

Universidade Federal de Pelotas
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Efeito da administração aguda e crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido
na atividade de enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico e sobre
parâmetros inflamatórios em linfócitos e soro de ratos jovens**

Mayara Sandrielly Pereira Soares

Pelotas, 2016

Mayara Sandrielly Pereira Soares

Efeito da administração aguda e crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido na atividade de enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico e sobre parâmetros inflamatórios em linfócitos e soro de ratos jovens

Dissertação 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. Dra. Roselia Maria Spanevello
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S676e Soares, Mayara Sandrielly Pereira

Efeito da administração aguda e crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido na atividade de enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico e sobre parâmetros inflamatórios em linfócitos e soro de ratos jovens / Mayara Sandrielly Pereira Soares ; Roselia Maria Spanevello, orientadora ; Francieli Moro Stefanello, coorientadora. — Pelotas, 2016.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. NTPDase. 2. Metionina. 3. Metionina sulfóxido. 4. Hipermetioninemia. 5. Colinesterases. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Stefanello, Francieli Moro, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

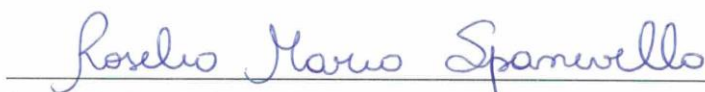
Mayara Sandrielly Pereira Soares

**Efeito da administração aguda e crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido
na atividade de enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico e sobre
parâmetros inflamatórios em linfócitos e soro de ratos jovens**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24 de fevereiro de 2016

Banca examinadora:



Prof^a Dr^a Roselia Maria Spanevello (Orientadora) Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof^a. Dr^a. Rachel Krolow Santos Silva Bast – Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof. Dr. Giana de Paula Cognato. Doutora em Ciências Biológicas - Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico

Dedico este trabalho aos meus tios Noel e Luciene por terem me concedido a oportunidade de chegar até aqui, e ao meu namorado Gabriel pelo apoio incondicional de sempre.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e determinação para chegar até aqui.

Aos meus tios Noel e Luciene os quais sempre me apoiaram, incentivaram e concederam a oportunidade para chegar até aqui, por vocês tenho muita admiração, carinho e gratidão, muito obrigada!

À toda minha família por estar ao meu lado e torcendo em mais uma etapa da minha vida. Amo vocês.

Ao meu namorado Gabriel pelo apoio, carinho e compreensão obrigada por estar sempre comigo, eu te amo. E a Mirian por ser essa mãezona pra mim.

À minha orientadora Rosélia, pela dedicação, incentivo e sabedoria com que conduziu este trabalho, e também por ser essa pessoa maravilhosa, obrigada por ser sempre atenciosa e preocupada e por ter me recebido de braços abertos e com todo o teu carinho e também por ter depositado em mim a confiança para conduzir este trabalho. Tu és incrível!

À querida prof^a Francieli por me co-orientar com todo teu carinho, por estar sempre disponível e pronta para me ajudar, serei eternamente grata por todo aprendizado que me passaste. És um exemplo de profissional e pessoa, obrigada.

Aos professores Paulo e Sandra por terem despertado em mim a vontade em fazer pesquisa e pelos primeiros ensinamentos.

À minha dupla Gabi, com quem aprendi muito, obrigada pela parceria e amizade de sempre e por ter compartilhado esta etapa da minha vida comigo.

Aos amigos e colegas do NEUROCAN, em especial ao Carlus e a Kennia, as ICs Bruna, Anita, Carol e Jéssica que me ajudaram na realização deste trabalho, obrigada pelo companherismo, amizade, apoio, ajuda, ânimo, disposição e bom humor e por terem me recebido com todo carinho e café.

Ao PPGBBio pela oportunidade e a todo corpo docente por todo aprendizado.

Aos professores da banca por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas pela formação acadêmica.

À FAPERGS pela bolsa concedida.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Tereza de Calcutá)

Resumo

SOARES, Mayara Sandrielly Pereira. **Efeito da administração aguda e crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido na atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico e sobre parâmetros inflamatórios em linfócitos e soro de ratos jovens, 2016.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Elevados níveis plasmáticos de metionina (Met) e de seus metabólitos podem ocorrer em várias anormalidades genéticas, como na deficiência da metionina adenosiltransferase levando a muitas desordens fisiológicas. O ATP está envolvido em funções pró-inflamatórias, enquanto a adenosina e a acetilcolina tem efeitos anti-inflamatórios. A ação destas moléculas no local de inflamação é controlada principalmente por enzimas, como Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (NTPDases), a adenosina deaminase (ADA), a acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento agudo e crônico com Met e/ou metionina sulfóxido (MetO) na atividade das ectonucleotidases e colinesterases e nos níveis de proteína-C reativa (PCR) e interleucina 10 (IL-10) em linfócitos e soro de ratos jovens. Os animais foram divididos em quatro grupos: I (controle); II (Met); III (MetO) e IV (Met mais MetO). No protocolo agudo, os animais receberam uma administração subcutânea de Met e/ou MetO e foram submetidos à eutanásia 1 h ou 3 h após o tratamento. No protocolo crônico, Met e/ou MetO foram administradas nos animais duas vezes por dia com um intervalo de 8 h entre as injeções, durante 21 dias. Os resultados mostraram que a hidrólise do ATP foi diminuída em linfócitos após 1 h de tratamento nos animais dos grupos III e IV ($P < 0,05$). Em contrapartida, observou-se um aumento da hidrólise de ATP e ADP em linfócitos nos grupos III e IV e um aumento na atividade da ADA no grupo III após 3 h a administração dos aminoácidos ($P < 0,05$). Não foram observadas alterações na atividade da NTPDase e da ADA em linfócitos e soro no tratamento crônico. A atividade da AChE também foi aumentada em linfócitos após 3 h e 21 dias do tratamento nos animais dos grupos III e IV ($P < 0,05$), enquanto que a atividade de BuChE foi diminuída após 1 h e 21 dias após o tratamento dos mesmos grupos ($P < 0,05$). No tratamento crônico foi observado um aumento nos níveis de PCR no soro dos ratos tratados com MetO ou com a associação de Met mais MetO e uma diminuição nos níveis de IL-10 nos animais tratados com Met e MetO quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). Os resultados demonstraram que os parâmetros inflamatórios foram alterados principalmente no tratamento com MetO. As alterações provocadas no sistema purinérgico e colinérgico e nas citocinas anti-inflamatórias pode contribuir para a compreensão das alterações inflamatórias presentes em pacientes hipermetioninêmicos.

Palavras-chave: NTPDase, metionina, metionina sulfóxido, colinesterases, IL-10, hipermetioninemia

Abstract

SOARES, Mayara Sandrielly Pereira. **Effect of acute and chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide on enzyme activity of the purinergic and cholinergic systems and on inflammatory parameters in the lymphocytes and serum of young rats 2016.** Dissertation (MSc.) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Elevation of plasma methionine (Met) and its metabolites may occur in several genetic abnormalities, such as methionine adenosyltransferase deficiency, causing a broad spectrum of physiological disorders. ATP is involved in proinflammatory functions while adenosine and acetylcholine have anti-inflammatory effects. The action of these molecules at the site of inflammation is controlled mainly by enzymes such as NTPDase, Adenosine Deaminase (ADA), Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BuChE). In the present study we investigated the effect of acute and chronic treatment with Met and/or methionine sulfoxide (MetO) on ectonucleotidase and cholinesterase activity and on the levels of C - reactive protein (CRP) and interleukin 10 (IL-10) in lymphocytes and serum of young rats. The animals were divided into four groups: I (control); II (Met); III (MetO) and IV (Met plus MetO). In the acute protocol, Met and MetO were administered as a single subcutaneous injection and the animals were submitted to euthanasia 1 h or 3 h after treatment. In the chronic protocol Met and/or MetO were administered to animals twice a day with an interval of 8h between injections, during 21 days. The results showed that ATP hydrolysis was decreased in lymphocytes 1 h after the treatment of the animals of groups III and IV ($P<0.05$). Conversely, an increase in ATP and ADP hydrolysis in lymphocytes was observed in groups III and IV, and an increase in ADA activity in group III 3 h after the amino acids administration ($P<0.05$). No alterations in the NTPDase and ADA activities were observed in lymphocytes and serum in chronic treatment. AChE activity also was increased in lymphocytes 3 h and 21 days after treatment in the animals of groups III and IV ($P<0.05$) while BuChE activity was decreased 1 h and 21 days after treatment in the same groups ($P<0.05$). In chronic treatment, an increase in the levels of CRP was observed in the serum of rats treated with MetO or an association of Met plus MetO and a decrease in the IL-10 levels in animals treated with Met, MetO and Met plus MetO when compared to the control group ($P<0.05$). Our results demonstrated that inflammatory parameters are altered mainly in MetO treatment. The changes caused in the purinergic and cholinergic system and in, anti-inflammatory cytokines may contribute to understanding the inflammatory alterations observed in hypermethioninemic patients.

Key words: lymphocytes, NTPDase, methionine, methionine sulfoxide, cholinesterases, IL-10, hypermethioninemia

Lista de Figuras

Figura 1	Metabolismo da Metionina	19
Figura 2	Oxidação da Metionina a Metionina Sulfóxido	20
Figura 3	Imunidade Inata e Imunidade Adquirida.....	25
Figura 4	Componentes da Sinalização Purinérgica.....	27
Figura 5	Componentes do Sistema Colinérgico	32

Lista de Abreviaturas

A_{2A} – Receptores de adenosina
A_{2B} – Receptores de adenosina
A₃ – Receptores de adenosina
ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ADA – Adenosina deaminase
Ado – Adenosina
AdoHcy – S-adenosil-homocisteína
ADP – Difosfato de adenosina
AHCY – Deficiência de S-adenosil-homocisteína hidrolase
AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP – Monofosfato de adenosina
APP – Proteína precursora amiloide
ATP – Trifosfato de adenosina
BUCHE – Butirilcolinesterase
CBS – Cistationina beta sintase
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EIM – Erros inatos do metabolismo
E-NPP – Ecto-nucleotídeopirofosfatase/fosfodiesterase
FAH – Deficiência de fumarilacetoacetato hidrolase
IFN γ – Interferon gama
GNMT – Deficiência da Glicina-N-metiltransferase
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 – Interleucina 10
IL-6 – Interleucina 6
IL-18 – Interleucina 18
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-7 – Interleucina 7
IL-13 – Interleucina 13

MAT – Metionina adenosiltransferase

Met – Metionina

MetO – Metionina sulfóxido

NK – Natural killer

NTPDase – Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

P2X – Receptores purinérgicos

P2Y – Receptores purinérgicos

PCR – Proteína-C reativa

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SAM – S-Adenosilmetionina

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF- β – Fator transformador de crescimento β

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1 Introdução	13
2 Objetivos	16
Objetivo geral	16
Objetivos específicos	16
3 Revisão de literatura	17
Erros Inatos do Metabolismo.....	17
Metionina e Metionina Sulfóxido.....	18
Hipermetioninemia	21
Sistema Imunológico e Inflamação.....	23
Sistema Purinérgico	26
Nucleotídeos e Nucleosídeos de Adenina.....	27
Receptores Purinérgico.....	28
Enzimas que degradam os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina	29
Sistema Colinérgico	31
Colinesterases.....	33
4 Manuscrito.....	35
5 Conclusões.....	65
Referências	67
Anexos	81

1. Introdução

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são alterações genéticas que se manifestam pela síntese anômala de uma proteína, geralmente uma enzima, ocasionando uma diminuição ou mesmo ausência de sua síntese (BARIĆ et al., 2001; BICKEL, 1987; SCRIVER et al., 2001). Essas alterações podem resultar no bloqueio de rotas metabólicas através da deficiência ou ausência na atividade da enzima acometida, levando tanto ao acúmulo de metabólitos tóxicos, quanto a falta de produtos essenciais, ambos com doenças subsequentes. Os EIM, de maneira geral, são distúrbios graves que se manifestam na infância e cujo diagnóstico pode ser dificultado devido ao grande número de alterações, diversidade de efeitos metabólicos e ausência, na maioria dos casos, de sinais e sintomas específicos. Assim, a maioria dos EIM podem se beneficiar de um tratamento específico, que será melhor quanto mais precoce for o diagnóstico (EL-HATTAB, 2015; GIUGLIANI, 1988; SCRIVER et al., 2001).

Existem diversos estudos demonstrando que a metionina (Met) e/ou seus metabólitos podem ser extremamente tóxicos quando encontrados em altas concentrações nos tecidos (BENEVENGA & STEELE, 1984; MUDD et al., 2001; GARLICK, 2006). Neste contexto, a hipermetioninemia ocorre em várias desordens metabólicas, dentre elas, destaca-se a deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Nessa doença, a concentração plasmática de Met 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 (MetO), o metanotiol e o sulfeto de hidrogênio, também podem ser observadas no plasma e na urina dos pacientes acometidos por essa doença (MUDD et al., 2001). Embora alguns pacientes hipermetioninêmicos sejam assintomáticos, um número considerável apresenta alterações neurológicas como déficit cognitivo, edema e desmielinização cerebral, além de alterações hepáticas cuja fisiopatologia não está completamente estabelecida (CHAMBERLIN et al., 1996; MUDD et al., 2000, 2001).

A toxicidade da metionina tem sido evidenciada através de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstrando que esse aminoácido induz estresse oxidativo e altera importantes parâmetros do metabolismo energético e a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase, em cérebro de ratos (STEFANELLO et al., 2005, 2007a; STRECK et al., 2002, 2003). Embora esses estudos demonstrem que a Met e seus metabólitos induzem alterações neuroquímicas e periféricas, o efeito destes compostos em parâmetros inflamatórios tem sido pouco investigados.

Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e AMP e seu correspondente nucleosídeo adenosina são considerados importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos (YEGUTKIN, 2008). O ATP possui funções pró-inflamatórias como a estimulação e a proliferação de linfócitos, sendo essencial para a liberação de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e o IFN- γ (BOURS et al., 2006). Por outro lado, a adenosina tem potentes atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras por inibir a proliferação de células T através da ativação de receptores $\text{A}_{2\text{A}}$ e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (GESSI et al., 2007).

A sinalização induzida pelo ATP e adenosina é regulada pela ação de enzimas como a NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA). A NTPDase é uma ectoenzima capaz de hidrolisar nucleosídeos tri- e difosfatados, como o ATP e o ADP, até seu respectivo nucleosídeo monofosfatado AMP (ZIMMERMANN, 2001). O AMP formado é posteriormente hidrolisado pela ação da 5'-nucleotidase até adenosina, a qual é degradada pela ação da ADA em inosina (PHILLIS, 1991). Sendo assim, a atividade destas enzimas é essencial para a manutenção dos níveis normais de ATP e adenosina no meio extracelular as quais são importantes moduladores do processo imune e inflamatório.

Nos últimos anos, o papel dessas enzimas têm sido avaliado em várias doenças como o câncer (ARAÚJO et al., 2005), o diabetes (LUNKES et al., 2003), o infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008), síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LEAL et al., 2005), artrite reumatóide (GOODARZI et al., 2010), tuberculose (GOODARZI et al., 2010) e esclerose múltipla (SPANEVERELLO et al., 2010) demonstrando que elas podem ser importantes alvos terapêuticos em muitas destas situações patológicas. Diante do exposto, é evidente a importância das ectonucleotidases na fisiopatologia das doenças imunes e inflamatórias, sendo um alvo interessante de estudo em desordens genéticas como na hipermetioninemia.

A sinalização colinérgica não neuronal mediada por acetilcolina, uma importante molécula com funções imunomoduladoras, é uma via que desempenha um papel chave na modulação das funções imunes e inflamatórias através da ativação dos receptores muscarínico e nicotínicos, regulando a produção e liberação de citocinas e proliferação de células imunes (KAWASHIMA & FUJII, 2003; SILVA-HERDADE & SALDANHA, 2013). As respostas mediadas pela acetilcolina correlacionam-se diretamente com a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BUCHE) que são as enzimas com capacidade de hidrolisar a molécula de acetilcolina em acetato e colina (DAS, 2007; RAO et al., 2007).

A atividade da AChE e BUCHE já foi avaliada em outros EIM como na hiperhomocisteinemia (STEFANELLO et al., 2005c), além disso STEFANELLO et al., (2007c) demonstraram alteração na atividade da AChE em cérebro de ratos submetidos a administração crônica de met. Entretanto o efeito da Met e MetO na atividade da AChE em linfócitos e da BUCHE em soro ainda não foi elucidado. Desse modo, mudanças na atividade das colinesterases poderiam ser um importante marcador inflamatório na hipermetioninemia.

Sendo assim, devido aos mecanismos ainda pouco compreendidos em relação às alterações inflamatórias e imunes em portadores de hipermetioninemia, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel das ectonucleotidasas e colinesterases em linfócitos e soro, bem como níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias em ratos jovens submetidos à administração aguda e crônica de Met e/ou MetO.

2. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido na atividade de enzimas do sistema purinérgico e colinérgico e parâmetros inflamatórios em linfócitos e soro de ratos jovens.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, adenosina deaminase e acetilcolinesterase em linfócitos de ratos jovens após 1 e 3 horas da administração de metionina e/ou metionina sulfóxido.
- Analisar a atividade das enzimas adenosina deaminase e butirilcolinesterase em soro de ratos jovens após 1 e 3 horas da administração de metionina e/ou metionina sulfóxido.
- Quantificar níveis séricos da proteína-C reativa e interleucina 10 (IL-10) em ratos jovens após 1 e 3 horas da administração de metionina e/ou metionina sulfóxido.
- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, adenosina deaminase e acetilcolinesterase em linfócitos de ratos jovens após 21 dias de tratamento com metionina e/ou metionina sulfóxido.
- Investigar a atividade das enzimas adenosina deaminase e butirilcolinesterase em soro de ratos jovens após 21 dias de tratamento com metionina e/ou metionina sulfóxido.
- Quantificar níveis séricos da proteína-C reativa e IL-10 de ratos jovens após 21 dias de tratamento com metionina e/ou metionina sulfóxido.

