

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**S-ADENOSILMETIONINA INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE
RATOS JOVENS**

Thabata Fernandes Fischer

Porto Alegre – RS, dezembro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**S-ADENOSILMETIONINA INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE
RATOS JOVENS**

Thabata Fernandes Fischer

Dra. Bianca Seminotti
Orientadora

Porto Alegre – RS, dezembro de 2019

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, que nunca mediram esforços para proporcionar-me tudo que tenho hoje, tanto bens materiais como conhecimento. Obtive a oportunidade de estudar em instituições públicas de alto nível com excelente ensino, e sem dúvidas devo isso a eles.

Agradeço aos meus familiares e amigos pela compreensão, por todas as vezes que deixei de participar de alguma confraternização para estudar para uma prova difícil ou uma semana de provas em final de semestre.

O curso de farmácia não é fácil e agradeço as minhas amigas e futuras colegas de profissão Karina, Kiany, Laura O., Lauren, Leticia, Maria Laura, Maria Luísa, Natalia K., Natalia S., Rafaela, Renata N., Renata B. e Tainara, por tornarem meus dias mais leves. Obrigada por todo apoio pré-prova e pós prova, quando as vezes o resultado não foi o esperado. Obrigada pelas comemorações de final de semestre, compartilhando o sentimento de alívio de término de mais um “sofrimento”.

Gostaria de agradecer as amizades que ganhei no CMPA, que desde 2011 entraram na minha vida e não sei viver sem: Bianca, Mariana, Laura Veiga, Tiago e Thais. Obrigada por estarem presentes de alguma forma, sem dúvidas que sem o apoio de vocês não teria sido a mesma coisa.

Não posso deixar de agradecer por todo apoio e parceria das amizades que ganhei do HCPA, Débora, Helouise e Nicole.

Sou muito grata por ter amigos que quilômetros de distância não foram capazes de nos separar. Ana Paula, Bruna, Felipe, Maíra e Mirella, mesmo distantes, vocês sempre foram presentes, obrigada.

Agradeço por me motivarem na vida fitness, Emanuele, Gabriel e Igor. Eu só tenho a agradecer por tudo.

Gostaria de agradecer a todos os professores que tive o prazer de conhecer ao longo desses cinco anos e meio. Obrigada por todo conhecimento ensinado.

E por último e não menos importante gostaria de agradecer ao Laboratório 38 do departamento de bioquímica, por esses quase dois anos juntos, pela oportunidade de trabalhar e conhecer mais sobre a área de erros inatos do metabolismo. Um agradecimento especial para minha orientadora Bianca Seminotti, foi um prazer ter sido sua primeira orientanda.

Obrigada a todos que de alguma maneira contribuíram para a finalização desse ciclo.

Este trabalho foi elaborado segundo as normas da revista "Clinical & Biomedical Research", conforme Anexo II, na qualidade de "Artigo Original"

S-ADENOSILMETIONINA INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATOS

S-ADENOSYLMETHIONINE INDUCES OXIDATIVE STRESS IN LIVER OF RATS

Thabata Fernandes Fischer ¹, Ângela Zanatta ², Rafael Teixeira Ribeiro ², Ana Cristina Roginski ², Moacir Wajner ^{1,2,3}, Bianca Seminotti ²

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Prédio 21111, Porto Alegre, RS CEP 90035-003.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Resumo

Introdução: A deficiência da enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase é um erro inato do metabolismo do ciclo da ureia, e os pacientes apresentam creatina quinase sérica e atividade de transaminases elevadas, hipermetioninemia, bem como altas concentrações sanguíneas de S-adenosilmetionina (AdoMet) e S-adenosilhomocisteína. As manifestações clínicas incluem atraso psicomotor, epilepsia, microcefalia, hipomielinização, miopatia, hepatopatia e defeitos de coagulação. Intervenções alimentares para melhorar a qualidade de vida dos pacientes não são eficazes, indicando a urgência do esclarecimento da fisiopatologia envolvida nesta doença. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* da administração de AdoMet sobre parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens e avaliar os danos causados.

Métodos: Foram utilizados ratos Wistar machos com trinta dias de vida, que foram eutanasiados e o fígado foi isolado e homogeneizado para obtenção do sobrenadante, o qual foi incubado por 1 hora com AdoMet em diferentes concentrações (2-4mM), para posterior avaliação dos parâmetros de homeostase redox.

Resultados: A AdoMet induziu aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína), lipoperoxidação (níveis de malondialdeído, MDA), e oxidação proteica (formação de grupamentos carbonila), além de reduzir os níveis de defesas antioxidantes (níveis de glutathione reduzida, GSH). Além disso, o aumento dos níveis de MDA e a redução dos níveis de GSH pela AdoMet foram atenuados pelo antioxidante melatonina.

Conclusão: O presente estudo demonstrou que a AdoMet, o principal metabólito acumulado na deficiência da S-adenosil-homocisteína hidrolase, induz estresse oxidativo em fígado de ratos jovens, representando um possível mecanismo deletério do dano hepático nessa doença.

