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1

Submissão do Artigo Científico (Methionine and/or methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in liver of young rats: *in vitro* and *in vivo* studies) à Revista Fundamental & Clinical Pharmacology.

ScholarOne Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/icp>



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Francieli Stefanello

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Fundamental & Clinical Pharmacology*.

Manuscript ID: FCP-FUND-OA-03-13-0050

Title: Methionine and/or methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in liver of young rats: in vitro and in vivo studies

Authors: Costa, Marcelo
da Silva, Tatiane
Flores, Natália
Schmitz, Felipe
Scherer, Emilene
Barschak, Alethéa
Wyse, Angela
Spanevello, Roselia
Stefanello, Francieli

Date Submitted: 07-Mar-2013

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.11.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.



Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

C837a Costa, Marcelo Zanusso

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 / Marcelo Zanusso Costa; Francieli Moro Stefanello, orientador; Roselia Maria Spanevello, co-orientador. - Pelotas, 2013.

56 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Metionina. 2.Metionina sulfóxido. 3.Estresse oxidativo. 4.Fígado. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Spanevello, Roselia Maria, co-orient. III. Título.

CDD: 574.192