3. Revisão de Literatura

Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) compreendem um grupo de desordens hereditárias predominantemente autossômicas recessivas, causadas por alterações genéticas resultando geralmente, na deficiência ou ausência da síntese de uma enzima (BARIĆ et al., 2001; SCRIVER et al., 2001). Esses distúrbios podem ocasionar mudanças em uma via metabólica, através da ausência ou diminuição da atividade enzimática, acometendo desde processos que envolvem a síntese, degradação, transporte e até armazenamento de moléculas no organismo. As principais alterações encontradas nessas situações são a falta de produtos essenciais e o acúmulo de metabólitos com efeitos geralmente não bem esclarecidos (BARIĆ et al., 2001; SCRIVER et al., 2001).

Os EIM começaram a ser estudados no século XX por Archibald Garrod que descreveu pela primeira vez a alcaptonúria, e mais tarde publicou o livro intitulado “Erros Inatos do Metabolismo” no qual descreveu outras alterações genéticas metabólicas. Atualmente, mais de 500 EIM já foram descritos na literatura sendo a incidência isolada desses distúrbios rara, entretanto coletivamente atingem aproximadamente 1:1000 recém-nascidos, sendo que 25% dos EIM manifestam-se ainda no período neonatal (EL-HATTAB 2015; SCRIVER et al., 2001).

Os EIM podem ser classificados de diversas formas, todavia o método mais utilizado é de acordo com área do metabolismo afetada pela alteração genética, subdividindo-se em metabolismo de aminoácidos, glicídeos, lipídeos, glicoproteínas, ácidos orgânicos, lipoproteínas dentre outros, sendo as aminoacidopatias um dos EIM mais frequentes (SCRIVER et al., 2001). Cerca de 50 aminoacidopatias são conhecidas atualmente, como a fenilcetonúria, distúrbios no metabolismo da tirosina, alcaptonúria, distúrbios do metabolismo de aminoácidos sulfurados como a homocistinúria e a hipermetioninemia (SAUDUBRAY et al., 1990).

Metionina e Metionina Sulfóxido

A metionina (Met) é um aminoácido sulfurado crucial para o desenvolvimento e crescimento normais de mamíferos proveniente essencialmente da dieta ou da degradação de proteínas endógenas (PRUDOVA et al., 2005). A metabolização da Met ocorre principalmente no fígado, onde a enzima metionina adenosiltransferase (MAT) catalisa a primeira reação da metabolização da Met, formando S-adenosilmetionina (SAM) a partir de met e uma molécula ATP. A SAM é um produto importante, pois é o principal doador de grupamentos metila para compostos como DNA, RNA, fosfolipídeos e catecolaminas. Essa reação de transmetilação é catalisada por metiltransferases formando S-adenosil-homocisteína (AdoHcy) e grupamento metila. Depois de formada, a AdoHcy é hidrolisada formando adenosina e homocisteína, pela enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase (FINKELSTEIN 1990; MARTINOV et al., 2010; MUDD et al., 2001) (FIGURA 1).

A metabolização da homocisteína pode ocorrer por duas vias, a de remetilação, onde esse aminoácido receberá um grupamento metila da betaína ou do 5-metiltetraidrofolato e assim formar novamente a met, ou a de transulfuração, em que a reação catalisada pela enzima cistationina β -sintase, converterá a homocisteína em cistationa a qual é hidrolisada pela cistationa γ -liase formando cisteína. É importante ressaltar que a via de transulfuração é basicamente a única via de catabolismo da Met (FINKELSTEIN, 1990; MATO et al., 2008; MUDD et al., 2001) (FIGURA 1).

O monitoramento do metabolismo da Met é importante uma vez que esse aminoácido participa de diversos processos biológicos fundamentais ao organismo, como a síntese de proteínas, manutenção das metilações biológicas, formação de poliaminas, e de homocisteína necessário para o metabolismo de folato intracelular e catabolismo de colina e também na manutenção da homeostase redox celular (SUAREZ et al., 2010). Convém ressaltar que um dos principais pontos de regulação do metabolismo da Met ocorre através da concentração de SAM, pois esse composto pode ativar ou inibir enzimas como a MAT que regulam a velocidade da rota metabólica (FINKELSTEIN, 2006).

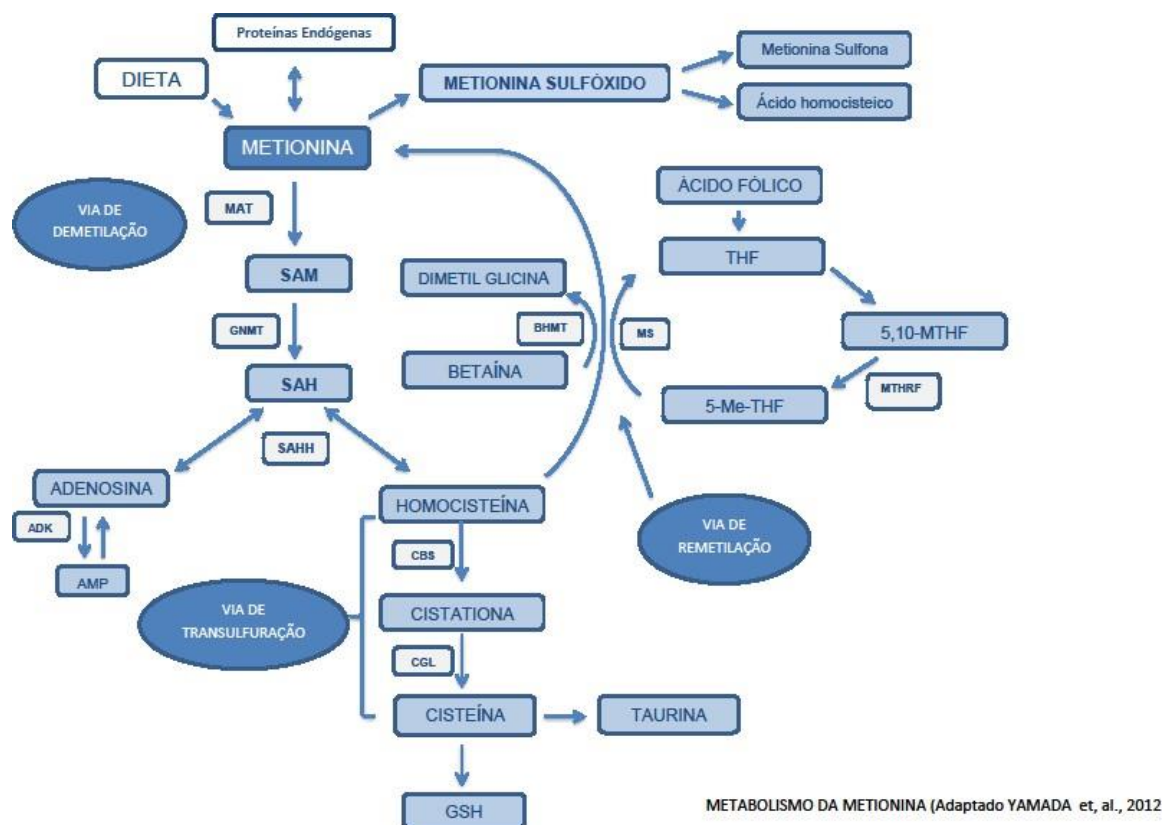


FIGURA 1 : Metabolismo da Metionina. MAT - metionina adenosiltransferase; SAM - S-adenosil-metionina; GNMT- glicina-N-metiltransferase; SAH- S-adenosil-homocisteína; SAHH - S-adenosilhomocisteína; ADK - adenosina cinase; AMP - adenosina monofosfato; CBS - cistationina β -sintase; CGL - cistationina γ -liase; BHMT – betaína homocisteína metiltransferase; MS - metionina sintase; THF- tetrahydrofolato; 5,10-MTHF- 5,10-metilenotetrahydrofolato; MTHFR- metilenotetrahydrofolato redutase; 5-Me-THF - 5-metiltetrahydrofolato; GSH - Glutationa. (Adaptado YAMADA, et al., 2012).

Por ser um aminoácido sulfurado, a Met é especialmente sensível, direta ou indiretamente, a oxidação mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio (LIANG et al., 2012; VOGT, 1995). O principal metabólito formado pela oxidação da Met, é a metionina sulfóxido (MetO), a qual se encontra em duas formas estereoisoméricas, metionina-S-sulfóxido e metionina-R-sulfóxido (FIGURA 2) . Esse aminoácido pode também ser subsequentemente convertido em metionina sulfona e ácido homocisteico (LEVINE et al., 2000; ZHAO et al., 2012). A reação de conversão da Met em MetO é reversível, e a enzima responsável por reduzir a MetO de volta a Met é a metionina sulfóxido redutase. Essa enzima parece ser menos expressa em recém-nascidos, o que poderia contribuir para o acúmulo de MetO no período em que a hipermetioninemia começa a se estabelecer (KOC & GLADYSHEV, 2007; STADTMAN, 2004). Desse modo, a avaliação de altas concentrações de MetO em modelos animais se torna importante.

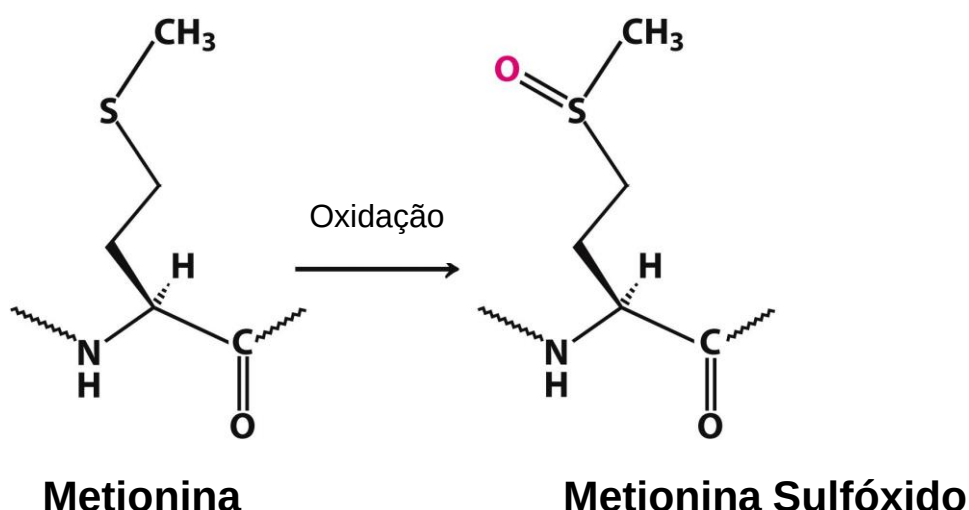


FIGURA 2: Oxidação da Metionina a Metionina Sulfóxido (Adaptado BERG et al., 2012).

A presença de resíduos de MetO nas proteínas já foi descrito na literatura, e parece resultar geralmente na perda da atividade biológica proteica. Além disso, o aumento nas concentrações de MetO poderia acarretar na sua oxidação irreversível a metionina sulfona, desbalanceando o ciclo oxidação/redução da met que constitui um sistema endógeno com capacidade local antioxidativa. A MetO também vem sendo associado ao envelhecimento e doenças neurodegenerativas (JOHN et al., 2012; KOC & GLADYSHEV, 2007; MOSKOVITZ, 2014; STADTMAN, 2004). COSTA et al. (2013) demonstraram que a administração aguda de Met, MetO e a associação de Met e MetO inibe a atividade da catalase, aumentam a atividade da enzima superóxido dismutase, além de diminuir a produção de ROS e alterar os níveis de conteúdo tiólico total e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entretanto os efeitos de altas concentrações de MetO no organismo ainda é pouco compreendido.

Hipermetioninemia

A hipermetioninemia é caracterizada pelo acúmulo plasmático do aminoácido Met, além da deficiência do produto SAM e da produção de metabólitos como a MetO. Estudos demonstraram que essa condição pode ocorrer isolada ou associada a outros EIM como na homocistinúria. Elevadas concentrações de Met e seus metabólitos podem ter origem genética ou não genética, como ocorre na presença

de doença hepática, dieta rica em met, baixo peso ao nascer ou prematuridade (MUDD et al., 2001, 2000).

Até o momento são conhecidas seis alterações genéticas que podem levar ao aumento da concentração plasmática de met: Deficiência da enzima MAT I/III; Homocistinúria devido à deficiência da cistationina beta-sintase (CBS); Deficiência da glicina N-metiltransferase (GNMT); Deficiência de S-adenosil-homocisteína hidrolase (AHCY); Deficiência de Citrina; Deficiência de fumarilacetoacetato hidrolase (FAH) - Tiroseemia tipo I (MUDD, 2011).

Dentre as alterações genéticas descritas acima, a causa mais comum encontrada em pacientes com hipermetioninemia isolada é a deficiência da enzima MAT. O gene que codifica essa enzima (MAT1A) está localizado no braço longo do cromossomo 10, e é expresso somente em células hepáticas maduras. A deficiência da MAT é uma doença recessiva rara que leva ao acúmulo do substrato Met e deficiência do produto SAM, bem como o aumento de alguns metabólitos como a metO, metanotiol e sulfeto de hidrogênio. Nessa condição, os valores de Met plasmática podem atingir 2.500 $\mu\text{mol/L}$, sendo que os valores de referência estão em torno de 30 $\mu\text{mol/L}$ (CHAMBERLIN et al., 1996; MUDD, 2011).

Embora existam pacientes hipermetioninêmicos assintomáticos, uma parcela considerável é sintomática, podendo apresentar alterações neurológicas como retardo mental, desmielinização, déficit cognitivo, edema, distonia e dispraxia e retardo no desenvolvimento psicomotor cuja fisiopatologia ainda não está bem estabelecida (CHAMBERLIN et al., 1996; MUDD, 2011; MUDD et al., 2000, 2001;). Além disso, também já foi descrito na literatura disfunção hepática e severa elevação da creatina cinase. Pacientes hipermetioninêmicos podem apresentar sinais clínicos como odor incomum na respiração, suor, hálito e urina possivelmente devido ao metabolismo alternativo da Met. Esses sintomas e sinais clínicos podem ser observados desde a infância, ainda no período neonatal (AVILA et al., 2000; LU et al., 2008, 2001).

Embora seja extremamente inespecífica e de difícil diagnóstico a hipermetioninemia pode ser descoberta ainda nos primeiros dias de vida. Quando os níveis de met atingem 48 $\mu\text{mol/L}$, pode ser sugestivo para deficiência da MAT, sendo necessário a determinação da atividade dessa enzima no fígado. Também, alterações nos níveis de SAM e de homocisteína (acima de 59 $\mu\text{mol/L}$) podem

amparar o diagnóstico (CHIEN et al., 2005; COUCE et al., 2008; SUAREZ et al., 2010).

No caso de hipermetioninemia assintomática, o monitoramento constante dos níveis de Met é necessário, porém, não há necessidade de tratamento. Entretanto, nos casos mais severos da doença, como na presença de alterações neurológicas já estabelecidas devido à deficiência da MAT, o tratamento é imprescindível. Uma dieta restrita de proteínas é o tratamento básico, pois diminui a ingesta do aminoácido. Todavia, essa restrição é controversa, visto que reduzirá ainda mais os níveis de SAM podendo agravar os danos neurológicos. A administração de SAM (S-adenosilmetionina dissulfato tosilato) em concentrações de 400 a 800 mg, duas vezes ao dia, parece ser uma estratégia terapêutica, e já foi descrito que essa suplementação melhora os sintomas associados a essa desordem metabólica, assim como desmielinização no sistema nervoso central (CHIEN et al., 2005; COUCE et al., 2013, 2008).

É importante ressaltar que a hipermetioninemia é uma doença rara que não tem cura e cuja fisiopatologia ainda é pouco compreendida. Desse modo, são necessários estudos para melhor compreender os mecanismos envolvidos nas alterações presentes nos pacientes afetados, a fim de buscar alvos terapêuticos objetivando melhorar a qualidade de vida dos portadores desse EIM. Nesse contexto, modelos experimentais envolvendo animais são de extrema importância para esclarecer os mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças.

Estudos envolvendo elevadas concentrações plasmáticas da Met, como encontrado na hipermetioninemia, já foram realizados e demonstraram que esse aumento pode levar a alterações prejudiciais em alguns órgãos como encéfalo e fígado de ratos. Em cérebro, já foram demonstradas alterações na atividade da acetilcolinesterase, Na^+, K^+ -ATPase, em parâmetros de estresse oxidativo, além da redução do conteúdo de gangliosídeos, fosfolipídeos e colesterol em ratos submetidos ao modelo de hipermetioninemia agudo e crônico (STEFANELLO et al., 2007a, 2007b, 2007c, 2005,). Também já foram descritas alterações em marcadores de dano oxidativo e histológicos em fígado de ratos jovens submetidos ao modelo de hipermetioninemia (COSTA et al., 2013; STEFANELLO et al., 2009).

Sistema Imunológico e Inflamação

O sistema imunológico é constituído por um conjunto de células, tecidos e moléculas que medeiam a resistência a infecção e agressões em geral para manter a homeostase do organismo. Esta defesa é conceitualmente dividida em imunidade inata, que não é específica para nenhum patógeno sendo a defesa de primeira linha do organismo, e a imunidade adaptativa que atua especificamente, através da produção de anticorpos, contra um patógeno em particular e seus produtos (ABBAS et al., 2008; COTA & MIDWINTER, 2015; CRUVINEL et al., 2010; HENDRY et al., 2013).