Palavras-chave: Deficiência da S-adenosil-homocisteína hidrolase, S-Adenosilmethionina, estresse oxidativo, melatonina, fígado, ratos

Abstract

Introduction: The deficiency of the enzyme S-adenosylhomocysteine hydrolase is an inborn error of metabolism of the urea cycle, and patients present elevated serum creatine kinase and transaminase activity, hypermethioninemia, as well as high blood concentrations of S-Adenosylmethionine (AdoMet) e S-Adenosylhomocystein. Clinical manifestations include psicomotor delay, epilepsy, microcephaly, hipomielization, myopathy, hepatopathy and coagulation defects. Dietary interventions to improve patient outcomes have failed, indicating the urgency of clarifying the pathophysiology involved in this disease. The aim of the present work was to investigate the *in vitro* effects of AdoMet administration on oxidative stress parameters in rat liver and to evaluate the damage caused.

Methods: Thirty-day-old Wistar rats were used, euthanized and the liver was isolated and homogenized to obtain the supernatant. After 1 hour of incubation with AdoMet (2-4mM), the redox homeostasis parameters were evaluated.

Results: AdoMet induced an increase in the production of reactive oxygen species (2',7'-diclorofluorescein oxidation), lipid peroxidation (malondialdehyde levels, MDA) and protein oxidation (formation of carbonyl groups), besides reducing the levels of tissue antioxidant defenses (reduced glutathione levels, GSH). The increase in MDA concentrations and the reduction of GSH levels by AdoMet were attenuated by the use of melatonin.

Conclusion: The present study demonstrates that AdoMet, the major metabolite that accumulates in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency, induces oxidative stress in liver of young rats, representing a possible deleterious mechanism of hepatic damage in this disease.

Keywords: S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency, S-Adenosylmethionine, oxidative stress, melatonin, liver, rats

INTRODUÇÃO

A deficiência da enzima S-adenosil-homocisteína (AdoHcy) hidrolase é um erro inato do metabolismo primeiramente descrito por Gaull e colaboradores ¹. Essa enzima catalisa a hidrólise de AdoHcy em adenosina (Ade) e homocisteína, sendo uma importante rota de eliminação da AdoHcy formada como um produto de metiltransferases dependentes de S-adenosilmetionina (AdoMet). A hidrólise da AdoHcy é fundamental para a regulação do ciclo de transsulfuração-transmetilação, que regula o aporte de metionina (Met) e distribuição de grupos metil. Em pacientes com deficiência da AdoHcy hidrolase ocorre o acúmulo dos metabólitos AdoHcy, AdoMet e Met ²⁻³.

O primeiro paciente diagnosticado com a deficiência da AdoHcy hidrolase apresentou atraso no desenvolvimento psicomotor, atrofia da substância branca e hipomielinização, hipotonia acentuada e disfunção hepática. Desde a caracterização da doença, foram relatados na literatura até o momento 10 pacientes, com manifestações clínicas predominantes de atraso psicomotor e de desenvolvimento, epilepsia, microcefalia, hipomielinização, miopatia, hepatopatia e defeitos de coagulação (deficiência de fator VII) ³⁻⁶.

Estudos anteriores já demonstram que a AdoMet induz estresse oxidativo em tecido cerebral de ratos jovens ²⁻⁷. Apesar da grave disfunção neurológica observada nos pacientes acometidos por essa doença ¹, os mecanismos do dano em outros tecidos não são esclarecidos. Além disso, não existem trabalhos avaliando os efeitos da AdoMet em fígado de ratos, órgão fundamental para a metabolização do metabólito. Por estas razões, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* da AdoMet sobre parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos.

MÉTODOS

Animais e reagentes

Foram utilizados ratos Wistar com trinta dias de vida, obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - Brasil. Os animais foram mantidos em ciclo de claro/escuro 12/12h (07:00 - 19:00h) em salas de colônia com temperatura constante e ar

condicionado ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à água e comida comercial de proteína 20% (p / p) (SUPRA, Porto Alegre, RS, Brasil). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil e seguiu os “Princípios de Cuidado com Animais de Laboratório” (publicação do NIH 85-23, revisada em 1996). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

Os produtos químicos utilizados foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, EUA). A AdoMet, reagentes e tampões necessários foram preparados no dia dos experimentos para cada técnica e o pH ajustado em 7,4. As concentrações finais da AdoMet no meio variaram de 2 a 4 mM. Os controles não continham o metabólito no meio de incubação. Em alguns experimentos, o antioxidante melatonina (MEL) foi adicionado ao meio de incubação na concentração final de 1 mM.

Preparação do sobrenadante de fígado

Os ratos foram eutanasiados por decapitação. O fígado foi removido, isolado e homogeneizado em nove volumes (1:10 p/v) em tampão de fosfato de sódio 20 mM, contendo 140 mM de KCl, pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado à $750 \times g$ por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para descartar núcleos e restos celulares⁸. O precipitado foi descartado e o sobrenadante contendo mitocôndria foi separado e usado para as medidas.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

O TBA-RS foi realizado de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman⁹. Resumidamente, 300 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foram adicionados a 150 μL de sobrenadantes de fígado previamente tratados e centrifugado a 3.000g por 10min. Foram transferidos 300 μL do sobrenadante para um tubo e incubados com 300 μL de 0,67% de TBA em 7,1% de sulfato de sódio em banho maria fervente por 25 min. Os tubos contendo a mistura foram deixados esfriar em água por 5 min. A absorção da coloração rosa adquirida foi lida em um espectrofotômetro a 532 nm. A curva de calibração foi feita usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano, e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que as amostras. Os valores de TBA-RS foram calculados como nmol / mg de proteína.