A imunidade inata está sempre disponível e age rapidamente em resposta a agressão uma vez que seus mecanismos de defesa celulares e bioquímicos estão presentes até mesmo antes da infecção, entretanto não conduz uma proteção duradoura (ABBAS et al., 2008; HENDRY et al., 2013). Seus mecanismos compreendem de maneira geral barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. Os componentes da imunidade inata são: epitélios e substâncias químicas antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais; as células efectoras sendo as principais as células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas e células *Natural Killer* – NK; sistema complemento, que quando ativado leva à lise do microrganismo; citocinas e quimiocinas, que regulam e coordenam muitas das atividades das células da imunidade inata (ABBAS et al., 2008; BALESTIERI, 2005; HENDRY et al., 2013).

Muitas vezes o organismo exige uma defesa mais poderosa contra patógenos que evoluíram para resistir à imunidade inata. Neste sentido, a imunidade adaptativa ou adquirida age através de reações a partir do reconhecimento de substâncias microbianas e não microbianas pelo organismo (ABBAS et al., 2008). Além disso, possui a capacidade de distinguir microrganismos e moléculas diferentes ou até estreitamente relacionadas. As respostas imunológicas são adquiridas por experiência, ou seja, por exposições aos patógenos. Os principais componentes da resposta imune adaptativa são os linfócitos e seus produtos secretados, como por exemplo, os anticorpos (ABBAS et al., 2008).

Existem dois tipos de resposta imune adaptativa: a resposta imune celular, mediada por linfócitos do tipo T; e a resposta imune humoral, mediada por anticorpos, moléculas secretadas por linfócitos do tipo B. Essas duas respostas

imunes são responsáveis por gerar especificidade e diversidade aos processos imunes, além de especialização e não reatividade com as células e tecidos do próprio organismo (ABBAS et al., 2008). Os linfócitos são células que reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos e o progenitor linfoide comum (ou linfoblasto) na medula óssea dá origem aos linfócitos antígeno-específicos do sistema imune adaptativo, tanto linfócitos do tipo T como linfócitos do tipo B (ABBAS et al., 2008; JUNIOR et al., 2010).

A imunidade humoral é mediada por proteínas chamadas anticorpos os quais são produzidas pelos linfócitos B. Uma das funções mais importantes dos anticorpos é impedir que os patógenos extracelulares tenham acesso e colonizem as células e tecidos do hospedeiro impedindo assim o estabelecimento da infecção. Após ativados os linfócitos B passam por um processo de proliferação e diferenciação, que culmina na geração de plasmócitos com produção de imunoglobulinas com alta afinidade para o antígeno que originou a resposta. As imunoglobulinas ou anticorpos de membrana dos linfócitos B são as moléculas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e os linfócitos B efetores secretam anticorpos que neutralizam e eliminam os antígenos (ABBAS et al., 2008; JUNIOR et al., 2010).

A defesa para os micro-organismos que invadem e se multiplicam intracelularmente é chamada de imunidade celular, pois é mediada pelos linfócitos T que são capazes de reconhecer fragmentos peptídicos dos antígenos proteicos apresentados por outras células. Após a ativação, os linfócitos T se diferem em três tipos celulares (ABBAS et al., 2008; COTA & MIDWINTER, 2015; JUNIOR et al., 2010). Os linfócitos T auxiliar (*helper*) são capazes de ativar as células fagocitárias para que destruam os micro-organismos ingeridos. Também ativam os linfócitos B para produção de anticorpos, além de secretar citocinas que são proteínas que agem como moléculas mensageiras do sistema imune. Além disso os linfócitos T auxiliar estimulam a proliferação e diferenciação das próprias células T, e ativam outras células, como linfócito B, macrófagos e outros leucócitos. Os linfócitos T citotóxicos que são capazes de destruir as células infectadas e linfócito T regulador que atuam principalmente na supressão da resposta imunológica (ABBAS et al., 2008; JUNIOR et al., 2010).

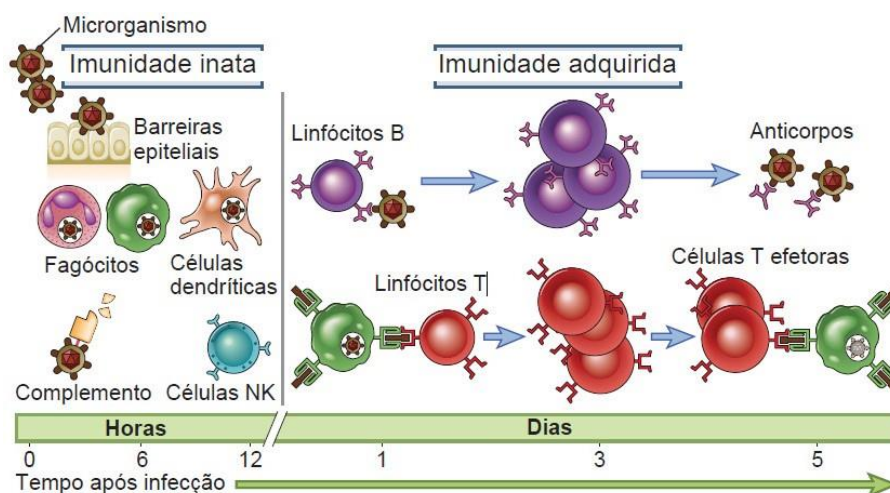


FIGURA 3: Diferenças entre mecanismos e células da imunidade do organismo, que é dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa (Adaptado de Abbas, 2008).

A inflamação ou processo inflamatório é uma reação complexa do organismo à infecção ou agressão em geral. De maneira geral, caracteriza-se como um processo com funções protetoras no controle de infecções e promoção do reparo tecidual, entretanto quando em excesso ou descompensada pode causar lesões e até doenças autoimunes. Os principais sinais clínicos característicos da inflamação são rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (ABBAS et al., 2008; CRUVINEL et al., 2010). A resposta inflamatória é mediada por diversas moléculas, e os principais mediadores inflamatórios associados à resposta imunológica são as citocinas e quimiocinas (OLIVEIRA et al., 2011; TURNER et al., 2014).

As citocinas são moléculas proteicas, que enviam diversos sinais os quais podem ser estimulatórios, modulatórios ou até inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação por um antígeno. As citocinas agem através da ligação com receptores específicos, desse modo ativam mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica (OLIVEIRA et al., 2011; TURNER et al., 2014). Sendo assim, essas moléculas são capazes de modular a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência das células do sistema imune e regular a produção de outras citocinas, as quais podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, estão as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF (fator de necrose tumoral). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (fator transformador de crescimento β) (OLIVEIRA et al., 2011; TURNER et al., 2014).

Dentre as citocinas, a IL-6 é uma citocina pleiotrópica e possui potentes ações pró-inflamatórias e desempenha uma variedade de funções nos sistemas imunes celulares e humorais relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro injúria tecidual. A IL-6 é produzida e secretada por células endoteliais, musculares lisas, monócitos, linfócitos B e T e macrófagos. Em contrapartida, a IL-10 é uma citocina pleiotrópica produzida pelas células T helpers, linfócitos B e T, monócitos e macrófagos. Possui propriedades antiinflamatórias, cuja principal função é a regulação do sistema imune, pois inibe de maneira potente a expressão e/ou a produção de citocinas pró-inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2011; TURNER et al., 2014).

Outro biomarcador inflamatório bastante estudado em diversas patologias é a proteína-C reativa (PCR) (CLYNE & OLSHAKER 1999; SILVA & LACERDA 2012). A PCR é a maior proteína de fase aguda positiva que responde rapidamente em repostas a infecção ou injúria tecidual. É sintetizada no fígado e estimulada principalmente pela IL-6. A principal função biológica da PCR é reconhecer patógenos e células danificadas para mediar a sua eliminação através do recrutamento das células fagocíticas e do sistema de complemento (CLYNE & OLSHAKER 1999; VOLANAKIS 2001). Ainda possui a capacidade de potencializar a produção de interleucinas como a IL-2, a IL-1 β , o TNF α e a IL-6 por macrófagos periféricos e monócitos sanguíneos (CLYNE & OLSHAKER 1999).

Sistema Purinérgico

A sinalização mediada pelos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina no meio extracelular, a sinalização purinérgica, está envolvida em uma variedade de processos biológicos sendo reconhecida como uma rota de comunicação célula-célula envolvida em diversos mecanismos neuronais e não neuronais (BODIN & BURNSTOCK, 2001). Considerando que esta sinalização pode estar envolvida em processos de curta e longa duração como as respostas imunes, inflamação, agregação plaquetária, proliferação e morte celular, essa via se tornou um importante alvo de estudos devido a essa capacidade modulatória envolvida em diversas condições fisiopatológicas assim como já observadas na aterosclerose, em doenças neurodegenerativas e em condições inflamatórias (BURNSTOCK, 2013; ELTZSCHIG et al., 2012).

Esse sistema é constituído por nucleotídeos e nucleosídeos como trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina (Ado) que são as moléculas que medeiam a sinalização purinérgica. Além dos transportadores dessas moléculas, os receptores pelos quais esses nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos e as ectonucleotidases que são as enzimas que modulam a concentração dessas moléculas no meio extracelular (YEGUTKIN, 2008) (FIGURA 4).

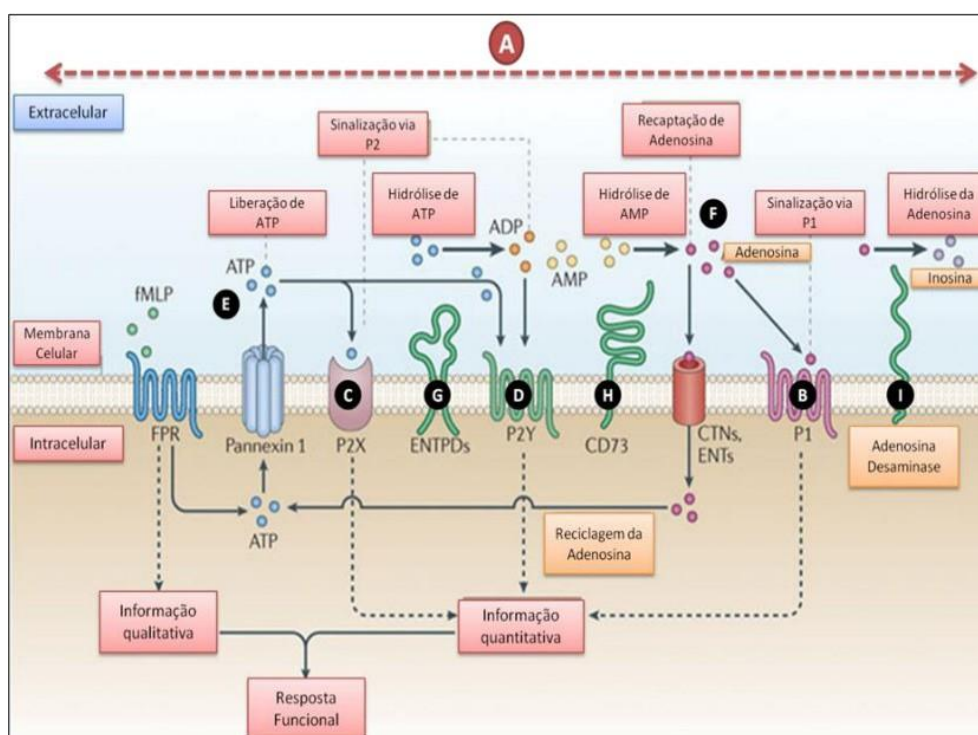


FIGURA 4 - Componentes da sinalização purinérgica. (A); receptor do tipo P1 (B); Receptor do tipo P2X (C); Receptor do tipo P2Y (D); ATP liberado extracelularmente (E); Adenosina formada a partir do ATP via CD39 e CD73 (F); E-NTPDase (ou CD39) (G); 5' nucleotidase (ou CD73) (H); e E-ADA (I). (Adaptada de JUNGER, 2011).

Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

Os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina estão presentes no meio extracelular fisiologicamente em baixas concentrações, entretanto em sítios inflamatórios e de estresse há um aumento significativo na concentração dessas moléculas. A concentração extracelular de ATP depende de uma variedade de processos fisiológicos importantes como lise celular, permeabilidade seletiva da membrana, exocitose das vesículas, difusão através dos canais transmembranas e via transportadores e ação das ectonucleotidases (ENJYOJI et al., 1999; MALMSJO et al., 2000; SABIROV & OKADA, 2005; ZIMMERMANN, 2001). Especialmente o

ATP e adenosina desempenham um papel importante na modulação de processos imunes e inflamatórios (DI VIRGILIO & VUERIC, 2015).

Dados da literatura tem demonstrando que o ATP atua como uma molécula sinalizadora endógena de danos, ativando a resposta imune inflamatória (DI VIRGILIO et al., 2003; ZHANG, 2008). Além da liberação por dano celular, o ATP também pode ser liberado por diversas células, incluindo células inflamatórias, através de exocitose vesicular, por transportadores ou pelos canais acoplados à panexina ou conexina (IDZKO et al., 2014). Assim sendo, estudos demonstram que este nucleotídeo atua como uma molécula pró-inflamatória, pois é capaz de favorecer a ativação e proliferação de linfócitos T além de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2 e IFN- γ) (BOURS et al., 2006; LANGSTON et al., 2003). Também o ATP está envolvido no recrutamento de monócitos circulantes para o tecido alvo, na migração e diferenciação de células dendríticas e a produção de interleucina 1 β (IL-1 β), IL-1 e TNF- α nos macrófagos (ELSSNER et al., 2004; GUERRA et al., 2003; LA SALA et al., 2003; VENTURA et al., 1995).

Em contrapartida, a adenosina, nucleosídeo correspondente ao ATP, também é uma molécula importante para o processo inflamatório, desempenhando funções opostas ao ATP, atuando como imunossupressora e anti-inflamatória (ANTONIOLI et al., 2014). Os mecanismos pelos quais a adenosina age frente a essas ações ainda vêm sendo investigados, entretanto sabe-se que esta molécula é capaz de promover a maturação de monócitos e inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-6 e TNF- α) (CSOKA et al., 2012; HASKÓ et al., 2000; HASKÓ et al., 1996; THIELE et al., 2004). Além disso, estudos tem demonstrado que esta molécula diminui a adesão de linfócitos durante a inflamação, diminui a proliferação de células-T e inibi a secreção de IL-2, IL-4 e IFN- γ por células CD4+ (GESSI et al., 2004; KOSHIBA et al., 1999). Também a adenosina possui a importante função de modular a agregação plaquetária e o tônus vascular (AFONSSI et al., 2002).

Receptores Purinérgicos

Os eventos mediados pelos nucleotídeos de adenina se dão pela interação destes com os receptores purinérgicos específicos presentes na superfície de membrana de diversas células (YEGUTKIN, 2008). Esses receptores são

subdivididos em duas famílias: P2X, que são ligados a canais iônicos e são ativados pelo ATP e os receptores P2Y os quais são acoplados a proteína G e respondem ao ATP e ADP. A família dos receptores do tipo P2X é composta por sete membros (P2X1-7) os quais possuem a porção amino e carboxi voltadas para o citoplasma celular. Os receptores do P2Y apresentam uma porção amino terminal extracelular e um carboxil terminal intracelular e sete regiões transmembrana e já foram identificados oito diferentes subtipos de receptores do tipo P2Y (P2Y1-2-4-6-11-12-13-14) (BURNSTOCK, 2006). O receptor P2X7 é um dos principais receptores relacionado ao sistema imune, pois é expresso em uma variedade de células imunológicas, além disso, é ativado em concentrações micromolares de ATP, sendo este um dos mecanismos de promoção da inflamação pelo ATP em linfócitos uma vez que induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-2 por estas células (BOURS et al., 2006; MOON et al., 2006; YIP et al., 2009). Em um estudo realizado *in vitro* foi possível observar que a ativação do receptor P2X7 desempenha um papel importante na produção de imunoglobulinas por linfócitos B (SAKOWICZ-BURKIEWICZ et al., 2013)

Os receptores para adenosina são proteínas transmembrana acoplados a proteína G e quatro tipos já foram descritos: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ (HASKÓ et al., 2008). Os receptores de adenosina são expressos na maioria das células do sistema imune. Nos linfócitos o principal receptor de adenosina é o A_{2A}, e estudos demonstraram que a ativação deste receptor nos linfócitos inibe a secreção de IL-2, IL-4 e IFN- γ por células T-CD4 com posterior redução da sua proliferação (HASKÓ et al., 2008; YEGUTKIN et al., 2008).

Os receptores funcionam como um sensor de perigo com a capacidade de modular a resposta imune de acordo com a fonte, a quantidade e a duração da liberação dos nucleotídeos e nucleosídeo. Os receptores P2 e os receptores para adenosina frequentemente apresentam efeitos opostos por isso são um alvo terapêutico promissor para doenças imunes e inflamatórias (ELTZSCHIG et al., 2012).

Enzimas que degradam os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

Uma vez no meio extracelular, os nucleotídeos e nucleosídeos podem mediar uma série de eventos importantes através dos seus receptores como

resposta imune, inflamação, agregação plaquetária e fluído sanguíneo. Frente a função dessas moléculas o controle dos níveis extracelulares é fundamental para a manutenção da homeostase do organismo. Esse controle é realizado por uma cascata de enzimas ancoradas na membrana celular ou podem ser encontradas na forma solúvel no meio intersticial ou fluidos corporais. Dentre essas enzimas se encontram as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase), a família das E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases) as quais são responsáveis por hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatado até AMP, 5'-nucleotidase que hidrolisa AMP formando adenosina e a adenosina deaminase (ADA) a qual faz a desaminação da Ado até inosina (ROBSON et al., 2006; YEGUTKIN, 2008).

Oito tipos de NTPDases já foram identificados, e os subtipos diferem entre si de acordo com localização celular, propriedade funcionais, a especificidade por substratos e distribuição tecidual. Quatro delas estão localizadas na membrana celular (NTPDases 1, 2, 3 e 8) com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular e as demais localizadas no interior da célula (NTPDases 4, 5, 6 e 7). As NTPDases de membrana são dependentes de íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} para a atividade catalítica (YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN et al., 2007; ZIMMERMANN, 2001).

A NTPDase 1 foi a primeira enzima a ser descoberta, e inicialmente foi descrita como um marcador de ativação de linfócito B, entretanto já está bem esclarecido que além da NTPDase 1 também ser expressa em linfócitos T, ela também está presente em uma variedade de células como nas células dendríticas, plaquetas, leucócitos, células endoteliais e célula do sistema nervoso (DWYER et al., 2007; ROBSON et al., 2006). Sabe-se que as NTPDases tem um papel protetor contra a lise celular causada pelo ATP extracelular em linfócitos T citosólicos, além disso, a atividade da NTPDase 1 não serve apenas como um mecanismo protetor para os linfócitos, mas também é necessária para a funcionalidade dessas células como reconhecimento de antígenos e ativação da atividade efetora das células-T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990 a, b).

A ADA é a enzima que catalisa irreversivelmente a adenosina formando inosina e desoxiinosina, e está localizada na membrana plasmática, a qual é a principal moduladora das concentrações de Ado no plasma, sendo importante para a produção dos mediadores da resposta inflamatória. Duas isoformas desta enzima já foram descritas: a ADA1 que apresenta maior atividade nos tecidos e a ADA 2 no soro (GAKIS, 1996; UNGERER et al., 1992; YEGUTKIN, 2008). A atividade da ADA

é utilizada para acompanhar a resposta imune, e também é utilizada como marcador clínico de doenças infecciosas pulmonares. Além disso, a ADA é capaz de modular a atividade linfocitária, pois é capaz de regular a diferenciação e proliferação de linfócitos T (HOVI et al., 1976; KHODADADI et al., 2011).

Poucos estudos na literatura avaliaram a relação do sistema purinérgico com EIM, entretanto já foram observadas, em um modelo crônico de hiperhomocisteinemia leve, alterações na atividade das ectonucleotidases em linfócitos de ratos além de menor expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase o que poderia levar a um ambiente pró-inflamatório (SCHERER et al., 2012). Considerando que já foram demonstradas alterações na atividade das enzimas do sistema purinérgico em outros EIM, torna-se interessante a avaliação das mesmas na hipermetioninemia, uma vez que alterações nestes mecanismos poderão ajudar a compreender a fisiopatologia da doença, além de ajudar na busca de novos mecanismos terapêuticos que possam controlar a inflamação nesta condição patológica.

Sistema Colinérgico

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor clássico do sistema nervoso central (SNC) e periférico e apresenta um papel importante em diversas funções fisiológicas. Sabe-se que a sinalização mediada pela ACh tem um papel importante na regulação do sistema imune, nesse sentido a ação desta molécula tem sido investigada em patologias que envolvem os processos imune e inflamatórios (PRADO et al., 2002; KAWASHIMA & FUJII, 2000; DAS 2002).

Estudos demonstraram que existe uma relação importante entre o nervo vago e a função imune, uma vez que este nervo está presente em tecidos linfoides como baço e timo e que as terminações nervosas formam contatos sinápticos com os linfócitos. Essa imunomodulação é conhecida como via colinérgica anti-inflamatória (OKUMA & NOMURA, 2000; PAVLOV & TRACEY, 2006).

Existe uma ampla expressão dos componentes do sistema colinérgico em uma variedade de tecidos não neuronais, como nas células do sistema imune e sanguíneas (ALMEIDA et al., 2010; KAWASHIMA & FUJII, 2000). Essas células, como os eritrócitos e os linfócitos, apresentam um sistema colinérgico completo composto por ACh, receptores muscarínicos e nicotínicos, as enzimas colina

acetiltransferase, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) (ALMEIDA et al., 2010; KAWASHIMA & FUJII, 2000).

A ACh é sintetizada pela colina acetiltransferase a partir de colina e Acetil-CoA e armazenada em vesículas. Uma vez formada, essa molécula age através dos receptores muscarínicos e nicotínicos presentes na membrana das células (PRADO et al., 2002; SOREQ & SEIDMAN, 2001). A ACh produzida por linfócitos age através dos seus respectivos receptores acoplados a membrana sobre os próprios linfócitos ou pode apresentar funções específicas sobre outras células, tais como controlar o recrutamento dos neutrófilos e macrófagos (REARDON et al., 2013). Além disso, alguns estudos já demonstraram que a ACh atenua a liberação de citocinas como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18 por macrófagos estimulados (ANDERSSON & TRACEY, 2012; OKUMA & NOMURA, 2001).

A ação da ACh é modulada pela ação das colinesterases: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Essas enzimas são constituintes ubíquos e diferenciam-se basicamente quanto à distribuição tecidual, propriedades cinéticas, especificidade por substratos e por inibidores seletivos (COKUGRAS et al., 1997; MASSOULIÉ et al., 1993).

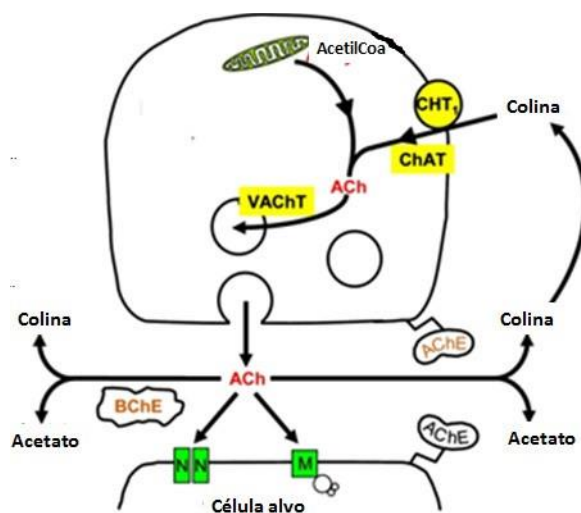


FIGURA 5 - Componentes do sistema colinérgico. Choline- colina; CHT1-Transportador de colina; ChAT-Colina aciltransferase; VACHT- Transportador vesicular de acetilcolina; ACh- Acetilcolina; BChE- Butirilcolinesterase; AChE- Acetilcolinesterase; M- Receptores Muscarínicos; N- Receptores Nicotínicos. Adaptados Kummer et al., 2008.

3.6.1 Colinesterases

A concentração da acetilcolina é modulada pela atividade da enzima AChE, que é responsável pela hidrólise específica de ACh em acetato e colina. Dentro desse contexto a AChE poderia contribuir para a regulação das respostas imuno-inflamatórias através da modulação os níveis extracelulares de ACh sendo assim, um importante alvo de estudos (MASSOULIÉ et al., 1993).

A AChE é uma glicoproteína classificada como homomérica, as quais incluem as variedades globular monomérica (G1), dimérica (G2) e tetrâmera (G4), ou herotoméricas, que consiste de um, dois ou três tetrâmeros catalíticos ligados covalentemente a uma subunidade não catalítica resultando nas formas estruturais assimétricas A4, A8 e A12 (MASSOULIÉ et al., 1993; TAYLOR et al., 1999). O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos serina (Ser-200), histidina (His-440) e glutamato (Glu-327) (SUSSMAN et al., 1991).

A AChE está presente majoritariamente no SNC, no entanto é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas. Nas células do sistema imune a principal forma estrutural encontrada é a G2 (RAKONCZAY et al., 2005; SILVA, 1998). A AChE é expressa em linfócitos T e B sendo responsável por hidrolisar rapidamente a acetilcolina, a qual possui ações anti-inflamatória e imunossupressora (NIZRI et al., 2006). Dados na literatura demonstram que a redução da atividade da AChE está associada com a diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatória como TNF- α e IL-1 β em cultura de linfócitos. Além disso, a inibição da AChE reduz a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, possivelmente associado a manutenção da ACh no meio extracelular (NIZRI et al., 2006; NIZRI & BRENNER, 2013).

Um aumento na atividade da AChE em linfócitos foi observado em pacientes com Síndrome de Down e Esclerose Múltipla, e essa alteração está relacionada com níveis séricos elevados de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-1, TNF- α , INF- γ , PCR e diminuição da IL-10 (POLACHINI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). A atividade da AChE em linfócitos e soro na hipermetioninemia ainda não foi descrito. Porém, em outros EIM como na tirosemia, já foi observado um aumento significativo na atividade da AChE em soro de ratos submetido a administração aguda e crônica de tirosina (FERREIRA et al., 2012).

A BUCHE é uma colinesterase não específica e não essencial ao sistema colinérgico não neuronal, capaz de hidrolisar outros esteres de colina além da acetilcolina. É sintetizada pelo fígado e possui uma distribuição tecidual ampla podendo ser encontrada no soro, pâncreas, coração, células hematopoiéticas e sistema nervoso central (DAS, 2007; SILVER, 1974).

Estruturalmente a BUCHE é similar a AChE, tendo no seu sítio ativo uma tríade catalítica contendo os aminoácidos histidina, ácido glutâmico e serina o qual é essencial para a atividade catalítica (JOHNSON & MOORE, 2012). Também é encontrada em diferentes formas moleculares como monômeros (G1) e oligômeros (G2) as quais são simétricas, hidrofílicas e solúveis enquanto que a forma tetramérica (G4) podem ser assimétricas e ancoradas a membrana por proteínas ricas em prolina (JOHNSON & MOORE, 2012).

Quanto à função fisiológica da BUCHE, ainda não foi esclarecida, entretanto a atividade desta enzima é bastante utilizada para o diagnóstico de intoxicações e monitoramento por pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos (DELFINO et al., 2009). Nos últimos anos o papel da BUCHE vem sendo alvo de estudos em condições de inflamação sistêmica de baixo grau, como obesidade e síndrome metabólica além de distúrbios neuronais associados a disfunções imunes inflamatórias como a doença de Alzheimer (DAS, 2007). Ademais, a atividade da BUCHE já foi avaliada em um modelo animal agudo e crônico de hiperhomocitemia, onde foi possível observar uma diminuição significativa da atividade desta enzima em soro de ratos de ambos protocolos (STEFANELLO et al., 2005c).

Sendo assim, considerando o papel importante das colinesterases no sistema imune e inflamatório, e que já foram observadas alterações da atividade dessas enzimas em outros EIM, a avaliação desses parâmetros na hipermetioninemia é relevante, uma vez que poderá auxiliar no diagnóstico desta doença o qual é dificultado pelos diversos e inespecíficos sintomas clínicos.

A hipermetioninemia é uma desordem genética cuja fisiopatologia ainda não foi completamente esclarecida. Desse modo, o estudo de possíveis mecanismos que possam estar envolvidos no desenvolvimento e na sintomatologia desta patologia, como o processo imune e inflamatório e as vias capazes de modular esses processos, tais como as vias colinérgica e purinérgica, se tornam interessante visando beneficiar os portadores dessa desordem, além de contribuir para a busca de novos alvos terapêuticos.

4. Manuscrito

Methionine and/or methionine sulfoxide alter ectoenzyme activities in lymphocytes of the young rats: acute and chronic effects

Mayara Sandrielly Pereira Soares, Marcelo Zanusso Costa, Tatiane Morgana da Silva, Marta Gazal, Carlus Augustu Tavares do Couto, Gabriela Nogueira Debom, Rodrigo Rodrigues, Elizandra Braganhol, Francieli Moro Stefanello, Roselia Maria Spanevello

O presente manuscrito está formatado segundo as normas da revista a qual foi submetido: Molecular and Cellular Biochemistry

Methionine and/or methionine sulfoxide alter ectoenzyme activities in lymphocytes and inflammatory parameters in the serum from young rats: acute and chronic effects

Mayara Sandrielly Pereira Soares¹, Marcelo Zanusso Costa², Tatiane Morgana da Silva², Marta Gazal¹, Carlus Augustu Tavares do Couto¹, Gabriela Nogueira Debom¹, Rodrigo Rodrigues¹, Elizandra Braganhol³, Francieli Moro Stefanello^{2*}, Roselia Maria Spanevello^{1*}

¹ Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

² Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

³ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS Brazil.

*Address reprint requests to: Roselia Maria Spanevello or 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

e-mail: roseliabioquimica@gmail.com or fmstefanello@gmail.com

Abstract

Hypermethioninemia occurs in several genetic abnormalities. ATP is a proinflammatory molecule while adenosine and acetylcholine have anti-inflammatory effects. The action of these molecules at the site of inflammation is controlled by the NTPDase, Adenosine Deaminase (ADA), Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BUChE) enzymes. We investigated the effect of acute and chronic treatment with Met and/or methionine sulfoxide (MetO) in ectonucleotidases and cholinesterases activities in lymphocytes and levels of C-protein reactive (CRP) and interleukin-10 (IL-10) in serum from young rats. We have four animal groups: I-control; II-Met; III-MetO and IV-Met plus MetO. In acute treatment, the animals received a single injection subcutaneously and were euthanized 1 and 3 h after administration. In chronic protocol Met and/or MetO were administered twice a day with an 8-hour interval, from the 6th to the 28th day of life. ATP hydrolysis was decreased in lymphocytes 1h after treatment in groups III and IV ($P<0.05$). However, ATP and ADP hydrolysis in lymphocytes was increased in the groups III e IV and ADA activity was increased in group III 3h after the treatment ($P<0.05$). AChE activity was increased in lymphocytes after 3h and 21 days of treatment in groups III e IV ($P<0.05$) while BUChE activity in the serum was decreased after 1h and 21 days of treatment in the same groups ($P<0.05$). In chronic treatment the levels of CRP was increased in the groups III and IV while IL-10 levels was decreased in all groups ($P<0.05$). These findings help understand the inflammatory alterations in hypermethioninemia.

Key words: ectonucleotidases; methionine; methionine sulfoxide; cholinesterases; interleukin-10; hypermethioninemia

1. Introduction

Methionine is an essential amino acid needed for normal growth and development in mammals [1]. It is known that S - adenosylmethionine (SAM), synthesized from methionine, is essential for methylation, transsulfuration and polyamine synthesis [2, 3]. Consequently, alterations in methionine metabolism are involved in a wide spectrum of disorders, such as neurodegenerative diseases, cancer and developmental abnormalities [1, 4, 5]. Nevertheless, a high concentration of methionine, a condition also known as hypermethioninemia, is observed in the plasma of patients with several metabolic disorders, as methionine adenosyltransferase deficiency may be toxic [6, 7].

Methionine residues, mainly sulfoxide form, are one of the many amino acids that are susceptible to oxidation by reactive oxygen species (ROS) [8, 9]. In situations where methionine levels are higher than normal rates, this amino acid in protein may be toxic [7]. Previous studies have demonstrated that chronic hypermethioninemia increases the number of inflammatory cells, induces oxidative damage in liver and brain [10, 11] and reduces energy metabolism in the central nervous system [10, 12]. However, the pathophysiology of methionine induced inflammatory alterations remains to be elucidated.

In inflammatory conditions, many cell types release nucleotides such as ATP into the extracellular space [13]. Extracellular ATP is a molecule with pro-inflammatory and immunostimulatory functions contributing to sustained inflammation and the initiation of an immune response [14, 15]. The breakdown product of ATP, adenosine has anti-inflammatory and immunosuppressor effect by activating receptor expressed in many immune cells [16]. The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDases) and adenosine deaminase (ADA) enzymes have crucial roles in the duration and magnitude of purinergic signaling in inflammatory and immune cells through the conversion of ATP and ADP to AMP and adenosine to inosine, respectively [17, 18]. Together these enzymes are responsible for controlling the extracellular concentrations of ATP and adenosine contributing to the maintenance of tissue integrity by regulating an inflammatory and immune process [17, 19].

Data from the literature have also shown that cholinergic signaling can also modulate many aspects of inflammatory and immune responses [20]. Signaling induced by acetylcholine can affect cytokine production and immune cell proliferation [21]. The effect induced by acetylcholine is correlated with the essential role of enzymes such as acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). In fact, alterations in the activities of these enzymes on many pathological conditions have suggested that BuChE and AChE could be a major marker of lower grade systemic inflammation [22, 23].

The inflammatory process is a normal protective response of a variety of cells and tissue and the main function of inflammation is to remove injured cells and tissues, as well as repair them [24]. Decompensated inflammatory response results in cell and tissue damage, which is associated with chronic inflammation and various human chronic diseases [24]. The crucial role of B lymphocytes in immunity has been attributed to the production of antibodies [25]. They were also shown to present T cell antigens and to secrete cytokines such as IL-6, thereby acting as positive regulators in immune responses and inflammatory process [25].

In this context, considering that high levels of Met and MetO are found in plasma of hypermethioninemic patients, the aim of the present study to evaluate the acute and chronic effects of Met and/or MetO in the enzymes of the purinergic and cholinergic system in lymphocytes and serum of young rats. The levels of the C-reactive protein and cytokine IL-10 were also evaluated.

2. Material and Methods

Chemicals

Nucleotides, Trizma base, Ficcoll – Histopaque, adenosine, acetylcholine, butyrylcholine, methionine (Met) and methionine sulfoxide (MetO) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and the highest purity.

Animals

Wistar rats were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. The animals were maintained at a constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation from the Federal University of Pelotas, Brazil (protocol under number: CEEA 3527).

Acute treatment with Methionine and/or Methionine sulfoxide

Forty rats (30 days) were used for the acute treatment which were divided in four groups (n=10 each) as follows: Group I (control); Group II (treated with Met 0.4g/kg); III (treated with MetO 0.1g/kg) and IV (treated with Met 0.4 g/kg + MetO 0.1g/kg) [26]. The rats received a single subcutaneous injection of Met and/ or MetO and control rats received an equivalent volume of saline. Five animals from each group were submitted to euthanasia 1 h after injection, while the other five animals from each group were submitted to euthanasia 3 h after treatment [26]. In both cases, the blood was collected for lymphocyte and serum preparation and biochemical assays (Figure 1 A).