Conteúdo de grupamentos sulfidrilas

O ensaio foi realizado de acordo com o método Aksenov e Markesbery ¹⁰, a partir da redução do reagente de cor (DTNB) pelos grupos tiol, gerando um composto de coloração amarela (TNB) cuja absorção é medida espectrofotometricamente a 412nm. Os sobrenadantes de fígado (quantidade mg de proteína) foram incubados com DTNB 10 mM por 30 min à temperatura ambiente em uma sala escura. O conteúdo de sulfidrilas foi calculado como nmol TNB por miligrama de proteína.

Conteúdo de grupamentos carbonilas

O conteúdo de grupos carbonilas foi medido de acordo com o método Reznick e Packer ¹¹, iniciando com a adição de 400 µL de 10 mM 2,4-nitrofenilhidrazina (DNPH) dissolvida em HCl 2,5 N ou com HCl 2,5 N (no branco) a 200 µL de sobrenadante de fígado previamente tratado e deixada no escuro por 1 hora. Foram adicionadas às amostras 600 µL de TCA 20% e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 × g. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol:acetato de etila (1: 1, V / V) e resuspendido em 550 µL de guanidina 6 M preparada em HCl 2,5 N a 37 ° C por 5 min. A diferença de absorbância entre as amostras tratadas com DNPH e tratadas com HCl (branco) foram usadas para o cálculo, determinado a 365 nm. Os resultados foram calculados como nmol de grupos carbonila / mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de 22.000 x 10⁶ nmol / mL para hidrazonas alifáticas.

Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)

As concentrações de GSH foram medidas de acordo com Browne e Armstrong ¹². O sobrenadante de fígado previamente tratado foi diluído em 20 volumes de (1:20, V/V) tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA. 100 µL desta preparação foram incubados com um volume igual de o-ftaldialdeído (1 mg / mL de metanol) à temperatura ambiente durante 15 minutos. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 nm e 420 nm, respectivamente. A curva de calibração foi preparada com GSH padrão (0,001- 1 mM) e os resultados expressos em nmol / mg de proteína.

Oxidação de diclorofluoresceína

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada de acordo com Lebel e colaboradores¹³, usando diacetato de 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF-DA). DCF-DA (5 µM) foi preparado em 20 mM de sódio tampão fosfato, pH 7,4, contendo KCl 140 mM e incubado com sobrenadante de fígado por 60 min a 37 ° C. DCF-DA é hidrolisado enzimaticamente por esterases intracelulares para formar DCFH não fluorescente, que é oxidado na presença de ERO, formando o composto fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 e 535 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi preparada com DCF (0,25 a 10 mM). Os resultados foram expressos em pmol DCF / mg de proteína.

Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Lowry et al.¹⁴, usando albumina bovina como padrão.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Os ensaios foram feitos em duplicata ou triplicata, e a média usada para análise estatística. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Diferenças entre os grupos foram consideradas quando $P < 0,05$. As análises foram feitas usando o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0.

RESULTADOS

AdoMet provocou dano oxidativo lipídico e proteico em fígado de ratos

Inicialmente, observamos que a AdoMet aumentou acentuadamente os níveis de MDA no homogeneizado de fígado de ratos com 30 dias de vida, nas concentrações de 2 mM e 4 mM (Figura 1). Esse aumento indica que a AdoMet causa dano oxidativo lipídico, visto que o MDA é um produto final da reação de peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membrana.

A AdoMet também aumentou significativamente a formação de carbonilas (Figura 2 A), mas não alterou a formação de sulfidrilas (Figura 2 B). O grupamento

carbonila é um marcador da oxidação proteica, principalmente na presença de radicais livres. Dessa forma, nossos resultados indicam que a AdoMet causou seletivamente dano oxidativo às proteínas em fígado.

AdoMet diminui as defesas antioxidantes em fígado de ratos

Em seguida, observamos que a AdoMet diminuiu significativamente as concentrações de GSH (Figura 3), o principal antioxidante não enzimático, implicando em um comprometimento das defesas antioxidantes pela presença desse metabólito.

AdoMet induz produção de espécies reativas de oxigênio em fígado de ratos

Também investigamos se a AdoMet poderia induzir a geração de espécies reativas, que poderia explicar o dano oxidativo às proteínas e lipídios, bem como à redução das defesas antioxidantes. Assim, avaliamos a produção de EROs, determinada pela oxidação de DCFH. Corroborando com os resultados anteriores, a AdoMet aumentou significativamente a oxidação do DCFH, indicando que ocorreu a formação de EROs (Figura 4).

MEL preveniu a lipoperoxidação e diminuição de GSH induzidas por AdoMet em fígado de ratos

Visto que a AdoMet induziu a formação de EROs, nós testamos se o antioxidante melatonina (MEL) poderia inibir a peroxidação lipídica e a diminuição dos níveis de GSH causadas pelo metabólito. Observamos que a MEL preveniu parcialmente o aumento de MDA induzido por AdoMet (Figura 5 A), bem como a diminuição de GSH (Figura 5 B), indicando que existe o envolvimento de EROs nos efeitos observados na presença do metabólito.