Chronic treatment with Methionine and/or Methionine sulfoxide

Twenty-four rats were used for the chronic treatment, divided into four groups (n= 06 each) as follow: Group I (control); Group II (treated with Met); III (treated with MetO) and IV (treated with Met + MetO). The doses of Met and MetO administered to the animals were chosen in order to induce high plasma levels similar to those found in patients affected by hypermethioninemia [26]. Met and MetO were administered subcutaneously twice a day with an interval of 8 h between injections to rats from the 6th to the 28th day of life as described by Stefanello et al. (2007) [26]. Animals in group II or III received 0.2 g/kg of Met or 0.05 g/kg of MetO during the first 8 days of treatment, 0.3 g/kg of Met or 0.075 g/kg of MetO from day 15th to 21th, and 0.4 g/kg of Met or 0.1 g/kg of MetO from day 22th to 28th. Animals in group IV received the combination of Met and MetO, while control rats (group I) received saline solution in the same volumes. After the time of treatment was up all the animals were

submitted to euthanasia and blood was collected for lymphocytes and serum preparation and biochemical assays (Figure 1 B).

Isolation of lymphocytes from whole blood

Mononuclear leukocytes were isolated from blood collected with EDTA anticoagulant and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum (1968) [27]. Although the methodology described is employed for separating mononuclear cells, the study performed by Jaques et al. (2011) [28] demonstrated that there is a high incidence of lymphocytes (95%) in these samples and the amount of monocytes is practically insignificant. For this reason we treat the samples as lymphocyte preparation.

Serum preparation

Blood was collected in tubes without anticoagulant and centrifuged at 2500 x g for 15 min at room temperature. The clot was removed and the resulting serum was stored at -80°C and used for the biochemical determinations.

Enzymatic assays in lymphocytes

After lymphocyte isolation, NTPDase activity was determined as described by Leal et al. (2005) [29] where the reaction medium contained 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM the Tris HCl buffer pH 8.0, at a final volume of 200 µL. Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution were added to the reaction medium (2-4 µg of protein) and pre-incubated for 10 min at 37°C and incubation was conducted for 70 minutes. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mM and stopped with 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986) [30] using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Adenosine deaminase activity was measured in lymphocytes by the method of Giusti and Gakis (1971) [31]. Briefly, ammonia reacts in the presence of the catalyst sodium nitrosylpentacyanoferrate (III) with hypochlorite and phenol, under alkaline conditions, to form the intense blue indophenol. The ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indophenol at 650 nm (620-650nm). The reaction catalyzed by ADA is interrupted at the end of the incubation period (60 min/37°C) by the addition of a nitroprusside and phenol solution. The specific activity is reported as U/L. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia from adenosine per minute at standard assay conditions.

AChE activity in lymphocytes was determined as described by the colorimetric method of Ellman et al. (1961) [32] modified by Fitzgerald and Costa (1993) [33]. The reaction mixture was composed of 1.0 mM acetylthiocholine, 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) and 100 μ L of the intact mononuclear cells suspended in saline solution were added to the reaction. The proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg/mL. The absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm before and after incubation for 30 min at 27°C. All samples were run in triplicate and the activity of lymphocyte AChE was expressed as μ mol/h/mg of protein.

Enzymatic assays in serum

ADA activity in serum was determined according to Guisti and Galanti (1984) [34] as described above. BUCHE activity was also determined in serum by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961) [32]. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25°C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM butyrylthiocholine iodide (BuSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in μ mol BuSCh/h/mg of protein.

Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using serum albumin as standard [35].

Cytokine and C-reactive protein (CRP) quantification

Cytokine quantity was assessed by ELISA using commercial kits for IL-10 (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. The presence and concentration of cytokine were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader.

Serum CRP values were determined from samples analyzed by high-sensitivity latex-enhanced nephelometry on a BN II Nephelometer (Dade Behring, Siemens). The assay used monoclonal anti-CRP antibodies and a calibrator that was traceable to the World Health Organization (WHO) reference material. The mean replicate coefficient of variation for the assay is 6.4%.

Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Duncan multiple range test, and $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in the analysis. All data were expressed as mean $\pm$ SEM.

3. Results

In the acute protocol the results showed that MetO or an association of Met plus MetO treatment altered the NTPDase and ADA activities in the lymphocytes of young rats. One hour after the amino acids were administered, ATP hydrolysis was decreased in the animals treated only with MetO or Met plus MetO compared to the control group ($P < 0.05$, Figure 2). However, no alterations were observed in the ADP hydrolysis one hour after the treatment in the groups evaluated in this study (Figure 2). On the other hand, after 3h the ATP and ADP hydrolysis was increased in the group treated with MetO and in the group treated with Met plus MetO when compared to the control group ($P < 0.05$, Figure 2). It is important to observe that acute Met administration did not alter the NTPDase activity in lymphocytes (Figure 2). In addition, no alterations were detected in the ADA activity 1h

after the treatment with Met and /or MetO in lymphocytes from young rats (Figure 3). After 3h only MetO administration increased the ADA activity in lymphocytes when compared to other groups (Figure 3, $P<0.05$). In the chronic treatment no changes were observed on the NTPDase and ADA activities of the lymphocytes and serum of rats treated with Met and/or MetO as shown in figure 4 and table 1.

AChE activity in lymphocytes was also altered in acute and chronic treatment with Met and/or MetO. No changes were observed in the AChE activity in lymphocytes 1h after the administration of Met and/or MetO (Figure 5). On the other hand, increased AChE activity was observed in lymphocytes 3h after the administration of the MetO or Met plus MetO when compared to the control group ($P<0.05$; Figure 5B). Similar results were observed in the chronic protocol. MetO and Met plus MetO administration also caused a significant increase in the AChE activity in lymphocytes (Figure 5C, $P<0.05$). Our results also showed that 1h after the administration of Met and/or MetO the BuChE activity was decreased in serum in all groups treated (Met, MetO and Met plus MetO) (Table 1, $P<0.05$). Similarly, the activity of this enzyme was also decreased in the serum 21 days after the animals were treated only with MetO or an association of Met and MetO compared to the control group ($P<0.05$, Table 1).

In relation to the CRP in serum, no changes were observed in an acute protocol (Figure 6 A and B). However, 21 days after the treatment, an increase was observed in the levels of CRP in serum of rats treated with MetO or association of Met plus MetO ($P<0.05$, Figure 6C).

Figure 7 exhibits the results obtained for IL-10 levels in serum of the animals in the chronic protocol. As can be observed, IL-10 levels were decreased in animals treated with Met, MetO and Met plus MetO when compared to the control group ($P<0.05$).

3. Discussion

In the present study we evaluated the effects of acute and chronic hypermethioninemia in lymphocytes and serum from young rats. The hypermethioninemia model used was described by

Stefanello et al. (2007), who produced a template that induced high plasma levels of Met or MetO similar to those found in hypermethioninemic patients [26, 36].

The first time, we evaluated the effects of hypermethioninemia on the inflammatory parameters such as levels of CRP and IL-10. CRP is produced by liver and serum level increases in acute inflammatory processes. CRP production begins 6-8 h after exposure to the inflammatory agent [37], which explains the maintenance of normal levels of this protein in the acute protocol. In addition, CRP production requires stimulation by cytokines released during the inflammatory process, particularly IL-6, IL-1 and TNF-alpha [37-40]. Along these lines, CRP levels may be low or normal for the first 12 hours after the inflammatory process begins [41]. In this line, our results showed an increase in CRP levels in animals treated with MetO and Met plus MetO demonstrating the presence of inflammation in chronic hypermethioninemia.

Indeed, our findings also showed a reduced level of IL-10 in the chronic protocol (Figure 7). IL-10 is the most important anti-inflammatory cytokine of the immune system and acts by suppressing the release of a variety of pro-inflammatory molecules [42, 43]. This cytokine is produced by many cell types such as CD4+, Th1, B lymphocytes, eosinophils, monocytes and macrophages [44]. In this context, the decrease in the levels of this anti-inflammatory cytokine supports the idea that high levels of Met or MetO may contribute to the disruption of inflammatory response development in hypermethioninemic patients.

In this study we evaluated the role of purinergic signaling in inflammation associated with hypermethioninemia. Our results showed that acute administration of MetO or association of Met plus MetO induces significant changes in adenine nucleotide hydrolysis in the peripheral blood lymphocytes. ATP and ADP exhibited different hydrolysis profiles at 1 and 3 h after administration of the amino acids (Figure 2). On the other hand, NTPDase and ADA activities were not altered in chronic model hypermethioninemia. Although we cannot precisely explain this difference, Stefanello et al. (2007) [26] showed that maximal plasma Met concentrations were obtained 15 min after a single administration of the Met, gradually decreasing after this time, but remained high for at least 6 h. We can therefore speculate that these differences could be attributed to Met metabolism, since this amino acid can be easily oxidized into MetO, and its reduction by methionine sulfoxide reductase could

represent an antioxidant system [45]. Besides, MetO could be metabolized into homocysteic acid and methionine sulfone suggesting that other metabolites interfere with our results.

NTPDase plays a special role in the extracellular conversion of ATP and ADP to AMP [46]. In addition, ADA is responsible for controlling the extracellular concentrations of adenosine [46]. These enzymes act as a checkpoint that determines whether the extracellular environment is proinflammatory (ATP mediated responses) or anti-inflammatory (adenosine mediated responses) [16, 17, 19, 47, 48].

In our study, no changes were observed in NTPDase and ADA activities from lymphocytes of animals treated with Met, demonstrating that these enzymes are more susceptible to MetO. The reduction in NTPDase activity 1 h after treatment suggests that MetO is responsible for the activation of the inflammatory response with the accumulation of ATP, a pro-inflammatory molecule, in the extracellular milieu. Therefore, the upregulation of NTPDase activity in lymphocytes 3 h after the administration of MetO and Met plus MetO may be responsible for decreasing the ATP levels contributing to adenosine production. However, it is important to note that MetO also increased the ADA activity. This alteration can promote the reduction of adenosine levels, and in this manner impairs the adenosine action via P1 receptors contributing to inflammatory complications in hypermethioninemia.

Considering the intrinsic relationship between purinergic signaling and inflammation [13, 16, 17, 19, 47, 48], our findings raise important questions about molecular mechanisms involved in the pathophysiology of hypermethioninemia. We suggest that these findings are more relevant clinically when considering that MetO, a metabolite of Met, can modulate the activity of the crucial enzymes involved in the inflammatory and immune process in a short time.

In the next set of experiments we evaluated the effects of Met and MetO administration on the cholinergic signaling. Lymphocytes express a complete cholinergic system consisting of acetylcholine, muscarinic and nicotinic receptors, choline acetyltransferase and AChE enzymes [20, 33, 49]. Acetylcholine is a molecule known to have anti-inflammatory actions and to suppress the production of pro-inflammatory cytokines and the AChE enzyme is a key contributor towards sustaining these effects [21, 22].

Our results showed that MetO or Met plus MetO administration increased AChE activity in lymphocytes of young rats (Figure 5B and C). This effect may decrease the acetylcholine levels in the extracellular medium contributing to the onset of low grade inflammation [22]. Taken together our findings demonstrated that both cholinergic and purinergic signaling are altered in lymphocytes of hypermethioninemic rats. These mechanisms can be associated, at least in part, with the alterations in the levels of CRP and IL-10 observed in this study (Figure 6 and 7).

An important aspect to be discussed is that patients with MAT enzyme deficiency have a decreased or absent production of SAM which could lead to a decrease in acetylcholine synthesis, favoring a proinflammatory environment [50]. SAM is the major donor of methyl groups to the cell reactions methyltransferases, including biomolecule formation, such as acetylcholine [51, 52]. In addition, studies have demonstrated that the exogenous SAM administration appears to exert an anti-inflammatory effect by increasing the synthesis and gene expression of IL-10 in an LPS - stimulated macrophage lineage [53].

We also showed that BuChE activity was decreased in serum 1 h or 21 days after the administration of Met and/or MetO (Table 1). Increased BuChE activity has been described in many pathological conditions in which low grade systemic inflammation can be associated [22, 23]. Corroborating our findings, Zivkovic et al. (2015) [54] also demonstrated a decrease in the activity of this enzyme in patients with severe systemic inflammation. BuChE is the main acetylcholine hydrolyzing enzyme in plasma and is synthesized and secreted into blood by the liver [55]. Considering that serum BuChE levels decrease in liver dysfunction as consequence of reduced synthesis, it is possible that alterations in this enzyme activity observed in our study are associated with hepatic dysfunctions caused by Met or MetO administration as previously reported [11, 36].

Previous studies also have demonstrated alterations in inflammatory markers in other inborn errors of metabolism (IEM). Meng et al. (2013) showed that hyperhomocysteinemia increased the pro-inflammatory gene expression. These authors observed an expression of transcription factors that induce monocyte differentiation and consequent mediated inflammation [56]. Cunha et al, (2012), showed a significant increase in pro-inflammatory cytokines in the brain of rats submitted to a hyperhomocysteinemia chronic model [57, 58]. Scherer et al. (2012) also showed that

hyperhomocysteinemia alters ectonucleotidase activities and gene expression of 5'-nucleotidase in rat lymphocytes [59].

Hypermethioninemia can lead to serious brain and liver complications. The symptoms of acute onset are not specific which makes it difficult to diagnose [60, 61]. However, early diagnosis facilitates the choice of appropriate therapeutic measures leading to an improvement of the clinical conditions of patients [60, 61]. Therefore, it is important to search for possible clinical markers to facilitate the diagnosis and immediate treatment of hypermethioninemia.

In conclusion, our data showed that Met and/or MetO exposure alter both purinergic and cholinergic signaling in lymphocytes and serum of rats and these mechanisms could be associated with an increase in CRP levels and decrease in IL-10. The findings described here improve our understanding of the mechanisms underlying complications associated with hypermethioninemia and open the doors to the discovery of a more specific target for the treatment and development of new therapies for patients with this IEM.

5. References

- [1] Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataullakhanov FI (2010) The logic of hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim Biophys Acta* 1804:86-96.
- [2] Bottiglieri T (2002) S-Adenosyl-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside molecular basis of a pleiotropic molecule. *Am J Clin Nutr* 76:1151S-1157S.
- [3] Forujo M, Kinoshita M, Nagao M, Kubo T (2012) Methionine adenosyltransferaseI/III deficiency: Neurological manifestations and relevance of S-adenosylmethionine. *Mol Genet Metab* 107:253-256.
- [4] Finkelstein JD (2006) Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. *J Nutr* 136:1750S–1754S.
- [5] Tchantchou F, Shea TB (2008) Folate deprivation, the methionine cycle, and alzheimer's disease. *Vitam Horm* 79:83-97.
- [6] Mudd SH, Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Minniti G, Caruso U, Lorini R, Watkins D, Matiaszuk N, Rosenblatt DS, Schwahn B, Rozen R, Legros L, Kotb M, Capdevila A, Luka Z, Finkelstein JD, Tangerman A, Stabler SP, Allen RH, Wagner C (2001) Glycine N-methyltransferase deficiency: a novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. *J Inherit Metab Dis* 24:448-64.
- [7] Yamada H, Akahoshi N, Kamata S, Hagiya Y, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Takano N, Mori M, Ishizaki Y, Izumi T, Kumagai Y, Kasahara T, Suematsu M, Ishii I (2012) Methionine excess

in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathione γ -lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic Biol Med* 52:1716-1726.

[8] Vogt W (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* 18:93-105.

[9] Saunders C, Stites W (2012) An electrophoretic mobility shift assay for methionine sulfoxide in proteins. *Anal Biochem* 421:767-769.

[10] Stefanello FM, Chiarani F, Kurek AG, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse ATS (2005) Methionine alters Na⁺,K⁺-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 23:651-656.

[11] Stefanello FM, Matté C, Pederzoli CD, Kolling J, Mescka CP, Lamers ML, de Assis AM, Perry ML, dos Santos MF, Dutra-Filho CS, Wyse ATS (2009) Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. *Biochimie* 91:961-968.

[12] Streck EL, Zugno AI, Tagliari B, Wannmacher C, Wajner M, Wyse AT (2002) Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Metab Brain Dis* 17:83-91.

[13] Bours M, Swennen E, Di Virgilio F, Cronstein B, Dagnelie P (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112:358-404.

[14] Idzko M, Ferrari D, Etschig H (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509:311-317.

[15] Morandini A, Savio L, Coutinho-Silva R (2014) The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. *Biomed J* 37:169-177.

[16] Antonioli L, Csóca B, Fornai M, Colucci R, Kókai E, Blandizzi C, Haskó G (2014) Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov Today* 19:1051-1066.

[17] Antonioli L, Pacher V, Vizi ES, Haskó G (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 19:355-367.

[18] Kanthi Y, Sutton N, Pinsky D (2014) CD39: interface between vascular thrombosis and inflammation. *Curr Atheroscler* 16:425.

[19] Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Da Settimo F, Natale G, Kastsiuchenka O, Duranti E, Viridis A, Vassalle C, La Motta C, Mugnaini L, Breschi MC, Blandizzi C, Del Tacca M (2007) Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 332:435-442.

[20] Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* 74:675-96.

[21] Silva-Herdade A, Saldanha C (2013) Effects of the acetylcholine on an animal model of inflammation. *Clin Hemorheol Micro* 53:209-216.