DISCUSSÃO

Embora os pacientes afetados pela deficiência de S-adenosil-homocisteína hidrolase apresentem predominantemente disfunção neurológica, epilepsia e atrofia cortical ¹, os mecanismos subjacentes envolvidos na fisiopatologia desta doença ainda não foram estabelecidos, e os danos em outros tecidos como o fígado não são conhecidos.

Portanto, no presente estudo, utilizamos sobrenadantes de homogeneizado de fígado de ratos para a determinação de parâmetros da homeostase redox, testamos a hipótese de que o dano nas células hepáticas desses pacientes poderia ser atribuído à toxicidade dos metabólitos acumulados, mais particularmente da AdoMet. Os sobrenadantes de tecidos utilizados no estudo contêm toda estrutura celular ⁸, incluindo mitocôndrias e enzimas necessárias para a produção de radicais livres.

A melatonina (MEL) apresenta propriedades antioxidantes, e diversos estudos têm investigado o papel desse antioxidante em trabalho envolvendo espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) ^{2,7}. Já foi observada a potente ação desse neurohormônio como sequestrador de radical hidroxil, radical ânion superóxido, radical monóxido de nitrogênio, oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. O nitrogênio na estrutura dessa molécula é um elemento importante e necessário para interagir com espécies reativas formando um composto sequestrador e excretado na urina ^{15,16}. Visto isso, a MEL foi utilizada em alguns experimentos a fim de verificar sua capacidade de prevenção aos possíveis danos causados.

Em relação a produção de MDA (malonildialdeído), um produto final da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membrana ¹⁷, observou-se que o AdoMet induziu um aumento significativo, demonstrando possível deterioração da membrana celular. Acredita-se que o acúmulo dos produtos formados na lipoperoxidação aumenta a rigidez e diminui a eficiência funcional da membrana causando o envelhecimento gradual das células ^{18,19}. Além disso, o dano oxidativo lipídico induzido pelo AdoMet diminuiu na presença de MEL, sugerindo que a AdoMet induz ataque oxidativo aos lipídios da membrana.

As defesas antioxidantes foram comprometidas pela AdoMet como foi verificado pela diminuição das concentrações de GSH, que é considerado um indicador da capacidade antioxidante não enzimática de um tecido, impedindo danos associados aos processos de radicais livres ¹⁷. Quando a MEL foi incubada com a AdoMet, observamos uma redução menos acentuada nas concentrações de GSH, demonstrando que esse antioxidante apresentou efeitos benéficos contra a toxicidade *in vitro* da AdoMet.

Para verificar o dano proteico, foi realizada a dosagem do conteúdo de carbonilas e sulfidrilas. A AdoMet induziu um aumento na formação de conteúdo de

carbonilas e não apresentou alteração significativa no conteúdo de sulfidrilas. Esses dados sugerem dano as proteínas, devido ao aumento de grupamentos carbonilas nas cadeias laterais das proteínas, sendo considerado um marcador de oxidação proteica mediada por radicais livres ²⁰.

Em relação a avaliação de EROs, nossos dados demonstram que a AdoMet aumentou a oxidação de DCFH, que é convertida em DCF por radicais livres. Todos os componentes celulares são susceptíveis às EROs, que quando produzidos em altas concentrações ou quando as defesas antioxidantes estão deficientes, podem causar dano a biomoléculas. O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é descrito como estresse oxidativo, e pode representar um mecanismo fundamental envolvido em doenças humanas ¹⁷.

O aumento na produção de EROs pode levar a modificações em aminoácidos, resultando em mudanças conformacionais em proteínas, que como consequência pode levar a alterações de atividades enzimáticas, quebra de ligações peptídicas, bem como modificações em glicoproteínas ²¹.

Os resultados obtidos indicam fortemente que o AdoMet provoca estresse oxidativo em fígado de ratos, sendo essa condição pró-oxidante resultado de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes totais e os produtos de espécies reativas geradas em um tecido. A utilização do antioxidante MEL apresentou efeitos benéficos, e a administração desse composto poderia ser considerada como uma terapia adjuvante para os pacientes afetados.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a AdoMet provoca um desequilíbrio na homeostase redox em fígado de ratos. Caso os presentes achados *in vitro* sejam confirmados *in vivo* em experimentos com animais e em células de pacientes afetados pela deficiência de AdoHcy hidrolase, é possível que a perturbação do status redox das células possa contribuir, pelo menos em parte, à fisiopatologia em pacientes afetados por esse distúrbio.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Gaull GE, Von Berg W, Raiha NC, Sturman JA. Development of methyltransferase activities of human fetal tissues. *Pediatr Res.* 1973; 7:527–533.
2. Zanatta A, Cecatto C, Ribeiro RT, Amaral AU, Wyse AT, Leipnitz G, et al. S-Adenosylmethionine promotes oxidative stress and decreases Na(+), K(+)-ATPase activity in cerebral cortex supernatants of adolescent rats: implications for the pathogenesis of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Neurobiol.* 2017; 55:5868–5878.
3. Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Nat Acad Sci.* 2004; 101:4234-4239.
4. Baric I, Cuk M, Fumic K, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, et al. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28:885–902.
5. Baric I, Staufner C, Augoustides-Savvopoulou P, Chien YH, Dobbelaere D, Grunert SC, et al. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2017; 40:5–20.
6. Grubbs R, Vugrek O, Deisch J, Wagner C, Stabler S, Allen R, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33:705–713.
7. Seminotti B, Zanatta A, Ribeiro RT, Rosa MS, Wyse AT, Leipnitz G, et al. Disruption of Brain Redox Homeostasis, Microglia Activation and Neuronal Damage Induced by Intracerebroventricular Administration of S-Adenosylmethionine to Developing Rats. *Mol Neurobiol.* 2019; 56:2760–2773.

8. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 388:261-266.
9. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11:81-128.
10. Aksenov MY, Markesbery WR. 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.
11. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233:357-363.
12. Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol.* 1998; 108:347-352.
13. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5:227-231
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
15. Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Aging Develop.* 2002; 123:1007-1019.
16. Galano A, Reiter RJ. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: from individual actions to collective protection. *J. Pineal Res.* 2018; 65:e12514.

17. Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press Inc, Oxford. 2015; 199–283
18. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol.* 1998; 56:359–384.
19. Kehrer JP. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993; 23:21-48.
20. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994: 233:346-357.
21. Sies H. Strategies of antioxidant defense. 1993; *Eur J Biochem.* 1993; 215:213-219.

LEGENDAS

Figura 1. Efeito da S-adenosilmetionina (AdoMet) nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em fígado de ratos com 30 dias de vida. O sobrenadante do homogeneizado de fígado foi incubado por 1 h na presença de AdoMet (2mM e 4 mM). Os valores são média \pm desvio padrão e foram expressos em nmol / mg de proteína. ** P <0,01, *** P <0,001, comparado ao controle (Teste das amplitudes múltiplas de Duncan).

Figura 2. Efeito da S-adenosilmetionina (AdoMet) na formação de carbonilas (A) e no conteúdo de sulfidrilas (B) em fígado de ratos com 30 dias de vida. O sobrenadante do homogeneizado de fígado foi incubado por 1 h na presença de AdoMet (2mM e 4 mM). Os valores são média \pm desvio padrão e foram expressos em nmol / mg de proteína. ** P <0,01, *** P <0,001, comparado ao controle (Teste das amplitudes múltiplas de Duncan).

Figura 3. Efeito da S-adenosilmetionina (AdoMet) nas concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em fígado de ratos com 30 dias de vida. O sobrenadante do homogeneizado de fígado foi incubado por 1 h na presença de AdoMet (2mM e 4 mM). Os valores são média \pm desvio padrão e foram expressos em nmol / mg de proteína. * P <0,05, ** P <0,01, comparado ao controle (Teste das amplitudes múltiplas de Duncan).

Figura 4. Efeito da S-adenosilmetionina (AdoMet) na oxidação de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH) em fígado de ratos de 30 dias de vida. O sobrenadante do homogeneizado de fígado foi incubado por 1 h na presença de AdoMet (2mM e 4 mM). Os valores são média \pm desvio padrão e foram expressos em nmol / mg de proteína. ** P <0,01, *** P <0,001, comparado ao controle (Teste das amplitudes múltiplas de Duncan).

Figura 5. Efeito do antioxidante melatonina (Mel) sobre o aumento de TBA-RS (A) e a diminuição das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) (B) induzido por S-adenosilmetionina (AdoMet) em fígado de ratos com 30 dias de vida. O sobrenadante do homogeneizado de fígado foi incubado por 1 h na presença de

AdoMet (4 mM) e Mel (1 mM). Os valores são média \pm desvio padrão e foram expressos em nmol / mg de proteína. *** P <0,001, comparado ao grupo controle; # P <0,05, ## P <0,01, comparado ao grupo AdoMet (Teste das amplitudes múltiplas de Duncan).

ANEXO I – FIGURAS

FIGURA 1

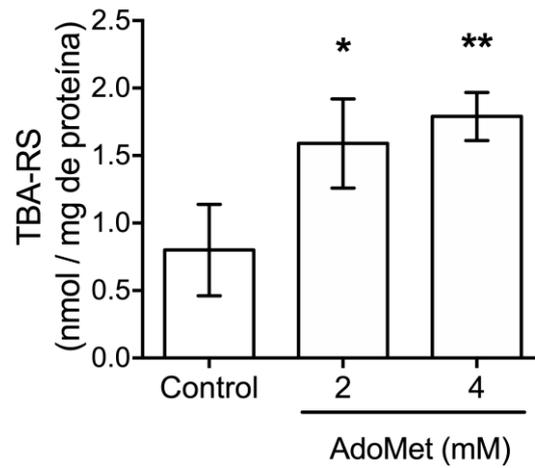


FIGURA 2

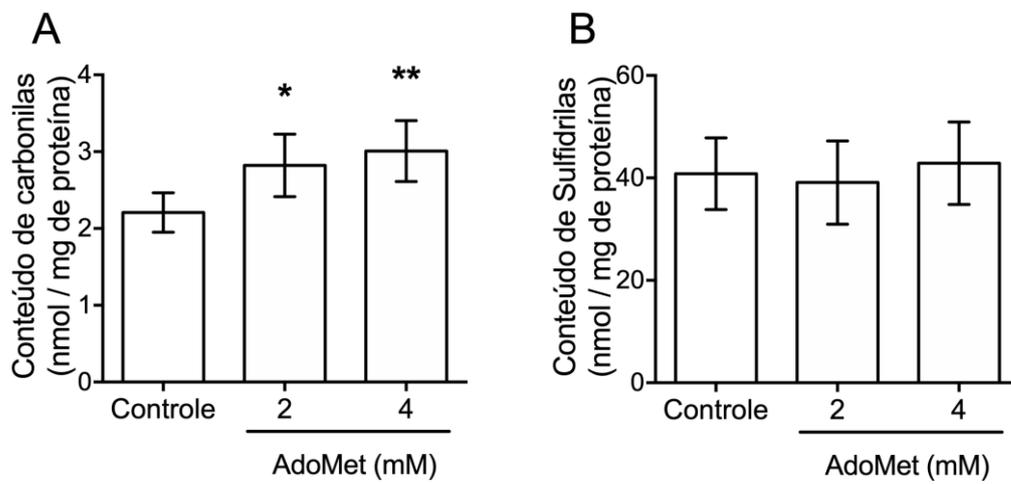


FIGURA 3

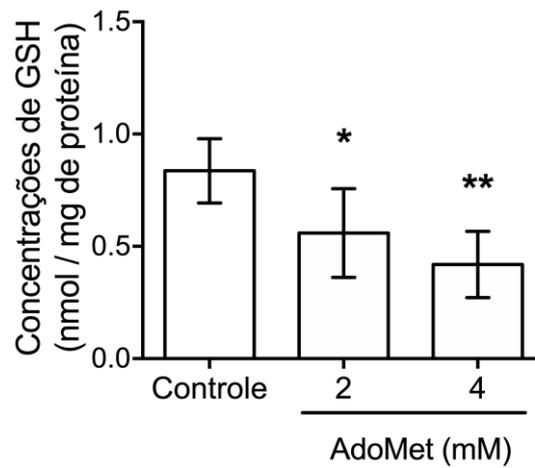


FIGURA 4

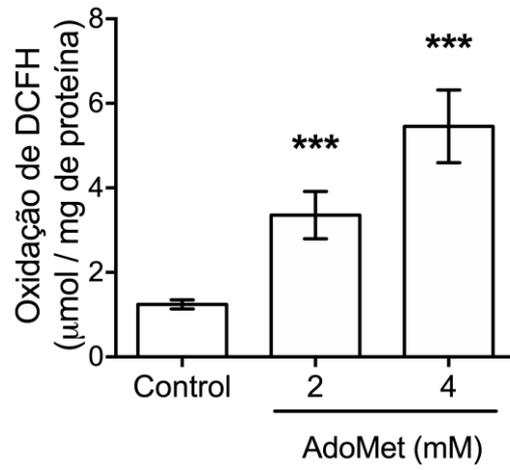
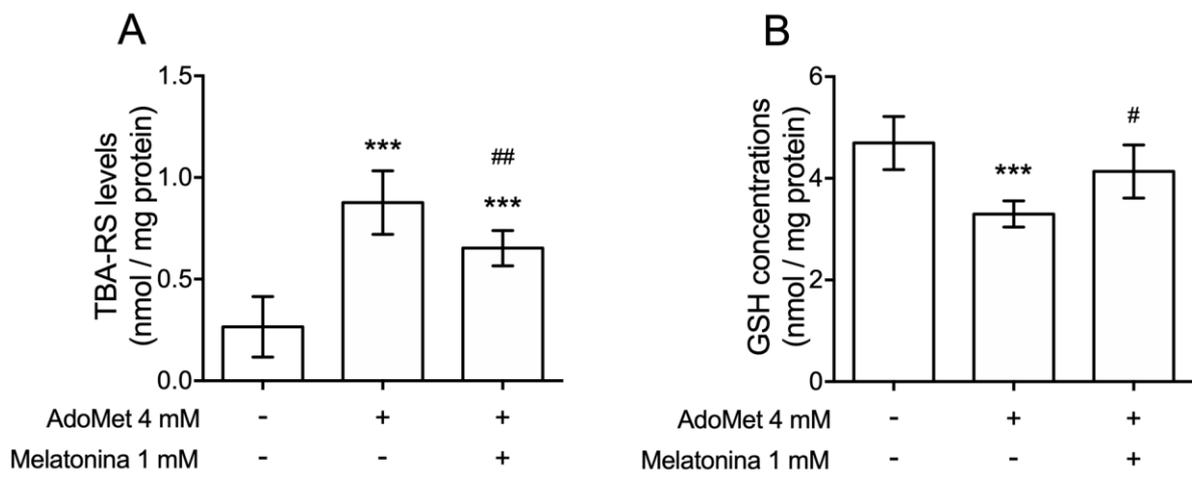


FIGURA 5



ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO
Periódico “Clinical & Biomedical Research”

Instructions for authors

AND POLICY

Clinical and Biomedical Research (CBR), formerly “Revista HCPA”, is a scientific publication from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). It is a free access scientific periodic that aims to publish papers from all relevant areas in the Health Sciences, including clinic and basic research. The selection criteria for publication include: originality, relevance of the theme, methodological quality, and adequacy to the journals’ editorial norms.