- [22] Das U (2007) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 13:214-221.
- [23] Rao A, Sridhar G, Das U (2007) Elevated Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzhmeirs disease. *Med Hypothesis* 69:1272-1276.
- [24] Sánchez A, Calpena AC, Clares B (2015) Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci* 16:16981-17004.
- [25] Ding Tingting, Yan Fan, Cao Shui, Ren Xiubao (2015) Regulatory B cell: New member of immunosuppressive cell club. *Hum Immunol* 76:615–621.
- [26] Stefanello FM, Matté C, Scherer EB, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse ATS (2007) Chemillically induced model of hypermethioninemia in rats. *J Neurosci Methods* 160:1-4.
- [27] Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 97:77–89.
- [28] Jaques JA, Peres Rezer JR, Ruchel JB, Gutierrez J, Bairros AV, Gomes Farias IL, Almeida da Luz SC, Mello Bertoncheli CD, Chitolina Schetinger MR, Morsch VM, Leal DB (2011) A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. *Anal Biochem* 410:34-39.
- [29] Leal DB, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CA, da Silva JE, Morsch VM, Schetinger MR (2005) Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ectoapyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1721:9-11.
- [30] Chan K, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375-8.
- [31] Giusti G, Gakis C (1971) Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 12:417-25.
- [32] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.
- [33] Fitzgerald FB, Costa LG (1993) Modulation of muscarinic receptors an acetylcholinesterase activity in lymphocytes and brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* 20:210-6.
- [34] Giusti G, Galanti B (1984) Colorimetric Method. Adenosine deaminase In: Bergmeyer HU, (ed). *Methods of enzymatic Analysis*. 3rd ed Weinheim: Verlag chemie, pp. 315-3233.
- [35] Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

- [36] Costa MZ, Silva TM, Flores NP, Schmitz F, Scherer EBS, Viau CM, Saffi J, Barschak AG, Wyse AT, Spanevello RM, Stefanello FM (2013) Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol Cell biochem* 384:21-28.
- [37] Clyne B, Olshaker JS (1999) The C-reactive protein. *J Emerg Med* 17:1019-1025
- [38] Kolb-Bachofen V (1991) A review on the biological properties of C-reactive protein. *Immunobiol* 183:133-145.
- [39] Jape D (1996) The acute phase response and laboratory testing. *Aust Fam Phys* 25:324-329.
- [40] Bode JG, Albrecht U, Häussinger D, Heinrich PC, Schaper F (2012) Hepatic acute phase proteins-Regulation by IL-6 and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol* 91:496-505.
- [41] Aguiar FJB, Ferreira-Junior M, Sales MM, Cruz-Neto LM, Fonseca LAM, Sumita NM, Duarte NJC, Lichtenstein A, Duarte AJS (2013) C-Reactive protein: clinical applications and proposals for a rational use. *Rev Assoc Med Bras* 59: 85-92.
- [42] Lalani J, Bhol K, Ahmed A (1997) Interleukin 10: Biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79:469-484.
- [43] Couper K, Blount D, Riley E (2008) IL-10 – The master regulation of immunity to infection. *J Immunol* 180:5771-5777.
- [44] Hedrich C, Bream J (2010) Cell Type specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunol Res* 47:185-206.
- [45] Lee BC, Gladyshev VN (2011) The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry. *Free Radic Biol Med* 50:221-227.
- [46] Yegutkin GG (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:473-497.
- [47] Kannan S (2002) E-NTPase/NPTDase: potential role as a regulatory element in inflammation. *Med Hypotheses* 58:266-267.
- [48] Szabo C, Pacher P (2012) The Outsiders: emerging roles of ectonucleotidases in inflammation. *Sci Transl Med* 4:1-4.
- [49] Kawashima K, Fujii T (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86:29-48.
- [50] Mudd SH (2011) Hypermethioninemias of Genetic and Non-Genetic Origin: A Review. *Am J Med Genet Part C (Seminars in Medical Genetics)* 157:3-32.
- [51] Finkelstein JD (1990) Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1:228-237.
- [52] Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC (2008) Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr* 28:273-293.

- [53] Song S, Barve T, Chen W, Nelson S, Uriarte D, Hill C, Clain MC (2003) S-Adenosylmethionine (AdoMet) modulates endotoxin stimulated interleukin-10 production in monocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G949-G955.
- [54] Zivkovic A, Schmit K, Sigl A, Decker S, Brenner T, Hofer S (2015) Reduced serum butyrylcholinesterase activity indicates severe systemic inflammation in critically ill patients. *Mediators inflamm* 2015:1-12.
- [55] Santarpia L, Grandone J, Franco C, Pasanisi F (2013) Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *J Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 4:31-39.
- [56] Meng S, Ciment S, Jan M, Tran T, Pham H, Cueto R, Yang X, Wang H (2013) Homocysteine induces inflammatory transcriptional signaling in monocytes. *Front Biosci* 18:685-695.
- [57] Cunha AA, Ferreira AG, Loureiro SO, da Cunha MJ, Schmitz F, Netto CA, Wyse AT (2012) Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats. *Neurochem Res* 37:1660-1669.
- [58] Holven KB, Aukrust P, Retterstol K, Hagve TA, Mørkrid L, Ose L, Nenseter MS (2006) Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic patients. *Scand J Clin Lab Invest* 66:45-54.
- [59] Scherer EBS, Savio LEB, Vuaden FC, Ferreira AGK, Bogo MR, Bonan C D, Wyse ATS (2012) Chronic mild hyperhomocysteinemia alters ectonucleotidase activities and gene expression of ecto-5'-nucleotidase /CD73 in rat lymphocytes. *Mol Cell Biochem* 362:187-194.
- [60] Mudd SH, Levy HL, Tangerman A, Boujet C, Buist N, Davidson-Mundt A, Hudgins L, Oyasnagi K, Wilson WG (1995b) Isolated persistent hypermethioninemia. *Am J Med Genet* 57:882-892.
- [61] Couce ML, Bóveda MD, García-Jiménez C, Balmaseda E, Vives I, Castiñeiras DE, Fernández-Marmiesse A, Fraga JM, Mudd SH, Corrales FJ (2013) Clinical and metabolic findings in patients with methionine adenosyltransferase I/III deficiency detected by newborn screening. *Mol Genet Metab* 110:218-221.

Legend of figures

Figure 1 – Experimental acute (A) and chronic (B) protocol of Met and/or MetO administration.

Figure 2 – NTPDase activity using ATP and ADP as substrate in lymphocytes of young rats 1h and 3h after administration of methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). Bars represent mean $\pm$ SEM. Results are expressed in nmol Pi/min/mg of protein. *Different from the other groups ($P < 0.05$, with $n = 05$).

Figure 3 – Adenosine deaminase activity in lymphocytes the young rats 1h and 3h after the administration of methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). Bars represent mean $\pm$ SEM. Results are expressed in nmol Pi/min/mg of protein. *Different from the others groups ($P < 0.05$, with $n = 05$).

Figure 4 – ATP, ADP and adenosine hydrolysis in lymphocytes from rats 21 days after treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). Bars represent mean $\pm$ SEM. Results of NTPDase activity are expressed in nmol Pi/min/mg of protein and ADA activity in U/L ($n = 06$).

Figure 5 – Acetylcholinesterase activity in lymphocytes from young rats 1h (A), 3h (B) and 21 days (C) after treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). Bars represent mean $\pm$ SEM. Results are expressed in $\mu\text{mol AcSch/h/mg}$ of protein. ($n = 6$). *Different from control ($P < 0.05$, with $n = 5 - 6$).

Figure 6 – C reactive protein (CRP) in serum the young rats 1h (A), 3h (B) and after 21 days (C) after treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). Bars represent mean $\pm$ SEM. Results are expressed in mg/L ($n = 6$). *Different from control ($P < 0.05$, with $n = 5 - 6$).

Figure 7 – IL-10 levels in serum from young rats 21 days after treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). Bars represent mean $\pm$ SEM. Results are expressed in pg/mL ($n = 6$). *Different from control ($P < 0.05$, with $n = 06$).

Table 1 – Adenosine deaminase (ADA) and Butyrylcholinesterase (BuChE) activities in serum of rats 1h, 3h and 21 days after treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. *Different from control ($P < 0.05$, with $n = 5-6$).