CBR supports the policies for the registration of clinical trials of the World Health Organization (WHO) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [<http://www.icmje.org/>]. Therefore, CBR will only accept clinical research articles that have received an identification number from the Brazilian Clinical Trials Registry (Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC) [<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>] or other official database dedicated to the registry of clinical trials.

All published articles are reviewed by peers in a double-blind fashion. Once the article is accepted for publication, its copyrights are automatically transferred to the journal. The content of manuscripts submitted for publication to CBR implies that it has not been published previously and that it has not been submitted to another journal. To be published elsewhere, even in part, articles published in CBR require written approval of the editors. The concepts and declarations contained in the papers are the authors’ full responsibility. The articles may be written in Portuguese, English, or Spanish. The submissions in English are strongly encouraged by the editors.

The manuscript should fit into one of the different categories of articles published by the journal, as follows:

FORM AND PREPARATION OF ARTICLES

The following categories of contributions will be considered for publication

Editorial

Critical and thorough review, prepared at the invitation of the editors, and submitted by an author with renowned knowledge on the subject. Editorials can have up to 1,000 words. This section may include the Journal’s editorial of presentation, signed by the editor, besides special editorials that comprise requested collaborations about current themes or about articles published on the Journal.

Review Articles

Articles that aim to synthesize and critically evaluate the present knowledge on a particular theme. They should contain no more than 6,000 words. These articles should present an unstructured abstract, with no more than 200 words (except for systematic reviews – see abstract structure in ‘Original Articles’) and a comprehensive list, but preferably with no more than 80 references.

Tables should be included in the same manuscript file (after references) and the figures should be submitted as additional documents in individual files.

Special Articles

Manuscripts exclusively requested by the editors, on a subject of scientific relevance, to authors with recognized expertise in the area, and that do not meet the criteria for Editorials.

Original Articles

Articles with unpublished research results, including full-length studies that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. Its formal structure should present the following topics: Introduction, Methods, Results and Discussion. The conclusions should be in the last paragraph of the Discussion, not requiring a specific section. Clinical implications and limitations of the study should be mentioned. For original articles, a structured abstract should be presented (Introduction, Methods, Results, and Conclusions) in Portuguese and English, in cases where the article is not written entirely in English. The Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 250 words.

Articles submitted in this category should not exceed 3,000 words. Tables should be included together in the same manuscript file (after references) and figures should be submitted as an additional document in individual files.

Case Reports

Articles based on peculiar cases and brief comments on the importance of the case in relation to the existing knowledge in the field. They should contain up to 1,000 words, with a total of no more than two tables or figures and 15 references, once presenting a literature review is not the purpose of the reports.

Their structure should present the following topics: Introduction, explaining the relevance of the case; Presentation of the case (Case Report), and Discussion. Case reports should describe novel or unusual findings, or offer new insights into a given problem. The content should be limited to facts relevant to the case. The confidentiality regarding patient identification is critical, so authors should not report any precise dates, initials, or any other information irrelevant to the case, but that may possibly identify the patient.

Case reports should have an unstructured abstract with no more than 150 words. Tables should be included in the same manuscript file (after references) and figures should be sent as additional documents in individual files.

Case Reports: Images in Medicine

Section devoted to the publication of informative images, which are unusual and/or of broad interest in clinical situations. It should contain no more than 500 words and a total of 5 references. Two to three images (at a resolution of at least 300 dpi).

Letters

Opinions and comments on an article published in the Journal, on subjects of scientific relevance, and/or preliminary clinical observations. The text should be concise, with no more than 500 words. Only one table and one figure are allowed, and a maximum of five references. They should not have an abstract.

Brief Communication

Brief Communications are original but preliminary or more specific research results that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. The structure is similar to original articles; however, the Abstracts (Portuguese, Spanish or English) should not exceed 150 words and the text should not exceed 1,200 words. A maximum of two Tables/Figures are accepted.

Supplements

In addition to regular issues, CBR publishes the supplement of the HCPA Science Week.

CONFLICTS OF INTEREST

Conflicts of interest arise when the author has financial or personal relationships that could inappropriately influence their professional judgment. These relationships may create favorable or unfavorable tendencies towards a paper and impair the objectivity of the analysis. Authors must disclose possible conflicts of interest and should be done at the time of submission of the manuscript.

It is at the editor's discretion to decide whether this information should be published or not and whether to use it for editorial decisions. A common form of conflict of interest is the funding of research by third parties who may be companies, government agencies, or others. This obligation to the funding entity may lead the researcher to obtain tendentious results, inappropriately influencing (bias) their work. Authors should describe the interference of the funding entity at any stage of the research, as well as the form of funding, and the type of relationship established between the sponsor and the author. The authors may choose to inform the peer reviewers' names for which their article should not be sent, justifying themselves.

PRIVACY AND CONFIDENTIALITY

Information and pictures of patients that allow their identification should only be published with formal written authorization of the patient, and only when necessary for the purpose of the study. For formal authorization, the patient must know the content of the article and be aware that this article may be made available on the Internet. If in doubt about the possibility of identifying a patient, such as in the case of photos with stripes over the eyes, a formal authorization should be obtained. In the case of distortion of data to prevent identification, authors and editors should ensure that such distortions do not compromise the results of the study.

EXPERIENCES WITH HUMANS AND ANIMALS

All content related to research with humans and animals must have previous approval by the Research Ethics Committee or the Animal Ethics Committee, respectively. The works should be in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki (current or updated), the CNS Resolution n. 466/2012 and its complementary regulations, as well as the Law n. 11.794/2008 for studies in animals. It is important to indicate the number of the project's registration in the respective Committee or Ethics Committee, as well as in the National Committee for Research Ethics, if applicable.

PREPARATION OF THE ARTICLE

The registration on the system as author and subsequent access with login and password are mandatory to submit and verify the status of submissions.

Identification: must include: a) Title of the article, clear and concise. Do not use abbreviations. There should be a version of the reduced title to appear in the header as well as a title in the English language; b) Authors' full names; c) Institution and the sector or unit of the institution to which each author is affiliated (personal titles and positions held should not be mentioned); d) Indication of the corresponding author, accompanied by the electronic address; e) If it has been presented at a scientific meeting, the name of the event, the place, and the date of completion should be indicated.

THE NAMES OF ALL THE AUTHORS OF THE MANUSCRIPT SHOULD BE INDICATED IN THE SYSTEM

Abstract and Keywords: The articles should have an abstract in English. Check the structure and the number of words described for each specific type of article (see above). The structured abstracts, required only for original articles, should present the name of the subdivisions that make up the formal structure of the article at the beginning of each paragraph (Introduction, Methods, Results and Conclusions). The keywords - expressions that represent the subject of the paper - should be in number from 3 to 10, provided by the author, based on the DeCS (Health Sciences Descriptors) published by Bireme, which is a translation from the MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine, available in the following electronic address: <http://decs.bvs.br>.

Manuscript: it must conform to the structure required for each category of article. Text citations and references cited in the legends of tables and figures should be numbered consecutively in the order they appear in the text, with Arabic numerals. References should be cited in the text as in the example: Reference1.

Tables: they should be numbered consecutively, with Arabic numerals, in the order they were cited in the text, and headed by a suitable title. They should be cited in the text, but duplicated information should be avoided. The tables, with titles and footnotes, should be self-explanatory. The abbreviations should be specified as footnotes without numerical indication. The remaining footnotes should be numbered in Arabic numerals and written in superscript.

Figures and charts: Illustrations (photographs, charts, drawings, etc.) should be sent in separate articles, in JPG format (at a high resolution – at least, 300 dpi). They should be numbered consecutively with Arabic numerals, in the other they are cited in the text and should be clear enough for reproduction and in the same language as the text. Photocopies will not be accepted. If there are figures extracted from other previously published studies, the authors should provide a written permission for their reproduction. This authorization shall accompany the manuscripts submitted for publication. The figures must have a title and subtitle (if necessary), which should both must precede the figure itself.

Abbreviations: abbreviations must be explained at first mention. On the rest of the article, it is not necessary to repeat the full name.

Name of medications: the generic name should be used.

In case of citing appliances/equipment: all appliances/equipment cited should include model, manufacturer's name, state, and country of manufacture.

Acknowledgements: should include the collaboration of people, groups, or institutions that have contributed to the study, but whose contributions do not justify their inclusion as authors; this item should also include the acknowledgements for financial support, technical assistance, etc. This item should come before the references.

Conflicts of interest: If there is any conflict of interest (see above), it should be declared. In case there is not, place in this section: "The authors declare no conflicts of interest"

References: should be numbered consecutively, in the other in which they are mentioned in the text, and identified with Arabic numerals. The presentation must be based on a format called "Vancouver Style", as the examples below, and the titles of journals should be abbreviated according to the style presented by the List of Journal Indexed in Index Medicus, from the National Library of Medicine, available at: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. The authors should ensure that the cited references in the text appear in the reference list with exact dates and authors' names correctly spelt. The accuracy of references is the authors' responsibility. Personal communications, unpublished or unfinished articles could be cited when absolutely necessary, but should not be included in the reference list and only cited in the text. The submission of the unpublished works mentioned in the manuscript may be requested at the discretion of the editors.

Examples of citing references:

Journal articles (from one to six authors)

Almeida OP. Autorialia de artigos científicos: o que fazem os tais autores? Rev Bras Psiquiatr. 1998;20:113-6.

Journal articles (more than six authors)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. *N Engl J Med*. 1986;315:157-61.

Articles without the author's name

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J*. 1994;84:15.

Books

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Chapters from a book

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Books in which editors (organizers) are authors

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Theses

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Papers presented at conferences

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Electronic Journal Articles

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from: [URL:http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm).

Other types of reference should follow the document

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts

Submitted to Biomedical Journals: Sample References

(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Technical requirements

Microsoft Word document (.doc or .rtf), singled space, font size 12, 2-cm margins in each side, title page, abstract and descriptors, text, acknowledgements, references, tables and legends, and the figures should be sent in jpg or tiff at a resolution of at least 300 dpi.