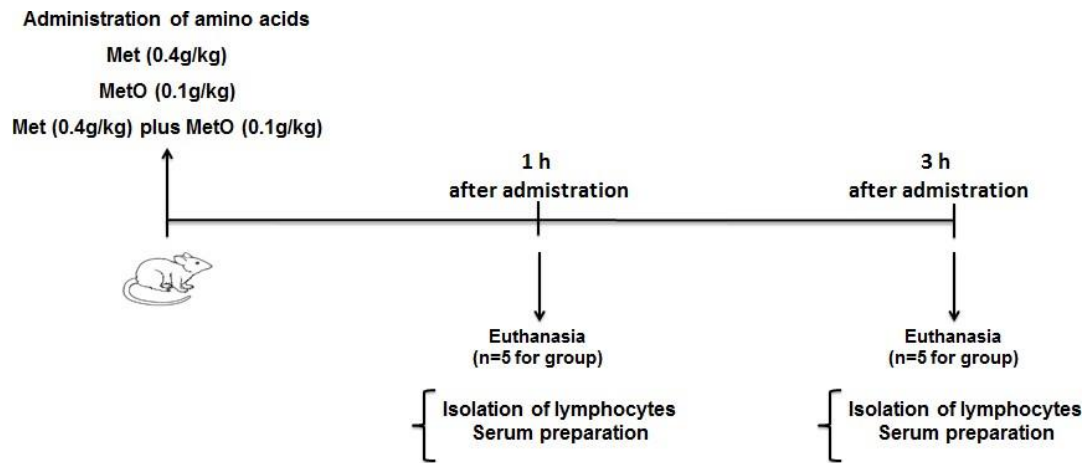


Figure 1A

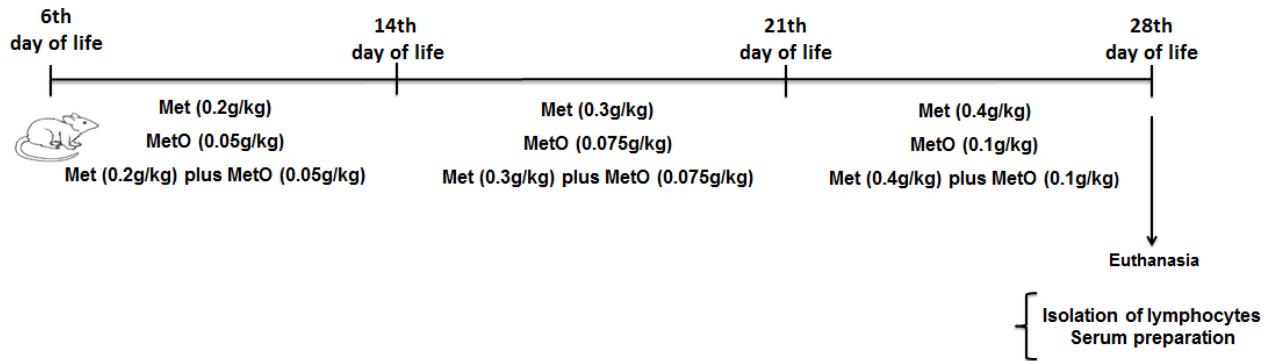


Figure 1B

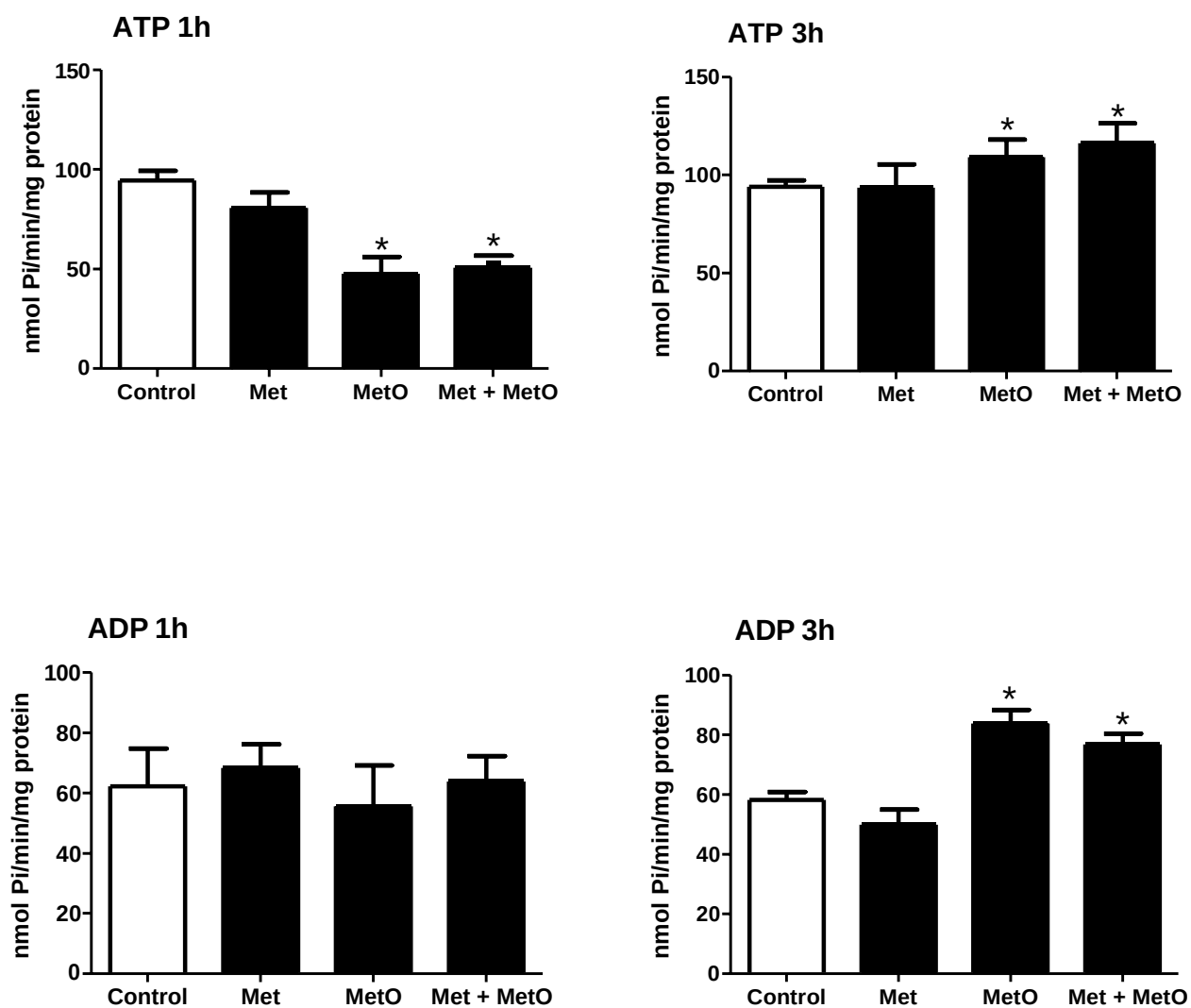


Figure 2

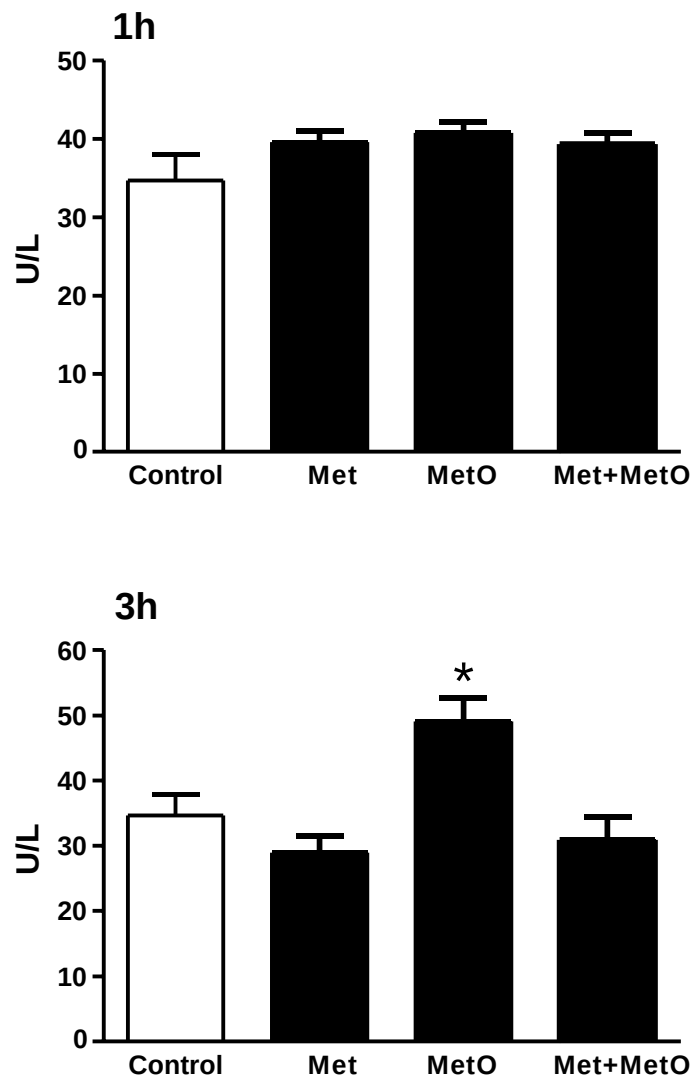


Figure 3

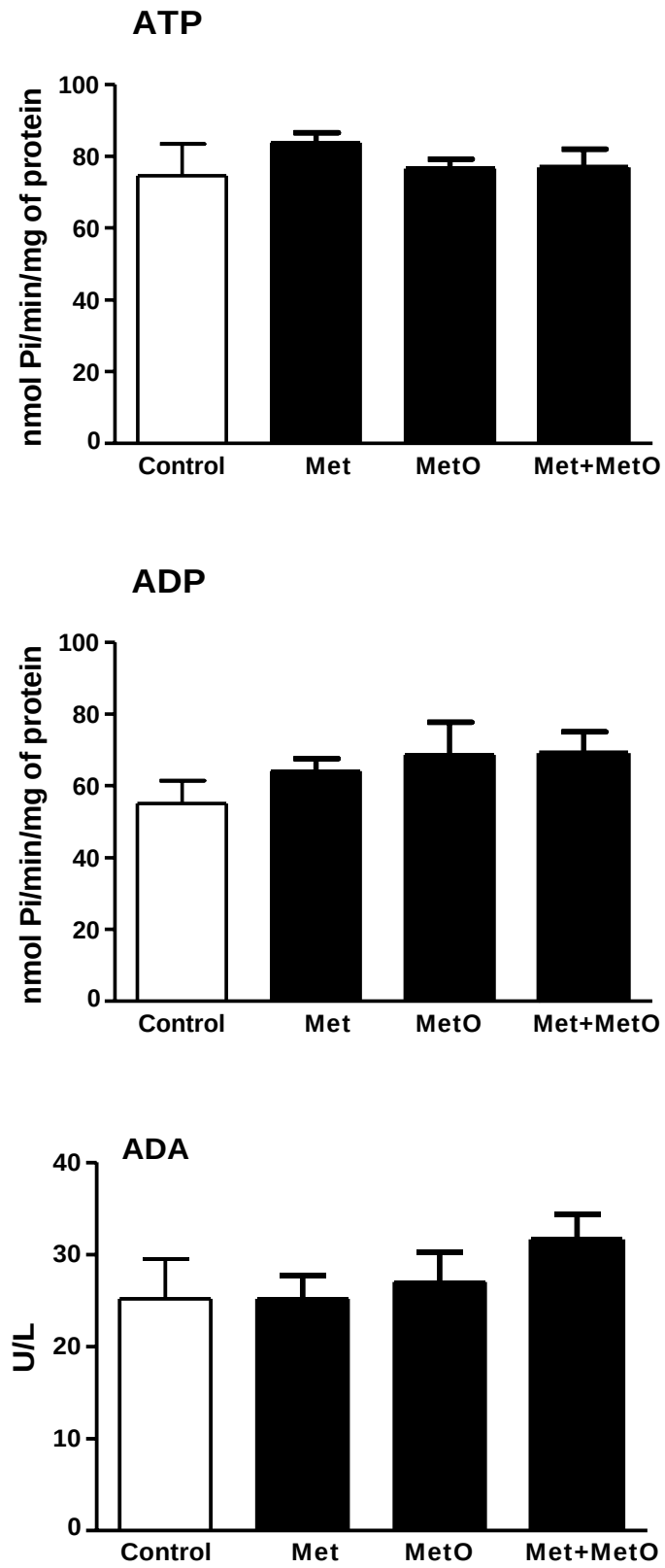


Figure 4

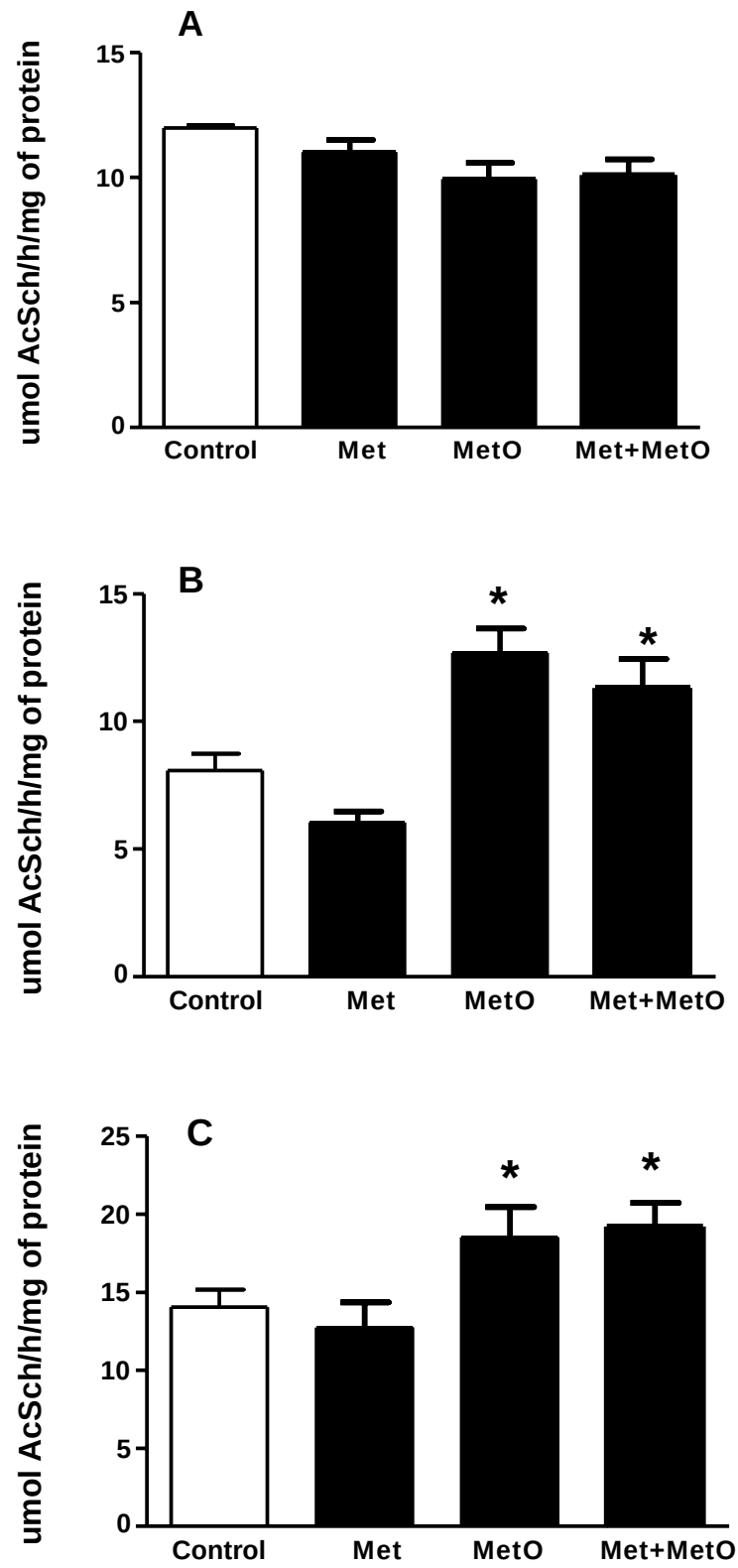


Figure 5

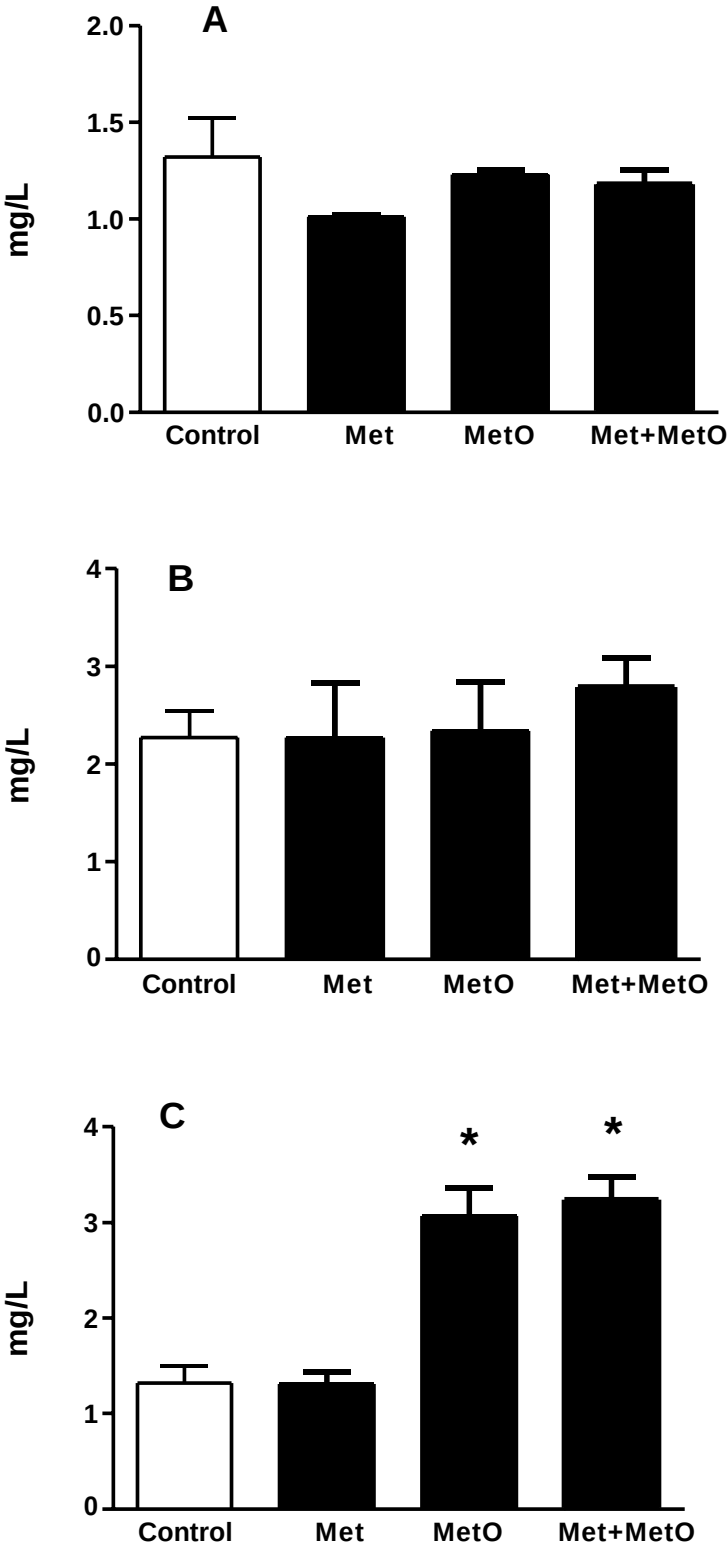


Figure 6

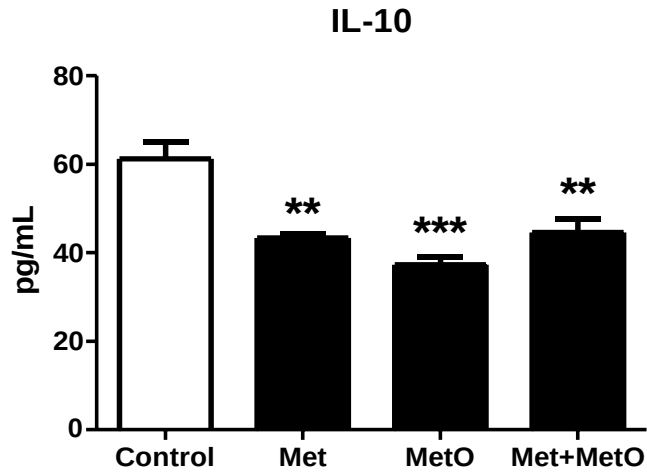


Figure 7

Table 1

Groups	ADA (U/L)			BUCHE (μmol BuSCh/h/mg protein)		
	1h	3h	21 days	1h	3h	21 days
Control	14.56 $\pm$ 0.37	24.25 $\pm$ 2.76	31.11 $\pm$ 4.88	0.19 $\pm$ 0.10	0.13 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.05
Met	17.35 $\pm$ 1.57	24.52 $\pm$ 3.41	33.62 $\pm$ 4.54	0.16 $\pm$ 0.006*	0.16 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.04
MetO	16.08 $\pm$ 2.67	26.2 $\pm$ 5.32	25.38 $\pm$ 4.83	0.13 $\pm$ 0.007*	0.12 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01*
Met + MetO	20.63 $\pm$ 4.74	18.23 $\pm$ 2.54	23.96 $\pm$ 3.15	0.12 $\pm$ 0.009*	0.12 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.02*

Conclusões

O tratamento com MetO e associação de Met com MetO alterou a sinalização purinérgica em linfócitos de ratos jovens. As enzimas NTPDase 1 e ADA exibiram diferentes perfis de atividade após 1 e 3 horas e 21 dias da administração dos aminoácidos. Essas diferenças podem ser atribuídas ao metabolismo da Met, uma vez que este aminoácido pode ser facilmente oxidado a MetO. Além disso, MetO pode ser metabolizado em ácido homocisteico e metionina sulfona sugerindo assim, que estes metabólitos podem também ter interferido nos resultados.

Não foram observadas alterações na atividade das enzimas NTPDase e ADA em animais tratados somente com Met, demonstrando que essas enzimas são mais sensíveis ao efeito do metabólito MetO. MetO modula a atividade dessas enzimas de forma aguda, contribuindo para alterações nos níveis extracelulares de ATP e adenosina favorecendo um quadro pró-inflamatório.

A atividade da enzima acetilcolinesterase aumentou em linfócitos de ratos após 3 horas e 21 dias de tratamento com MetO e associação de Met com MetO o que poderia levar a diminuição de acetilcolina no meio extracelular, uma molécula que possui potentes atividades anti-inflamatórias. Dados da literatura têm demonstrado que o tratamento Met e MetO causa várias alterações hepáticas. Desta forma a diminuição da atividade da BuChE no soro pode ser devido aos danos fígado, uma vez que essa enzima é sintetizada por este órgão.

Níveis séricos aumentados de proteína-C reativa e níveis diminuídos de IL-10 confirmam a presença de inflamação associada à hipermetioninemia. Os resultados demonstrados neste trabalho podem ser importantes para elucidar os mecanismos envolvidos em complicações associadas a hipermetioninemia contribuindo para a busca de terapias mais específicas que podem beneficiar portadores deste erro inato do metabolismo

Referências

ABBAS, A. K. ; LITCHMAN, A.H. **Imunologia Básica- Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. Brasil: Elsevier, 2008. 354 pg.

ANFOSSI, G.; RUSSO, I.; MASSUCCO, P.; MATTIELLO, L.; CAVALOT, F.; BALBO, A.; TROVATI, M. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through nitric oxide: possible role in its antiaggregating effect. **Thrombosis Research**, v. 105, n. 1, p. 71-78, 2002.

ALMEIDA, J. P. L.; SADANHA, C. Non-neuronal cholinergic system in human erythrocytes: Biological role clinical relevance. **Journal Membrane Biology**, v.234, n. 3, p. 227-234, 2010.

ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. Reflex principles of immunological homeostasis. **Annual Review of Immunology**. v. 30, n. 1, p. 313-335, 2012.

ANTONIOELLI, L.; CSÓKA, B.; FORNAI, M.; COLUCCI, R.; KÓKAI, E.; BLANDIZZI, C.; HASKÓ, G. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1051-1066, 2014.

ARAÚJO, M. C.; ROCHA, J. B. T.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, n. 3, p. 421-426, 2005.

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. **Journal of Hepatology**, v. 33, n. 6, p. 907-914, 2000.

BAGATINI, M.; MARTINS, C.; BATTISTI, V.; SPANEVELLO, R.; GASPARETTO, D.; ROSA, C.; GONÇALVES, J.; SCHETINGER, M.; SANTOS, R.; MORSCH, V. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v.41, n. 14-15, p. 1181-1185, 2008.

BALESTIERI, F.M.P. **Imunologia**. Manole, 2005. 840pg.

BARIĆ, I.; FUMIĆ, K.; HOFFMANN, G. F. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. **Croatian Medical Journal**, v. 42, n. 4, p. 379-383, 2001.

BENEVENGA, N. J.; STEELE, R. D. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. **Annual Review Nutrition**, v. 4, n.1, p. 157-81, 1984.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**, Basingstoke: 7th edition. W. H. Freeman and Company, New York, 2012. Figure 10.25.

BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. **Enzyme**, v. 38, n. 1-4, p. 14-26, 1987.

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: ATP Release. **Neurochemistry**, v. 26, n. 8-9, p. 959-969, 2001.

BOURS, M. J.; SWENNEN, E. L.; DI VIRILIO, F.; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BURNSTOCK G. Purinergic signalling-an overview. **Novartis Foundation Symposia**, v. 276, n. 1, p. 26-48, 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential The Keio Journal of Medicine, v. 62, n. 3, p. 63-73, 2013.

CHAMBERLIN, M. E.; UBAGAI, T.; MUDD, S. H.; WILSON, W. G.; LEONARD, J. V.; CHOU, J. Y. Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 4, p.1021-7, 1996.

CHIEN, Y. H.; CHIANG, S. C.; HUANG, A.; HWU, W. L. Spectrum of hypermethioninemia in neonatal screening. **Early Human Development**, v. 81, n. 6, p. 529-533, 2005.

CLYNE, B.; OLSHAKER, J. S. The C-reactive protein. **The Journal of Emergency Medicine**, v 17, n. 6, p. 1019-1025, 1999.

COKUGRAS, A. N.; TEZCAN, E. F. Amitriptyline: a potent inhibitor of butyrylcholinesterase from human serum. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p.835-838, 1997.

COSTA, M. Z.; SILVA, T. M.; FLORES, N. P.; SCHMITZ, F.; SCHERER, E. B. S.; VIAU, C. M.; SAFFI, J.; BARSCHAK, A. G.; WYSE, A. T.; SPANEVELLO, R. M.; STEFANELLO, F. M. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 384, n. 1-2, p. 21-28, 2013.

COTA, A. M.; MIDWINTER, M. J. The immune system. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 16, n.7, p. 353- 355, 2015.

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, n. 2, p. 233-239, 2008.

COUCE, M. L.; BÓVEDA, M. D.; GARCÍA-JIMÉMEZ, C.; BALMASEDA, E.; VIVES, I.; CASTIÑEIRAS, D.E; FERNÁNDEZ-MARMIESSE, A.; FRAGA, J.M.; MUDD, S.H.; CORRALES, F.J. Clinical and metabolic findings in patients with methionine adenosyltransferase I/III deficiency detected by newborn screening. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 110, n. 3, p. 218-221, 2013.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CSÓKA, B.; SELMECZY, Z.; KOSCSÓ, B.; NÉMETH, Z. H.; PACHER, P.; MURRAY, P. J.; KEPKA-LENHART, D.; MORRIS, JR., S. M.; GAUSE, W. C.; LEIBOVICH, S. J.; HASKÓ, G. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 1, p. 76–386, 2012.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 12 p. 214–221, 2007.

DELFINO, R.T.; RIBEIRO, T.S.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 407-428, 2009.

DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. **Drug Development Research**, v. 59, n. 1, p. 171–174, 2003.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience**, v. 191, n. 1, p. 117-123, 2015.

DWYER, K. M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; STROM, T. B.; ROBSON, S. C. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, v. 3, n.1-2, p. 171-80, 2007.

EL-HATTAB, A. W. Inborn Errors of Metabolism. **Clinical Perinatology**, v. 42, n. 2, p. 413-39, 2015.

ELSSNER, A.; DUNCAN, M.; GAVRILIN, M.; WEWERS, M.D. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. **Journal Immunological**, v. 172, n. 8, p. 4987-4994, 2004.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 24, p 2322-2333, 2012.

ENJYOJI, K.; SÉVIGNY, J.; LIN, Y.; FRENETTE, P. S.; CHRISTIE, P. D.; ESCH, J. S.; IMAI, M.; EDELBERG, J. M.; RAYBURN, H.; LECH, M.; BEELER, D. L.; CSIZMADIA, E.; WAGNER, D. D.; ROBSON, S. C.; ROSENBERG, R. D. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v. 5, n. 9, p. 1010-1017, 1999.

FERNÁNDEZ-IRIGOYEN, J.; SANTAMARÍA, E.; CHIEN, Y.; HWU, W. L.; KORMAN, S. H.; FAGHFOURY, H.; SCHULZE, A.; HOGANSON, G. E.; STABLER, S. P.; ALLEN, R. H.; WAGNER, C.; MUDD, S. H.; CORRALES, F. J. Enzymatic activity of methionine adenosyltransferase variants identified in patients with persistent hypermethioninemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 101, n. 2-3, p.172–177, 2010.

FERREIRA, G. K.; CARVALHO-SILVA, M.; GONÇALVES, C. L.; VIEIRA, J. S.; SCAINI, G.; GHEDIM, F. V.; DEROZA, P. F.; ZUGNO, A. I.; PEREIRA, T. C. B.; OLIVEIRA, G. M. T.; KIST, L. W.; BOGO, M. R.; SCHUCK, P. F. ; FERREIRA, G. C.;

STRECK, E. L. L-Tyrosine administration increased acetylcholinesterase activity in rats. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 8, p. 1370–1374, 2012.

FILIPPINI, A.; TAFFS R. E.; AGUI, T.; STITKOVSKY M.V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 1, p. 334-340, 1990 b.

FILIPPINI, A.; TAFFS R.E.; STITKOVSKY M. V. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 21, p. 8267-8271, 1990 a.

FINKELSTEIN, J. D. Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1750S–1754S, 2006.

FINKELSTEIN, J. D. Methionine metabolism in mammals. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 1, n. 5, p. 228-237, 1990.

GAKIS, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. **European Respiratory Journal**, v. 9, n. 4, p. 632–633, 1996.

GARLICK, P. J. Toxicity of methionine in humans. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1722S-1725S, 2006.

GESSI, S.; VARANI, K.; MERIGHI, S.; CATTABRIGA, E.; AVITABILE, A.; GAVIOLI, R.; FORTINI, C.; LEUNG, E.; LENNAN, S. M.; BOREA, P. A. Expression of A3 adenosine receptors in human lymphocytes: up-regulation in T cell activation. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 711–719, 2004.

GESSI, S.; VARINI, K.; MERIGHI, S.; FOGLI, E.; SACCHETTO, V.; BENINI, A.; LEUNG, E.; MAC-LENNAN, S.; BOREA, P. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 1-2, p. 109-116, 2007.

GIUGLIANI, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna**, v. 23, n. 1, p. 29-40, 1988.

GIUSTI, G.; GAKIS, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme**, v. 12, n. 4, p. 417-25. 1971.

GOODARZI, M.T.; ABDI, M.; TAVILANI, H.; RASHIDI, M. Adenosine deaminase activity in COPD patients and healthy subjects. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 9, n. 1, p. 7–12, 2010.

GUERRA, A.N.; FISETTE, P.L.; PFEIFFER, Z.A.; QUINCHIA-RIOS, B.H.; PRABHU, U.; AGA, M.; DENLINGER, L.C.; GUADARRAMA, A.G.; ABOZEID, S.; SOMMER, J.A.; PROCTOR, R.A.; BERTICS, P.J. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. **Journal of Endotoxin**, v. 9, n. 4, p. 256-263, 2003.

HASKÓ, G.; KUHEL, D. G.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A.; DEITCH, E. A.; MABLEY, J. G.; MARTON, A.; SZABÓ, C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 14, n.13, p. 2065-2074, 2000.

HASKÓ, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n.9, p. 759-770, 2008.

HASKÓ, G.; SZABÓ, C.; NÉMETH, Z. H.; KVETAN, V.; PASTORES S. M.; VIZI E. S. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 10, p. 4634–4640, 1996.

HENDRY, C.; FARLEY, A.; MCLAFFERTY, ELLA.; JOHNSTONE, C. Function of the immune system. **Nursing Standard**, v. 27, n.19, p. 35- 42, 2013.

HOVI, T.; SMYTH, J. F.; ALLISON, A. C.; WILLIAMS, S. C. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. **Clinical & Experimental immunology**, v. 23, n. 3, p. 395-403, 1976.

IDZKO, M.; FERRARI, D.; ETZSCHIG, H. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**, v. 509, n.7500, p. 311-317, 2014.

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 5, p. 783-797, 2012.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p.201-212, 2011.

JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Immune System – Part II Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 1, p. 29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Science**, v. 74, n. 6, p. 675-96, 2003.

KHODADADI I.; ABDI, M.; AHMADI, A.; SALEH, M.; MENBARI S.; LAHOORPOUR F. Analysis of serum adenosine deaminase (ADA) and ADA1 and ADA2 isoenzyme activities in HIV positive and HIV–HBV co-infected patients. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 980–983, 2011.

KOC, A.; GLADYSHEV, V. N. Methionine sulfoxide reduction and the aging process. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, n. 1, p. 383–386, 2007.

KOSHIBA, M.; ROSIN, D. L.; HAYASHI, N.; LINDEN, J.; SITKOVSKY, M. V. Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. **Molecular Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 614–624, 1999.

KUMMER, W.; LIPS, K. S.; PFEIL, U. The epithelial cholinergic system of the airways. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 2, p. 219–234, 2008.

LA SALA, A.; FERRARI, D.; DI VIRGILIO, F.; IDZKO, M.; NORGAEUER, J.; GIROLOMONI, G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 3, p. 339-343, 2003.

LANGSTON, H.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.; DOMBROWSKI, K.; KAPP, J.; Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen - specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 2962-2970, 2003.

LEAL, D. B.; STREHER, C. A.; BERTONCHELI, C.; CARLI, L.; LEAL, C.; SILVA, J.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 - positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1746, n. 2, p. 129-134, 2005.

LEAL, D. B.; STREHER, C. A.; NEU, T. N.; BITTENCOURT, F. P.; LEAL, C. A.; DA SILVA, J.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. Characterization of NTPDase

(NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, n. 1-3, p. 9–15, 2005.

LEVINE, R. L.; MOSKOVITZ, J.; STADTMAN, E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4-5, p. 301-307, 2000.

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.

LU, S. C.; ALVAREZ, L.; HUANG, Z. Z.; CHEN, L.; AN, W.; CORRALES, F. J.; AVILA, M. A.; KANEL, G.; MATO, J. M. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 98, n. 10, p. 5560–5565, 2001.

LU, S. C.; MATO, J. M. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 1, p. S73-S77, 2008.

LUNKES, G.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V.; MAZZANTI, C.; SCHETINGER, M. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189-194, 2003.

MALMSJÖ, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGUE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarizing factor. **European Journal of Pharmacology**, v. 390, n. 1-2, p. 173-180, 2000.

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, n. 1, p. 89-96, 2010.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31-91, 1993.

MASSOULIÉ, J.; SUSSMAN, J.; BON, S.; SILMAN, I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Progress in Brain Research**, v. 98, n. 1, p. 139-146, 1993.

MATO, J. M. M.; MARTÍNEZ-CHANTAR, M. L.; LU, S. C. Methionine Metabolism and liver disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 273-293, 2008.

MOON, H.; NA, H. Y.; CHONG, K. H.; KI, T. J. P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. **Immunology Letters**, v. 102, n. 1, p. 98-105, 2006.

MOSKOVITZ, J. Detection and localization of methionine sulfoxide residues of specific proteins in brain tissue. **Protein and Peptide Letters**, v. 21, n. 1, p. 52-55, 2014.

MUDD, S. H. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: a review. **American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)**, v. 157, n.1, p. 3-32, 2011.

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, n. 12, p. 1542-1547, 2000.

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

NIZRI, E.; BRENNER, T. Modulation of inflammatory pathways by the immune cholinergic system. **Amino Acids**, v. 45, n. 1, p. 73-85, 2013.

NIZRI, E.; HAMRA-AMITAY, Y.; SICSIC, C.; LAVON, I.; BRENNER, T. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 540-547, 2006.

OKUMA, Y.; NOMURA, Y. Roles of muscarinic acetylcholine receptors in interleukin-2 synthesis in lymphocytes. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 16-19, 2001.

OKUMA, Y.; NOMURA, Y. The non-neuronal cholinergic system roles of muscarinic acetylcholine receptors in interleukin-2 synthesis in lymphocytes. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 16-19, 2011.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n. 2, p. 255-265, 2011.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Controlling inflammation: the cholinergic antiinflammatory pathway. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 6, p. 1037-1040, 2006.

PHILLIS, J.W. Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cellular function first (1st) ed. Boca Raton, Florida, U.S.A: CRC press; 1991.

POLACHINI, C. R. N.; SPANEVELLO, R. M.; CASALI, E. A.; ZANINI, D.; PEREIRA, L. B.; MARTINS, C. C.; BALDISSARELI, J.; CARDOSO, A. M.; DUARTE, M. F.; DA COSTA, P.; PRADO, A. L. C.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. **Neuroscience**, v. 266, n.1, p. 266–274, 2014.

PRADO, M. A.; REIS, R. A.; PRADO, V. F.; DE MELLO, M. C.; GOMEZ, M. V.; DE MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, n. 5, p. 291-299, 2002.

PRUDOVA, A.; MARTINOV, M. V.; VITVITSKY, V. M.; ATAULLAKHANOV, F. I.; BANERJEE, R. Analysis of pathological defects in methionine metabolism using a simple mathematical model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1741, n. 3, p. 331-338, 2005.

RAKONCZAY, Z.; HORVÁTH, Z.; JUHÁSZ, A.; KÁLMÁN, J. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chemical Biological Interactions**, v.157-158, n. 1, p.233-238, 2005.

RAO, A.; SRIDHAR, G.; DAS, U. Elevated Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Medical Hypothesis**, v.69, n. 6, p. 1272-1276, 2007.

REARDON, C.; DUNCAN, G.S.; BRÜSTLE, A.; BRENNER, D. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 110, n. 4, p. 1410-1415, 2013.

RINGMAN, J. M.; FITHIAN, A. T.; GYLYSA, K.; CUMMINGS, J. L.; COPPOLA, G.; PRATICO, D. E. D.; MOSKOVITZ, J.; BITAN, G. A. L. Plasma methionine sulfoxide in persons with familial Alzheimer's disease mutations. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 33, n. 4, p. 219-225, 2012.

ROBSON, S.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

RODRIGUES, R.; DEBOM, G.; SOARES, F.; MACHADO, C.; PUREZA, J.; PERES, W.; GARCIAS, G. L.; DUARTE, M. F.; SCHETINGER, M. R. C.; STEFANELLO, F.; BRAGANHOL, E.; SPANEVELLO, R. Alterations of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in lymphocytes of Down syndrome subjects: Relation with inflammatory parameters. **Clinica Chimica Acta**, v. 433, n. 1, p. 105–110, 2014.

SABIROV, R. Z.; OKADA, Y. ATP release via anion channels. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 4, p. 311-38, 2005.

SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M.; KOCBUCH, K.; GRDEN, M.; MACIEJEWSKA, I.; SZUTOWICZ, A.; PAWELCZYK, T. High glucose concentration impaired ATP outflow and immunoglobulin production by human peripheral B lymphocytes: involvement of P2X7 receptor. **Immunobiology**, v. 218, n. 4, p. 591–601, 2013.

SAUDUBRAY, J. M.; OGIER, H.; BONNEFONT, J. P.; MUNICH, A.; LOMBES, A.; HERVÉ, F.; MITCHEL, G.; POLL THÉ, B.; SPECOLA, N.; PARVY, B.; BARDET, J.; COUDÉ, M.; CHARPENTIER, C.; FRÉZAL, J. Clinical Approach to hereditary metabolic disorders in neonates. Review of 20 years' experience. **Cesk Pediatrics**, v. 45, n. 1, p. 1-6, 1990.

SCHERER, E. B. S.; SAVIO, L. E. B.; VUADEN, F. C.; FERREIRA, A. G. K.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; WYSE, A. T. S. Chronic mild hyperhomocysteinemia alters ectonucleotidase activities and gene expression of ecto-5'-nucleotidase /CD73 in rat lymphocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 362, n. 1-2, p. 187-194, 2012.

SCRIVER, C. R, BEAUDET, AL, SLY WS, VALLE D. (2001). The metabolic and molecular bases of inherited disease. **New York: McGraw-Hill**, 8ed.

SILVA, D.; LACERDA, A. P. Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de risco na doença coronária. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 31, n. 11, p. 733-745, 2012.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1998. p. 1314.

SILVA-HERDADE, A.; SALDANHA, C. Effects of the acetylcholine on an animal model of inflammation. **Clinical Hemorheology Microcirculation**, v. 53, n. 1-2, p. 209-216, 2013.

SILVER, A. **The biology of cholinesterases**, Elsevier, Amsterdam, 1974.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SPANEVELLO, R.M.; MAZZANTI, C.M.; BAGATINI, M.; CORREA, M.; SCHAMATZ, R.; STEFANELLO, N.; THOME, G. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiples sclerosis patients. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 1, p. 24-30, 2010.

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

STEFANELLO, F. M.; CHIARANI, F.; KUREK, A. G.; WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. S. Methionine alters Na⁺,K⁺-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 651-656, 2005.

STEFANELLO, F. M.; FRANZON, R.; TAGLIARI, B.; WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. S. Reduction of Butyrylcholinesterase Activity in Rat Serum Subjected to Hyperhomocysteinemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 20, n. 2, p. 97-103, 2005c.

STEFANELLO, F. M.; KREUTZ, F.; SCHERER, E. B. S.; BREIER, A. C.; VIANNA, L. P.; TRINDADE, V. M. T.; WYSE, A. T. S. Reduction of gangliosides, phospholipids and cholesterol content in cerebral cortex of rats caused by chronic hypermethioninemia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 7, p. 473-477, 2007b.

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, n. 8, p. 961-968, 2009.

STEFANELLO, F. M.; MONTEIRO, S. C.; MATTÉ, C.; SCHERER, E. B. S.; NETTO, C. A.; WYSE, A. T. S. Hypermethioninemia increases cerebral acetylcholinesterase activity and impairs memory in rats. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 11, p. 1868-1874, 2007c.

STEFANELLO, F. M.; SCHERER, E. B. S.; KUREK, A. G.; MATTOS, C. B.; WYSE, A. T. S. Wyse. Effect of hypermethioninemia on some parameters on oxidative stress and on Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 22, n. 2, p. 172-182, 2007a.

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

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo California: A prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 872-879, 1991.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects**. In: SIEGEL, G, J. et al. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA. 6th edition 1999. p. 214-242.

THIELE, A.; Regulation of adenosine receptor subtypes during cultivation of human monocytes: role of receptors in preventing lipopolysaccharide-triggered respiratory burst. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1349–1357, 2004.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

UNGERER, J. P.; OOSTHUIZEN, H. M.; BISSBORT, S. H.; VERMAAK, W. J. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. **Clinical Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1322–1326, 1992.

VENTURA, M. A.; THOMOPOULOS, P. ADP and ATP activate distinct signaling pathways in human promonocytic U-937 cells differentiated with 1,25-dihydroxy-vitamin D3. **Pharmacology**, v. 47, n. 1, p.104-114, 1995.

VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools targets, and reversal. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 18, n. 1 p. 93-105, 1995.

VOLANAKIS, J. E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 2-3, p. 189-197, 2001.

YAMADA, H.; AKAHOSHI, N.; KAMATA, S.; HAGIYA, 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 & Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1716-1726, 2012.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide and nucleoside - converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673 – 694, 2008.

YIP, L.; WOEHRLE, T.; CORRINDEN, R.; HIRSH, M.; CHEN, Y.; INOUE, Y., FERRARI, V.; INSEL, P. A.; JUNGER, W. G. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1685-93, 2009.

ZHANG, X.; Mosser, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 161-178, 2008.

ZHAO, H.; KIM, G.; LEVINE, R. L. Methionine sulfoxide reductase contributes to meeting dietary methionine requirement. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 522, n. 1, p. 37-43, 2012.

ZIDEK Z. Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. **European Cytokine Network**, v. 10, n. 3, 319–28, 1999.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.; SHUKLA, V.; LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I.; DELIC, J.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, n.1-2, p. 537-566, 2007.

Anexos

Anexo A: Carta de parecer do Cômite de Ética em Experimentação Animal

Pelotas, 14 de maio de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professora Francieli Moro Stefanello

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Avaliação de parâmetros inflamatórios e neuroquímicos em animais tratados com metionina e metionina sulfóxido”**, processo nº23110.003527/2014-58, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 3527-2014).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 20 / 05 / 2014

Assinatura da Professora Responsável: