

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



Dissertação

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO**  
**SOBRE O FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS E MARCADORES DE**  
**INFLAMAÇÃO**

**Lien Mapelli dos Santos**

Pelotas, 2015

**Lien Mapelli dos Santos**

**Dissertação**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO  
SOBRE O FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS E MARCADORES DE  
INFLAMAÇÃO**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizandra Braganhol

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2015

## Lien Mapelli dos Santos

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

S237a

Santos, Lien Mapelli dos

Avaliação do efeito da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o fenótipo de macrófagos e marcadores de inflamação / Liem Mapelli dos Santos. – 80f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2015. – Orientadora Elizandra Braganhol ; coorientadora Francieli Moro Stefanello.

1.Metionina. 2.Metionina sulfóxido. 3.Polarização de macrófagos. 4.Estresse oxidativo. 5.Ectonucleotidases  
I.Braganhol, Elizandra. II.Stefanello, Francieli Moro. III.Título.

CDD: 572

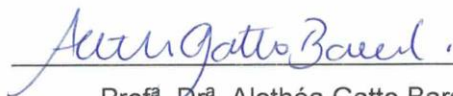
**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO  
SOBRE O FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS E MARCADORES DE  
INFLAMAÇÃO**

Como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
(Bioquímica e Bioprospecção), Universidade Federal de Pelotas.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizandra Braganhol (Orientadora) (UFCSPA)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alethéa Gatto Barschak (UFCSPA)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ethel Antunes Wilhelm (UFPel)

Pelotas, Agosto de 2015

Dedico este trabalho aos meus pais Valdemar e Rita, ao meu irmão Ederson e ao meu noivo Mauricio pelo amor incondicional, apoio, incentivo e por todos os esforços e oportunidades que me proporcionaram de estudar.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais por todos os esforços, preocupação, dedicação, amor e apoio incondicional. Obrigada por me incentivarem a estudar e por sempre me motivarem a constante busca pela realização pessoal e profissional.

Ao meu noivo Maurício pela paciência, incentivo, confiança, companheirismo e apoio em cada decisão tomada.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Elizandra Braganhol, meu agradecimento mais que especial, pelo acolhimento, ensinamentos, amizade, oportunidade e confiança para realização deste trabalho. Obrigada pela disposição, pelos abraços apertados de carinho e incentivo e por fazer parte do meu crescimento profissional.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Francieli Moro Stefanello pelos conhecimentos repassados, paciência, disponibilidade, dedicação e amizade. Obrigada pelo incentivo, acolhimento e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Roselia Maria Spanevello pelos ensinamentos, disponibilidade, palavras de incentivo e carinho, e por fazer parte do meu crescimento profissional.

A Prof<sup>a</sup>. Rejane Giacomelli Tavares obrigada pela contribuição, disponibilidade e paciência.

A Prof<sup>a</sup>. Ana Chaves pela confiança, apoio e amizade.

Aos funcionários do biotério da Universidade Federal de Pelotas, obrigada pelos conhecimentos práticos repassados, paciência, convivência e disponibilidade.

Aos professores do Programa de Pós – Graduação em Bioquímica e Bioprospecção pela convivência e ensinamentos.

A UFPEL pela estrutura que possibilitou a realização de meus estudos.

A todos os alunos de mestrado e iniciação científica dos Laboratórios de Biomarcadores e NEUROCAN, em especial a mais nova mestranda Pathise Souto Oliveira pela valiosa ajuda nos experimentos, amizade e palavras de incentivo e carinho desde o início dessa jornada.

A Nathália Stark Pedra, Priscila Ramos e Juliana Azambuja que me ajudaram na execução deste trabalho. Obrigada pela energia e disposição durante todo esse período.

Aos amigos que o mestrado meu deu Carlus Augusto Tavares do Couto e Kennia Galdino. Obrigada pela ajuda, conselhos e pelos momentos de desabafo, comilança e muitas risadas.

Aos colegas da VISA pelo apoio e incentivo constante para realização deste sonho.

Aos amigos, obrigada pela torcida.

A Deus, obrigada pela proteção e pela presença em minha vida.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton



## PARTE I

## Resumo

DOS SANTOS, Lien Mapelli. **Avaliação do efeito da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o fenótipo de macrófagos e marcadores de inflamação.** 2015. 79f. Dissertação. (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A hipermetioninemia é um erro inato do metabolismo (EIM) caracterizado pela deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT), que pode resultar em elevadas concentrações sanguíneas de metionina, além da presença de metabólitos, como a metionina sulfóxido, o metanotiol e o sulfeto de hidrogênio no plasma e na urina dos pacientes afetados por esta doença. Desta forma, pacientes hipermetioninêmicos podem apresentar quadros de edema cerebral, alteração psicomotora e distúrbios hepáticos envolvendo inflamação e estresse oxidativo, cuja fisiopatologia não está completamente estabelecida. Dados da literatura sugerem que uma dieta suplementada com metionina altera o status pró-oxidante/antioxidante em cérebro e fígado de ratos. Outros estudos revelam que os macrófagos, quando ativados, em resposta ao reconhecimento de sinais de perigo como produtos microbianos, citocinas e mediadores extravasados por células danificadas, tal como o ATP (Trifosfato de Adenosina), apresentam maior capacidade de liberar mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos como espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (ERN), enzimas hidrolíticas, lipídios bioativos e citocinas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito *in vitro* da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o fenótipo de ativação de macrófagos de camundongos e a avaliação de alguns parâmetros inflamatórios associados com o estresse oxidativo e atividade das ectonucleotidases nestas células. Nossos resultados mostraram que a exposição dos macrófagos *in vitro* a altas concentrações de metionina (1mM) e/ou metionina sulfóxido (0.5 mM) induziu a polarização dos macrófagos para um fenótipo de ativação M1/clássico, o qual se relaciona com as respostas pró-inflamatórias caracterizadas pelo aumento da atividade de iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzida) e a liberação de TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral - alfa). Além disto, o tratamento com metionina e/ou metionina sulfóxido modulou diferencialmente a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em cultura de macrófagos. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas da atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx). Em relação as ectonucleotidases, nossos resultados mostraram um aumento da atividade ATPase/ADPásica em macrófagos. Em conjunto, nossos achados sugerem que o tratamento *in vitro* de macrófagos com metionina e/ou metionina sulfóxido induz o fenótipo de ativação clássica M1/pró-inflamatório, promove a modulação da atividade das enzimas antioxidantes, bem como das ectonucleotidases, os quais podem estar envolvidos na patofisiologia de doenças, contribuindo, assim, para a ativação do sistema imune inflamatório nos quadros de hipermetioninemia.

Palavras-chave: metionina; metionina sulfóxido, polarização de macrófagos, estresse oxidativo, ectonucleotidases.

### Abstract

DOS SANTOS, Lien Mapelli. **Evaluation of the effect of methionine and/or methionine sulfoxide on macrophage phenotype and inflammation markers.** 2015. 79f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The hypermethioninemia is an inborn error of metabolism (IEM), characterized by the deficiency of the enzyme methionine adenosyltransferase (MAT), which can result in high blood concentrations of methionine, and the presence of metabolites such as methionine sulfoxide, methanethiol and hydrogen sulfide in plasma and urine of patients affected by this disease. Therefore, hypermethioninemic patients may exhibit cerebral edema, psychomotor changes and liver disorders involving inflammation and oxidative stress, whose pathophysiology is not completely established. Data from literature suggest that a diet supplemented with methionine changes the pro-oxidant / antioxidant status of rat brain and liver. Macrophages when activated in response to recognition of danger signals such as microbial products, cytokines and mediators extravasated by damaged cells, such as ATP (adenosine triphosphate), present increased ability to release pro-inflammatory and cytotoxic mediators as reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), hydrolytic enzymes, bioactive lipids and cytokines. Thus, this study aimed to investigate the *in vitro* effect of methionine and/or methionine sulfoxide on the phenotype expressed by mouse macrophages and evaluate some inflammatory parameters associated with oxidative stress and ectonucleotidase activity of these cells. Our results showed that exposure of macrophages at high methionine and / or methionine sulfoxide concentration induced M1/classical macrophage polarization, which is related to a pro-inflammatory response characterized by increased iNOS (Nitric oxide synthase induced) activity and release of TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha). In addition, treatment with methionine (1 mM) and/or methionine sulfoxide (0.5 mM) modulated differentially the activity of the antioxidant enzymes SOD (superoxide dismutase) and CAT (catalase) in cultured macrophages. However, significant differences of the antioxidant enzyme GPx (glutathione peroxidase) activity were not observed. Regarding the ectonucleotidases, our results showed that the treatment with methionine sulfoxide alone or in combination with methionine increased the ATPase/ADPase activities in macrophages. Together, our findings suggest that the treatment with methionine and/or methionine sulfoxide induced M1/classical macrophage polarization and modulated antioxidant enzyme activities as well as of ectonucleotidases which may be involved in the pathophysiology of diseases, thus contributing to the activation of the inflammatory/immune system in hypermethioninemic patients.

Keywords: methionine, methionine sulfoxide, macrophage polarization, oxidative stress, ectonucleotidases.

### Lista de Figuras

|          |                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Figura 1 | Diagrama representativo das causas e consequências dos erros inatos do metabolismo ..... 20                                                                                                                                      |
| Figura 2 | Metabolismo da metionina ..... 24                                                                                                                                                                                                |
| Figura 3 | Extremos de ativação de macrófagos <i>in vitro</i> .....31                                                                                                                                                                       |
| Figura 4 | Representação esquemática dos elementos envolvidos na liberação de adenosina 5' - trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), adenosina e subsequente ativação da sinalização purinérgica ..... 33 |

### Lista de Abreviaturas

|                 |                                            |
|-----------------|--------------------------------------------|
| ADO             | Adenosina                                  |
| ADP             | Difosfato Adenosina                        |
| ALP             | Fosfatase alcalina                         |
| AMP             | Monofosfato de Adenosina                   |
| ATP             | Trifosfato de Adenosina                    |
| BHMT            | Betaína Homocisteína metiltransferase      |
| CAT             | Catalase                                   |
| CBS             | Cistationina $\beta$ -sintase              |
| DHM             | Doença Hereditária Metabólica              |
| DMG             | Dimetil Glicina                            |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico                  |
| Ecto-5'-NT/CD73 | Ecto-5'-nucleotidase                       |
| EIM             | Erros Inatos do Metabolismo                |
| E-NPP           | Ecto-pirofosfato-fosfodiesterases          |
| E- NTPDase      | Ecto-nucleosídeo trifosfo-difosfohidrolase |
| ERN             | Espécies Reativas de Nitrogênio            |
| ERO             | Espécies Reativas de Oxigênio              |
| FAH             | Fumarilacetoacetatohidrolase               |
| GNMT            | Glicina N - metiltransferase               |
| GPx             | Glutationaperoxidase                       |
| GSH             | Glutathione Reduzida                       |
| Hcy             | Homocisteína                               |

|                            |                                             |
|----------------------------|---------------------------------------------|
| IFN                        | Interferons                                 |
| IFN- $\gamma$              | Interferongamma                             |
| IL-1 $\alpha$              | Interleucina-1-alfa                         |
| IL-1 $\beta$               | Interleucina-1-beta                         |
| IL-2                       | Interleucina-2                              |
| IL-4                       | Interleucina-4                              |
| IL-6                       | Interleucina-6                              |
| IL-10                      | Interleucina-10                             |
| IL-12                      | Interleucina-12                             |
| IL-13                      | Interleucina-13                             |
| IL-18                      | Interleucina-18                             |
| INOS                       | Óxido Nítrico Sintase induzida              |
| LPS                        | Lipolissacarídeos                           |
| MAT                        | Metionina Adenosiltransferase               |
| MCP-1                      | Proteína Quimiotática de Monócito do tipo 1 |
| Met                        | Metionina                                   |
| MetO                       | Metionina Sulfóxido                         |
| Me-THF                     | Metiltetrahidrofolato                       |
| MS                         | Metionina sintase                           |
| MTHFR                      | Metileno Tetrahidrofolatoredutase           |
| NO $\bullet$               | Óxido nítrico                               |
| OH $\bullet$               | Radical Hidroxila                           |
| O <sub>2</sub> $\bullet^-$ | Ânion Superóxido                            |
| PGE <sub>2</sub>           | Prostaglandinas                             |

|               |                                      |
|---------------|--------------------------------------|
| P2X           | Receptor Purinérgico Ionotrópico     |
| P2Y           | Receptor Purinérgico Metabotrópico   |
| RNA           | Ácido ribonucleico                   |
| SAH           | S-adenosilhomocisteína               |
| SAHH          | S - adenosil - homocisteínahidrolase |
| SAM           | S - adenosil - metionina             |
| SNC           | Sistema Nervoso Central              |
| SOD           | Superóxido Dismutase                 |
| tHcy          | Homocisteína Plasmática total        |
| THF           | Tetrahidrofolato                     |
| TNF- $\alpha$ | Fator de Necrose Tumoral - alfa      |
| UDP           | Difosfato Uridina                    |
| UTP           | Trifosfato Uridina                   |

## Sumário

|                                                                   |               |
|-------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>PARTE I .....</b>                                              | <b>8</b>      |
| Resumo .....                                                      | 9             |
| Abstract .....                                                    | 10            |
| Lista de Figuras.....                                             | 11            |
| Lista de Abreviaturas. ....                                       | 12            |
| <br><b>PARTE II .....</b>                                         | <br><b>16</b> |
| 1 Introdução .....                                                | 17            |
| 2 Objetivos. ....                                                 | 19            |
| Objetivo Geral.....                                               | 19            |
| Objetivos Específicos.....                                        | 19            |
| 3 Revisão da Literatura.....                                      | 20            |
| Erros Inatos do Metabolismo .....                                 | 20            |
| Hipermetioninemia.....                                            | 22            |
| Sintomatologia.....                                               | 25            |
| Diagnóstico e Tratamento .....                                    | 26            |
| Radicais Livres e Estresse Oxidativo .....                        | 26            |
| Sistema Imune e Inflamação .....                                  | 28            |
| Macrófagos. ....                                                  | 29            |
| Fenótipo de Ativação dos Macrófagos.....                          | 30            |
| Sistema Purinérgico .....                                         | 32            |
| 3.5.1 Sinalização Purinérgica, Resposta Imune e Inflamatória..... | 34            |
| <br><b>PARTE III.....</b>                                         | <br><b>37</b> |
| Manuscrito.....                                                   | 38            |
| <br><b>PARTE IV.....</b>                                          | <br><b>61</b> |
| Conclusão .....                                                   | 62            |
| Referências.....                                                  | 64            |



## PARTE II

## 1 Introdução

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças hereditárias, a maioria autossômica recessiva, que se caracterizam pela deficiência de uma proteína, normalmente uma enzima (DHERAI, 2012). Dentre os EIM, os mais frequentes são os de aminoácidos, sendo um exemplo o EIM da metionina em que se observa a deficiência da enzima MAT (Metionina Adenosiltransferase). Na deficiência da MAT, a concentração plasmática de metionina pode atingir até 2.500  $\mu\text{mol/L}$ , sendo que os valores de referência são em torno de 30  $\mu\text{mol/L}$ . Elevadas concentrações de metabólitos, como a metionina sulfóxido, o metanotiol e o sulfeto de hidrogênio também podem ser observadas no plasma e na urina dos pacientes afetados por esta doença (MUDD et al., 2001). Consequentemente, pacientes hipermetioninêmicos apresentam manifestações clínicas como déficit cognitivo, edema e desmielinização cerebral, e também alterações hepáticas envolvendo inflamação e estresse oxidativo, cuja fisiopatologia ainda não está completamente estabelecida (MUDD et al., 2001; LU et al., 2001; FERNÁNDEZ-IRIGOYEN et al., 2010).

As células do sistema imune, através dos processos de fagocitose desempenham um papel chave em diversas funções biológicas, dentre as quais o controle da inflamação por intermédio dos macrófagos que constituem as principais células diferenciadas do sistema fagocitário mononuclear (SILVA

et al., 2011). Os macrófagos, por sua vez, possuem como característica a capacidade de atuar em quase todos os aspectos que envolvem os processos inflamatórios e imunes, através de sua abundância, distribuição, mobilidade e capacidade de resposta (LASKIN & LASKIN., 2001). Estas células expressam diferentes estágios de diferenciação ou ativação, devido a sua heterogeneidade funcional, morfológica e metabólica, o que possibilita que seu fenótipo modifique em resposta a estímulos ambientais (GORDON & TAYLOR, 2005; LEE et al., 2005).

Quando os macrófagos são ativados em resposta ao reconhecimento de sinais de perigo, como produtos microbianos, citocinas, quimiocinas e mediadores extravasados por células danificadas, tal como o trifosfato de adenosina (ATP) (LEY et al., 2010), passam a exibir a propriedade de liberar fatores pró-inflamatórios e citotóxicos como espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), lipídios bioativos, enzimas hidrolíticas e citocinas citotóxicas (LASKIN & LASKIN., 2001; FORMAN & TORRES., 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Este processo de “ativação” celular está associado às mudanças morfológicas, funcionais e bioquímicas nas células (SCHULTZ., 1990; LASKIN & LASKIN., 2001).

Nucleotídeos extracelulares são moléculas de sinalização que exercem efeitos em uma variedade de tecidos, principalmente através da interação com receptores de membrana específicos (KHAKH & NORTH, 2006; WELTER-STAHN et al., 2009). Entre estes, o ATP e uridina trifosfato (UTP) / uridina difosfato (UDP) estão sendo considerados mediadores do sistema imune inato, pois são capazes de produzir uma variedade de efeitos na inflamação, após serem liberados como resultado de dano celular (DI VIRGILIO et al., 2001).

Considerando a importância da ativação dos macrófagos e o espectro de sinalização purinérgica nas respostas imune inatas, torna-se importante avaliar o efeito da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o fenótipo de macrófagos peritoneais de camundongos e sobre parâmetros de estresse oxidativo para, desta forma, contribuir na elucidação da fisiopatologia da hipermetioninemia e de futuras estratégias de prevenção desta doença metabólica.

## 2 Objetivos

### Objetivo Geral

Investigar o efeito *in vitro* da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o fenótipo expresso por macrófagos de camundongos, analisando a atividade de enzimas antioxidantes e das ectonucleotidases nestas células.

### Objetivos Específicos

- Determinar o fenótipo expresso por macrófagos peritoneais de camundongos em cultura frente à exposição *in vitro* de metionina e/ou metionina sulfóxido através da medição dos níveis de nitrito, TNF- $\alpha$ , bem como da determinação da atividade da arginase e medição de IL-10;
- Avaliar o efeito da metionina e/ou metionina sulfóxido *in vitro* sobre a hidrólise de ATP, ADP e AMP em macrófagos de camundongos;
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo, como a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathionaperoxidase (GPx) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos após exposição *in vitro* de metionina e/ou metionina sulfóxido.

- 

### **3 Revisão da Literatura**

#### **Erros Inatos do Metabolismo**

Os erros inatos do metabolismo são doenças hereditárias metabólicas (DHM), provenientes de um erro específico, normalmente enzimático, que resulta na diminuição total ou parcial da atividade enzimática, tendo como consequência a ausência do produto esperado e o acúmulo de substrato ou até mesmo o surgimento de uma rota metabólica alternativa, que poderá levar a

geração de um produto alternativo, geralmente tóxico, quando presente em altas concentrações plasmáticas (AMÂNCIO et al., 2007). Todos estes pontos estão ilustrados na figura 1.

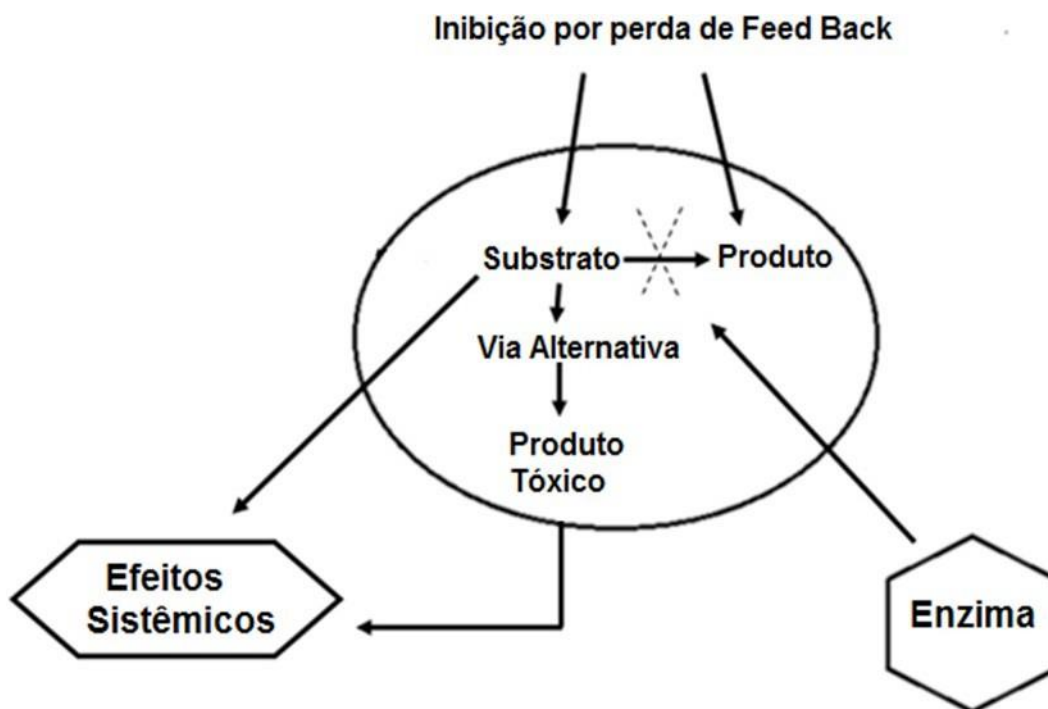


Figura 1. Diagrama representativo das causas e consequências dos erros inatos do metabolismo. Adaptado de RAO et al., 2009.

Atualmente, os EIM representam cerca de 10% de todas as doenças genéticas, visto que já foram descritas mais de 500 DHM que afetam os processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (SCRIVER et al., 2001; EL HUSNY et al, 2006). A frequência destas doenças é muito baixa quando analisadas de forma individual, o que as torna raras, porém, quando analisadas em conjunto chegam a atingir um a cada mil recém-nascidos vivos (GIMENEZ- SANCHEZ et al., 2001; AMÂNCIO et al., 2007).

A maioria dos EIM são detectados através da triagem neonatal, e em outros casos, após as primeiras manifestações clínicas da doença que ocorrem

usualmente na infância (SOUZA; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2002). Quando não tratados, os EIM podem causar uma série de consequências no período neonatal, como o acúmulo de metabólitos tóxicos e a falta de produtos essenciais, ambas levando a manifestações clínicas subsequentes, que vão desde alterações hepáticas, inflamatórias, déficit neurológico até grave comprometimento cognitivo e até mesmo culminar na morte do indivíduo afetado por estas desordens metabólicas (SCRIVER et al., 2001; RAO et al., 2009; CAMP et al., 2012; DHERAI, 2012).

A estratégia de tratamento mais utilizada é baseada no fornecimento de suplementos alimentares especializados, com a finalidade de tentar contornar um transtorno metabólico específico, que se manifesta em decorrência da presença de anormalidades bioquímicas resultantes da deficiência enzimática parcial ou total (CAMP et al., 2012). Dependendo da relevância da rota metabólica atingida, este bloqueio poderá repercutir de diversas formas clínicas, geralmente produz sintomas graves que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) e levam ao atraso no desenvolvimento do indivíduo, culminando em efeitos permanentes e muitas vezes fatais se o tratamento adequado não for imediatamente iniciado (SCRIVER et al, 2001; RAO et al., 2009).

Os EIM podem ser classificados pela área do metabolismo afetada (SAUDUBRAY & CHARPENTIER, 2000), sendo estes subdivididos em EIM de: aminoácidos, ácidos orgânicos, glicídios, lipídios, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, enzimas eritrocitárias, metais, lipoproteínas, hormônios e proteínas plasmáticas. Clinicamente podem ser divididos em distúrbios do metabolismo intermediário, da síntese ou catabolismo de moléculas complexas, e falhas de produção ou consumo de energia (SCRIVER et al., 2001). Dentre os EIM mais frequentes estão os que envolvem o metabolismo de aminoácidos, tal como a doença do xarope de bordo, a fenilcetonúria, a hiperprolinemia, a homocistinúria e a hipermetioninemia, que será o objeto deste estudo.

### **Hipermetioninemia**

A metionina é um aminoácido essencial em mamíferos; sua metabolização ocorre principalmente no fígado, que utiliza mais de 70% da metionina da dieta (STROUS et al., 2008; YAMADA et al., 2012). Quando presente em altas concentrações plasmáticas, a metionina exerce efeitos tóxicos para o organismo incluindo dano neurológico e hepático (MUDD et al., 2000, 2001; STEFANELLO et al., 2005, 2007).

A hipermetioninemia é considerada um EIM que foi evidenciado pela primeira vez em 1974, através da biópsia de extratos hepáticos de indivíduos hipermetioninêmicos (COUCE et al., 2013). Esta doença como uma importante característica a deficiência total ou parcial da enzima metionina adenosiltransferase (MAT) (MUDD et al., 2000, 2001).

Diversos estudos de caráter genético revelam que a deficiência da enzima MAT, em pacientes com hipermetioninemia isolada, ocorre devido a mutações no gene MAT1A, que é responsável por codificar as subunidades catalíticas de duas isoenzimas presentes em células hepáticas maduras (MAT I e MAT III) (MUDD et al., 2000, 2001; HIRABAYASHI et al., 2013). Na maioria das vezes, a deficiência de MAT I/III é herdada de forma autossômica recessiva, apesar da forma dominante já ter sido relatada em alguns estudos (CHIEN et al., 2005; MARTINS et al., 2012), ou também pode apresentar origem não genética como disfunção hepática, dieta rica em metionina, baixo peso ao nascer e crianças prematuras (BJURSELL et al., 2011; FURUJO et al., 2012). Além da deficiência desta enzima, são conhecidas outras condições genéticas que ocasionam o aumento anormal de metionina tais como: deficiência de cistationina  $\beta$ -sintase (CBS), de glicina N - metiltransferase (GNMT), de S - adenosil - homocisteínahidrolase (SAHH), fumarilacetoacetatohidrolase (FAH), entre outras (MUDD et al., 2011).

A metionina, derivada da dieta ou da degradação de proteínas endógenas, obtém um grupo adenosil do trifosfato de adenosina - ATP e, por sua vez é convertida em S-adenosil-metionina (SAM) pela MAT. Posteriormente, a SAM é convertida, por diversas metiltransferases, em S-adenosilhomocisteína (SAH) que sofre hidrólise em adenosina (Ado) e



homocisteína (Hcy) por intermédio da enzima SAHH (LENTZ et al., 2005; FINKELSTEIN, 2007; WILLIAMS & SCHALINSKE, 2010).

A Hcy sintetizada poderá ser metabolizada à metionina pela via de remetilação através de duas rotas: uma catalisada pela enzima metionina sintase (MS), dependente de cianocobalamina (vitamina B12), que realiza a transferência de um grupo metil derivado do N5-metiltetraidrofolato para a Hcy; ou através da rota da betaína, catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase (BHMT). A Hcy também poderá ser irreversivelmente metabolizada à cisteína através da via de transulfuração, por meio da condensação com a serina que produzirá cistationina, em uma reação catalisada pela enzima CBS dependente de vitamina B6 (piridoxalfosfato). Após, a cistationina é clivada à cisteína pela enzima cistationina  $\gamma$ -liase (CGL) (CHAMBERLIN et al., 2000; FINKELSTEIN, 2007; BJURSELL et al., 2011) (Figura 2).

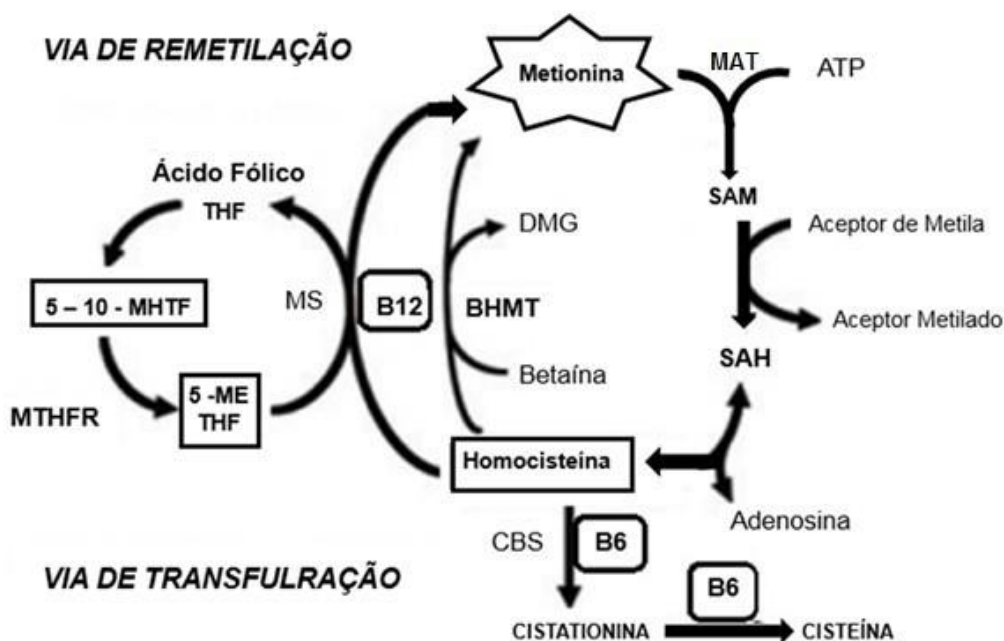


Figura 2. Metabolismo da metionina. SAM: S-adenosil-metionina; SAH: S-adenosil-homocisteína; CBS: cistationina  $\beta$ -sintase; MS: metionina sintase; BHMT: betaínahomocisteínametiltransferase; MTHFR: metileno tetraidrofolato redutase; DMG: dimetilglicina; THF: tetraidrofolato; 5-10-MHTF: 5,10-metilenotetraidrofolato; 5-Me-THF: 5-metiltetraidrofolato. Adaptado de Lentz, 2005.

O fígado é o principal órgão onde é metabolizado o excesso de Met, consequentemente é o órgão responsável pela manutenção dos níveis adequados de Hcy. Desta forma, a SAM, que é um importante doador de grupos metila para a biossíntese de diversos compostos importantes, como fosfolípidios, RNA, DNA, também de alguns neurotransmissores como a dopamina, serotonina e norepinefrina, irá exercer um papel primordial na regulação dos níveis de Hcy (CHAMBERLIN et al., 1996; FURUJO et al., 2012; MUDD et al., 2001). Quando os níveis de SAM encontram-se elevados, ocorre uma redução na via de remetilação da Hcy à Met por meio da inibição da atividade da MTHFR. Em contrapartida, quando ocorre o acúmulo de Hcy, a SAM promove o catabolismo deste aminoácido através da transulfuração por ativação da CBS (FINKELSTEIN, 2007).

## **Sintomatologia**

A grande maioria de indivíduos acometidos por esta doença é livre de sintomas, no entanto, anormalidades neurológicas como desmielinização cerebral, atribuídas à deficiência de SAM no líquido cefalorraquidiano, foram relatadas em diversos estudos (CHAMBERLIN et al., 1996; MUDD et al., 2001; FURUJO et al., 2012). Também podem apresentar quadros de edema cerebral, miopatia, retardo do desenvolvimento psicomotor e distúrbios hepáticos envolvendo inflamação e estresse oxidativo (MUDD et al., 2001; FERNÁNDEZ-IRIGOYEN et al., 2010).

Os valores normais de metionina no plasma estão em torno de 30  $\mu\text{mol/L}$ . No entanto, nos casos mais graves da doença, em que a atividade da enzima MAT encontra-se significativamente alterada em virtude de mutações severas, os níveis de metionina plasmática podem chegar a atingir até 2.500  $\mu\text{mol/L}$  (MUDD et al., 2001). Adicionalmente, também é possível detectar o aumento do nível total de Hcy plasmática que pode estar associado ao risco elevado de doenças trombóticas (FURUJO et al., 2012; MARTINS et al., 2012). Paralelamente, ocorre elevação dos níveis de metionina sulfóxido, de metanotiol e sulfeto de hidrogênio, no plasma e urina, resultantes da rota alternativa do metabolismo da metionina (MUDD et al., 2001).

Uma característica clínica importante da hipermetioninemia é o surgimento de um odor de enxofre no suor, urina e respiração dos pacientes afetados, devido à presença do produto sulfureto de dimetilo oriundo do metabolismo alternativo da metionina. Nos casos de pacientes com deficiência severa de MAT I / III, o nível de homocisteína plasmática total (tHcy) também pode estar elevado (FURUJO et al., 2012; COUCE et al., 2013; HIRABAYASHI et al., 2013).

## **Diagnóstico e Tratamento**

A hipermetioninemia isolada é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual de metionina e pela ausência do produto SAM, em virtude da deficiência total ou parcial da enzima MAT. Ainda, metabólitos como metionina

sulfóxido (MetO) e metanotiol podem ser encontrados em elevadas concentrações no plasma e urina dos pacientes afetados (MUDD et al., 2011).

Geralmente, o distúrbio é detectado no período neonatal, através de achados bioquímicos inconsistentes para o diagnóstico de homocistinúria causada por deficiência de CBS (COUCE et al., 2013; HIRABAYASHI et al., 2013; NAGAO et al., 2013). No entanto, níveis altos de metionina também podem ser sugestivos de outras desordens metabólicas como já relatado anteriormente. Desta forma, a fim de excluir outras causas de hipermetioninemia é necessário definir a natureza molecular da mutação de MAT1A e apurar possíveis correlações e causalidades entre o genótipo e os resultados clínicos apresentados pelos indivíduos afetados (NAGAO et al., 2013). A fim de evitar os efeitos permanentes da doença, é importante realizar o diagnóstico nos primeiros dias de vida da criança (COUCE et al., 2013)

O tratamento é fundamentado em uma dieta restritiva do aminoácido metionina com frequente monitoramento metabólico, a fim de impedir os danos ocasionados pela elevada concentração plasmática deste aminoácido. Entretanto, esta estratégia terapêutica restritiva, pode reduzir ainda mais os níveis de SAM, agravando os danos neurológicos presentes nos pacientes hipermetioninêmicos (CHIEN et al., 2005).

### **Radicais Livres e Estresse Oxidativo**

As espécies reativas de oxigênio (ERO) – termo utilizado para designar radicais livres (ânion superóxido e radical hidroxila) e alguns não radicais derivados do oxigênio (peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete) são produzidas de forma constante no metabolismo, especialmente na cadeia respiratória mitocondrial, sendo que cerca de 2-5% do oxigênio consumido são transformados nestas espécies (HALLIWELL, 2011). Fisiologicamente, estas espécies desempenham um importante papel durante o processo fagocitário, regulação da atividade de proteínas, sinalização celular e na resposta imunológica. Por outro lado, quando produzidas de forma excessiva podem gerar danos ao organismo, uma vez que, apresentam a característica de serem altamente reativas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; ELLAH, 2011).

Com o propósito de evitar os efeitos nocivos das espécies reativas, o organismo dispõe de defesas antioxidantes, a fim de inibir e/ou reduzir a oxidação de biomoléculas. Este sistema de defesa pode ser dividido em enzimático e não enzimático. As defesas antioxidantes enzimáticas compreendem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatinoxidase (GPx), dentre outras. Já os mecanismos não enzimáticos são compostos por uma grande variedade de substâncias antioxidantes que podem ter origem endógena ou ser proveniente da dieta, incluindo ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatona (GSH), carotenoides, flavonoides entre outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; SREEKUMAR; HINTON; KANNAN, 2011; HALLIWELL, 2012; RAJENDRAN et al., 2014).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo, pode estar associado direta ou indiretamente a diversas doenças como, inflamação, disfunção hepática, carcinogênese, aterosclerose, doença cardíaca isquêmica, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, doenças neurodegenerativas e EIM de aminoácidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; MISRA et al., 2009; NEDIANI et al., 2011; MACHADO et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; COSTA et al., 2013). Neste contexto, estudos evidenciaram que elevadas concentrações de metionina e/ou MetO, tanto *in vitro* como *in vivo*, afetam o estado redox celular e induzem o estresse oxidativo em cérebro (STRECK et al., 2002, 2003; STEFANELLO et al., 2005) e fígado de ratos (COSTA et al., 2013; MORI & HIRAYAMA, 2000; STEFANELLO et al., 2009, 2011; YALÇINKAYA et al., 2007). Adicionalmente, pesquisadores verificaram que a exposição crônica à metionina induz estresse oxidativo e provoca alterações histológicas em fígado de ratos (STEFANELLO et al., 2009; COSTA et al., 2013).

### **Sistema Imune e Inflamação**

O sistema imune é dividido em dois componentes principais: o sistema imune inato e o adaptativo. A defesa inata inclui sistemas de defesa que, em sua maior parte, estão presentes e prontos para serem mobilizados em uma infecção, não são específicos para um antígeno e reagem da mesma maneira

para uma variedade de organismos, por sua vez, não desenvolvem memória imunológica (ROSA et al., 2002; MACÊDO et al., 2010). Os elementos do sistema imune inato incluem barreiras anatômicas, moléculas de secreção e componentes celulares. Entre as barreiras mecânicas anatômicas estão a pele e camadas epiteliais internas, o movimento dos intestinos e a oscilação dos cílios bronco pulmonares. Associados a essas superfícies protetoras estão presentes agentes químicos e biológicos (ABBAS et al., 2008).

Já o sistema imune adaptativo requer algum tempo para reagir contra um organismo invasor, possui memória imunológica, é específico para um antígeno, agindo exclusivamente contra o organismo que induziu a resposta. Ele “lembra” que já encontrou o invasor e reage mais rapidamente à exposição subsequente ao mesmo agente. Este sistema é composto por células que apresentam memória e especificidade tais como linfócitos T e B e fatores humorais. É importante destacar que elementos do sistema inato podem exercer funções como efetores do sistema adaptativo (ROSA et al., 2002; MACÊDO et al., 2010).

A inflamação é um mecanismo homeostático complexo que tem por objetivo exercer a função de proteção da integridade do organismo contra agentes nocivos endógenos ou exógenos (DI VIRGILIO E VUERICH, 2015). A resposta inflamatória consiste basicamente na liberação de mediadores, com posterior recrutamento de diversas células inflamatórias provenientes da circulação. Estas células inflamatórias são ativadas no local do processo inflamatório e desta forma levam a liberação de mais mediadores. Entre estes mediadores podemos destacar as proteínas de fase aguda (proteína C reativa, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-1-antitripsina, fibrinogênio, haptoglobina e ceruloplasmina), citocinas (interleucina 1- beta ( $IL-1\beta$ ), interleucina-2 ( $IL-2$ ), interferongama ( $IFN-\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ )), quimiocinas (interleucina-8 ( $IL-8$ ) e proteína quimiotática de monócito do tipo 1 ( $MCP-1$ )), prostaglandinas ( $PGE_2$ ) e óxido nítrico ( $NO^*$ ) (COLTON, 2009; SALERNO et al., 2002; ZHANG, 2008).

Parte da resposta inflamatória é dada pelo recrutamento de neutrófilos e de macrófagos ao local da infecção. Estas células representam a principal linha de defesa no sistema imune não específico. Durante o desencadeamento da

resposta imune os macrófagos liberaram mediadores químicos tais como citocinas, proteínas sinalizadoras, ERO, espécies reativas de nitrogênio (ERN), interferons (IFN), que recrutam outras células inflamatórias, como os neutrófilos (FORMAN & TORRES, 2001; LASKIN & LASKIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; MACÊDO et al., 2010).

## **Macrófagos**

Os macrófagos são uma população heterogênea de células imunes que pertencem ao sistema fagocítico mononuclear. São capazes de atuar extensivamente em eventos regulatórios, como na indução ou resolução da inflamação, ação tumoricida, microbicida, produção de citocinas, apresentação de antígenos aos linfócitos, na reparação e renovação tecidual (KLIMP et al., 2002; LEE et al., 2005).

Os macrófagos podem estar situados em diversos locais do organismo, e desta forma, podem diferenciar-se de forma específica adquirindo morfologia e funções que são características de cada tecido onde residem. Como exemplo, podemos citar os macrófagos peritoneais situados no peritônio, as células de Kupffer no fígado e a microglia no SNC (GORDON et al., 2003). Estas células são identificadas pela presença do marcador de superfície CD14 e constituem a primeira linha de defesa contra patógenos (WRIGHT et al., 1990; DEY et al., 2015; TYTECA et al., 2015).

## **Fenótipo de Ativação dos Macrófagos**

Diversos são os mecanismos capazes de produzir uma mudança no perfil de ativação dos macrófagos. Dentre estes mecanismos, podemos mencionar o dano celular através de sinais de perigo endógenos (ZHANG et al., 2008), além de fatores de sinalização, como a produção diferencial de citocinas de linfócitos Th1 e Th2 da resposta imune inata e adaptativa, que poderá elevar a produção de fatores com atividade antimicrobial ou levar à susceptibilidade a infecções (ABBAS, 2008). Desta forma, os macrófagos são capazes de apresentar uma surpreendente plasticidade, o que lhes permite modificar seu fenótipo em resposta a estímulos ambientais (GORDON, 2003).

Estas células têm sido classificadas de acordo com o seu fenótipo em M1 e M2, os quais representam os extremos de ativação, sendo que M1 corresponde aos macrófagos ativados classicamente com função pró-inflamatória e M2 aos macrófagos ativados alternativamente, que exibem atividade anti-inflamatória, função de remodelação, cicatrização e de reparação tecidual (GORDON, 2003; MOSSER et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009; MANTOVANI et al., 2009; LIU et al., 2014; MARTINEZ & GORDON, 2014). A estimulação dos diferentes fenótipos de ativação pode ser realizada *in vitro* com o uso de IFN- $\gamma$  e/ou lipopolissacarídeos (LPS) fenótipo de ativação clássica/M1, bem como de interleucina-4 (IL-4) ou a combinação IL-4 / interleucina-13 (IL-13) para induzir um fenótipo de ativação alternativa/M2 (GORDON et al., 2003; GORDON & TAYLOR, 2005; MARTINEZ et al., 2009; TYTECA et al., 2015).

Macrófagos de fenótipo M1 são caracterizados pela liberação da citocina TNF- $\alpha$  e pela produção de ERN e ERO, apresentando atividade pró-inflamatória (BOHLSON et al., 2014; TYTECA et al., 2015). Por outro lado, os macrófagos de fenótipo M2 apresentam como característica a produção de fatores de crescimento, de interleucina-10 (IL-10), expressão de níveis elevados de arginase, e a regulação de diversos receptores, tal como o receptor de manose (CD206), estando relacionado a uma ação imunossupressora constituinte de processos de reparação tecidual e de angiogênese, (STEIN et al., 1992; BOHLSON et al., 2014; TYTECA et al., 2015) conforme ilustrado na figura 3.



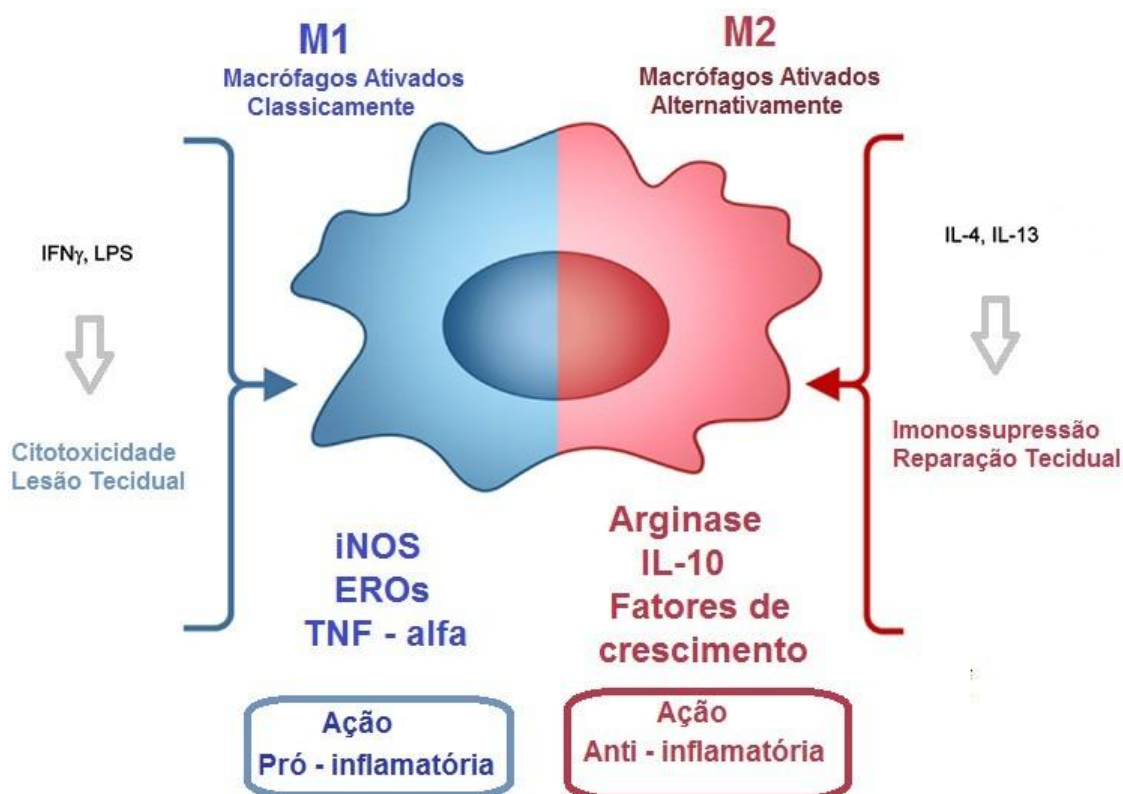


Figura 3. Extremos de ativação de macrófagos *in vitro*. Adaptado de BOHLSON *et al.*, 2014.

Alguns pesquisadores preconizam que a classificação dos macrófagos deve estar baseada na função que eles realizam na manutenção da homeostasia (MOSSER *et al.*, 2008). Logo, foi proposta a existência de três populações de macrófagos: macrófagos ativados, macrófagos de reparo tecidual e os reguladores. Os macrófagos ativados são os clássicos, que exercem uma atividade tumoricida e microbicida com propensão a secretar grandes quantidades de mediadores pró-inflamatórios, também atuam na apresentação de antígenos aos linfócitos T envolvidos com a resposta imune celular. Já os macrófagos responsáveis pelo reparo tecidual são aqueles ativados pela IL-4, responsáveis pela estimulação dos fibroblastos e o favorecimento da deposição de matriz extracelular. O terceiro tipo exibe uma ação reguladora, por meio da liberação de uma citocina anti-inflamatória, a IL-10 (MOSSER *et al.*, 2008; CRUVINEL *et al.*, 2010).

No entanto, como não há nenhum consenso, até o presente momento na literatura, a classificação M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa) é a que segue prevalecendo e será utilizada neste trabalho.

## Sistema Purinérgico

O controle da resposta inflamatória é extremamente importante para a manutenção das funções biológicas. Diferentes vias de sinalização, incluindo o sistema purinérgico, orquestram de forma integrada este complexo sistema. A sinalização purinérgica é uma rota de comunicação célula – célula, evidenciada pela atividade de purinas extracelulares (ATP, ADP e adenosina) e pirimidinas (UTP e UDP) como moléculas sinalizadoras (AGTERESCH et al., 1999; BURNSTOCK & KNIGHT, 2004). Estas moléculas exercem seus efeitos por meio da interação com receptores de membrana específicos (receptores purinérgicos ou purinoceptores) que podem estar envolvidos em diferentes processos biológicos incluindo neurotransmissão, regulação da resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação celular, morte celular, entre outros (AGTERESCH et al., 1999; BURNSTOCK, 2009).

O ATP, molécula sinalizadora do sistema purinérgico, é um nucleotídeo trifosfatado que está presente em todas as células e participa da regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular, além de ter como uma de suas principais funções a de fornecer energia para as células dos organismos vivos quando no meio intracelular (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2009). Em situações patofisiológicas, tais como lise celular, hipóxia e inflamação, concentrações aumentadas de ATP podem ser liberadas no meio extracelular e sinalizar o local danificado contribuindo para a iniciação da resposta imune (BLACKBURN et al., 2009; DI VIRGILIO et al., 2009). Além destas formas de liberação associadas ao dano celular, atualmente é reconhecido que o ATP liberado de células ilhas é também um mecanismo fisiológico (BODIN et al., 2001; LAZAROWSKI et al., 2003, 2012). O ATP não apresenta a capacidade de atravessar as membranas biológicas por difusão ou transporte ativo, logo o controle de sua concentração extracelular é mediado pela ação sistematizada de enzimas denominadas de ectonucleotidases, tanto em situações fisiológicas como patológicas (AL-RASHIDA & IQBAL, 2014). As ectonucleotidases exercem um papel-chave na

modulação da sinalização purinérgica, através de reações que catalisam a conversão de ATP até adenosina (ADO) (ROBSON et al., 2006). Essas enzimas compreendem as ecto-nucleosídeo trifosfo-difosfohidrolase (E-NTPDases), as quais catalisam a degradação sequencial de ATP em ADP e AMP; as ecto-pirofosfato-fosfodiesterases (E-NPP), que catalisam a hidrólise de ATP para AMP; as fosfatases alcalinas (ALP), que catalisam a degradação de ATP ou ADP em ADO, e de AMP para ADO e por último a ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT/CD73), que catalisa a hidrólise de AMP para ADO. Logo, essas ectoenzimas constituem uma cascata enzimática altamente eficiente, hábil em controlar a concentração e o tempo em que os nucleotídeos e nucleosídeos sinalizadores permanecem no espaço extracelular (ZIMMERMANN, 2001; FIELDS & BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2013), conforme pode ser observado na figura 4.

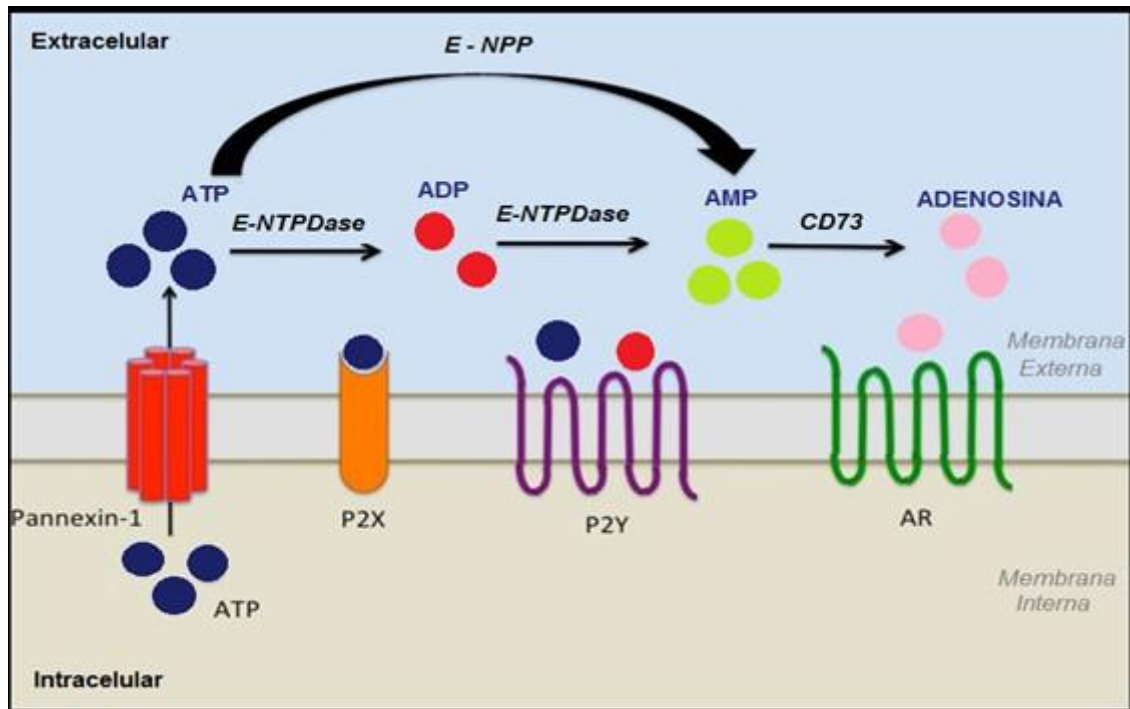


Figura 4. Representação esquemática dos elementos envolvidos na liberação de adenosina 5' - trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), adenosina e subsequente ativação da sinalização purinérgica. Ecto-pirofosfato-fosfodiesterases (E-NPP), ecto-nucleosídeotrifosfo-difosfohidrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT/CD73). Adaptado de VELASQUEZ et al., 2014.

## Sinalização Purinérgica, Resposta Imune e Inflamatória

A importância dos nucleotídeos extracelulares na interação célula-célula tem sido pesquisada minuciosamente por décadas, principalmente no SNC (sinapses neuronais), e desde então muitos aspectos da sinalização purinérgica em neurônios foram elucidados (ABBRACCHIO et al., 2009), como também no sistema cardiovascular (DRURY & SZENT-GYORGYI, 1929) enquanto que suas funções no sistema imune são ainda pouco compreendidas. Contudo, a descoberta de ações que envolvem o sistema purinérgico e células imunes tem avançado nos últimos anos, sobretudo no que diz respeito ao interesse dos pesquisadores sobre o funcionamento destes sistemas nos processos fisiopatológicos no meio extracelular (DI VIRGILIO & VUERICH, 2015).

Estudos revelam que *in vivo* o ATP está presente em altas concentrações no espaço extracelular durante a inflamação (IDZKO et al., 2007; PELLEGATTI et al., 2008; DI VIRGILIO & VUERICH, 2015), desta forma, promove o controle do processo inflamatório através da atuação de forma integrada com o sistema imunológico. Os nucleotídeos, principalmente o ATP, quando liberados para o meio extracelular, sinalizam ao sistema imune sobre a existência de dano/injúria celular que pode ser de origem endógena ou exógena (BOURS et al., 2006; DESAI et al., 2014).

Nas células T, o ATP é importante na secreção de INT- $\gamma$  e IL-2, que são mediadores fundamentais na ativação da resposta imune (LANGSTON et al., 2003). O ATP também está envolvido no recrutamento de monócitos circulantes para tecidos alvo; induz a migração e diferenciação de células dendríticas, que alteraram a resposta imune; além disto, o ATP extracelular, torna-se um importante estímulo nos macrófagos para a produção de citocinas como IL-1 $\alpha$  (Interleucina-1-alfa), IL-1 $\beta$ , IL-6 (interleucina-6), IL-18 (interleucina-18) e TNF- $\alpha$ , quando liga -se ao receptor P2X7 (receptor purinérgico ionotrópico) (GUERRA et al., 2003; LA SALA et al., 2003; LEMAIRE et al., 2003). Entretanto, a ação de

citocinas Th2 como IL-4, IL-10 leva a diminuição da expressão de receptores P2X7 em macrófagos (HUMPHREYS et al., 1996).

A adenosina, produto de degradação do ATP, também é considerada uma molécula mediadora da resposta imune (DI VIRGILIO & VUERICH, 2015), que realiza funções opostas às do ATP extracelular, ou seja, atua promovendo a angiogênese e dessa forma resulta em uma resposta imunossupressora, a fim de preservar os tecidos adjacentes à inflamação da agressão produzida pelas células de defesa (FRANTZ et al., 2005; BOURS et al., 2006). Nos macrófagos, a adenosina promove a diminuição da produção de uma citocina com ação pró-inflamatória, a IL-12, como também diminui a formação de IFN- $\gamma$ , molécula primordial na ativação de macrófagos. Por outro lado, tal nucleosídeo estimula a produção de IL-10, um fator inibidor de macrófagos ativados (HASKO & CRONSTEIN, 2004; ANTONIOLI et al., 2013).

Na superfície de monócitos e macrófagos estão presentes os receptores P2X e P2Y (receptor purinérgico metabotrópico), cujas expressões modificam de acordo com o estímulo do ambiente e o estágio de maturação celular (DI VIRGILIO et al., 2001; LEMAIRE et al., 2006; SILVA et al., 2011; DESAI et al., 2014). A liberação de elevados níveis de ATP para o meio extracelular resulta na ativação do receptor P2X7, que leva a abertura dos poros de membrana, induzindo a permeabilização das células para moléculas de até 800 Da. O receptor P2X7 também é responsável por provocar diferentes efeitos da inflamação, como a indução de apoptose, proliferação e fusão em diferentes tipos celulares (DI VIRGILIO et al., 2001; LEMAIRE et al., 2006; SILVA et al., 2011), além disso, promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-6 em macrófagos e mastócitos de humanos e ratos (DI VIRGILIO et al., 2001; BULANOVA et al., 2005; WELTER-STAHN et al., 2009).

Quando os macrófagos sofrem ação do IFN- $\gamma$ , LPS ou TNF- $\alpha$  ocorre um aumento na expressão de receptores P2X7 que estimula a adesão celular ao endotélio vascular, trajeto importante para que ocorra a produção de quimiocinas e a consequente saída dos leucócitos dos vasos sanguíneos, processo este denominado de diapedese (HUMPHREYS et al., 1996). Assim, imunomoduladores, como o ATP extracelular e seus produtos de degradação

como a adenosina, agem como sinalizadores, contribuindo para o controle da inflamação e da resposta imune (BOURS et al., 2006).

Zanin e colaboradores (2010) evidenciaram que a Hcy (*in vitro* e *in vivo*) inibiu a hidrólise de ATP e ADP em plaquetas de ratos. Além disso, em macrófagos, foi evidenciado que esse aminoácido induziu aumento na hidrólise de nucleotídeos (ZANIN et al., 2013). Do mesmo modo, outros trabalhos revelaram que o acúmulo plasmático de aminoácidos pode resultar em modulação da atividade das ectonucleotidases à qual pode estar envolvida na patofisiologia de doenças, contribuindo, por exemplo, para a ativação do processo inflamatório (BERTI, 2000; ROSEMBERG et al., 2010; SCHERER et al., 2012, ZANIN et al., 2012).

### PARTE III



## **Capítulo 1**

### **Manuscrito**

Todos os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de manuscrito.

**Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters**

Lien M. dos Santos<sup>a</sup>, Tatiane M. da Silva<sup>b</sup>, Juliana H. Azambuja<sup>a</sup>, Priscila T. Ramos<sup>a</sup>, Pathise S. Oliveira<sup>b</sup>, Elita F. da Silveira<sup>c</sup>, Nathalia S. Pedra<sup>a</sup>, Kennia Galdino<sup>a</sup>, Carlus A. T. do Couto<sup>a</sup>, Rejane G. Tavares<sup>b</sup>, Roselia M. Stefanello<sup>a</sup>, Francieli M. Stefanello<sup>b\*</sup>, Elizandra Braganhol<sup>d\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>d</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DCBS), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Corresponding Authors:

Elizandra Braganhol ([ebraganhol@ufcspa.edu.br](mailto:ebraganhol@ufcspa.edu.br))

DCBS - Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA)

Rua Sarmento Leite, 245 - Anexo I - sala 303

CEP: 90.050-170 - Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55 51 3303 9000

Francieli M. Stefanello ([fmstefanello@gmail.com](mailto:fmstefanello@gmail.com))

Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário s/n

CEP: 96160-000 - Capão do Leão, RS, Brasil

Phone: +55 53 3275 7355

## Abstract

Methionine is an essential amino acid involved in critical metabolic process and the regulation of methionine flux through the metabolism is important to supply this amino acid for cell needs. Elevation in plasma methionine commonly occurs due mutations in methionine-metabolizing enzymes, such as methionine adenosyltransferase (MAT). Hypermethioninemic patients exhibit clinical manifestations, including neuronal and liver disorders involving inflammation and tissue injury, which pathophysiology is not completely established. Here, we hypothesize that alterations in inflammatory response may contribute to the effects of hypermethioninemia. To this end, macrophage cultures were exposed to methionine and its metabolite methionine sulfoxide and macrophage polarization and inflammation-related pathways, as oxidative stress and purinergic signaling, were evaluated. We observed that methionine and/or methionine sulfoxide induced M1/classical macrophage activation, which is related to pro-inflammatory responses characterized by increased iNOS activity and TNF- $\alpha$  release. We further demonstrated that the treatment promoted alterations on redox state of macrophage cultures by differentially modulate the activity of SOD and CAT. Finally, methionine and/or methionine sulfoxide treatment also altered the extracellular nucleotide metabolism, promoting an increase of ATPase/ADPase activities in macrophages. In conclusion, these modifications contribute to a pro-inflammatory response, which may be involved in cell injury observed in patients.

## Key words

Methionine; Methionine sulfoxide; Macrophage Polarization; Redox status; Ectonucleotidases.

## 1. Introduction

Hypermethioninemia is an inborn error of amino acid metabolism commonly related to methionine adenosyltransferase (MAT) deficiency (Bjursell et al., 2011; Finkelstein, 2006; Mudd et al., 2001). As result of altered methionine metabolism, a persistent increase of this amino acid and its metabolite methionine sulfoxide is found in blood and tissues of patients (Mudd et al., 2001), leading to oxidative stress and tissue damage with inflammatory responses associated (Avila et al., 2000; Mudd et al., 2001). Hypermethioninemic patients exhibit clinical manifestations, including cognitive impairment, cerebral edema and demyelination as well as liver disorders involving inflammation and tissue injury, which pathophysiology is not completely established (Fernandéz-Irogoyen et al, 2010; Lu et al., 2001; Mudd et al., 2001).

Macrophages are key components of innate immune response, acting in almost all aspects of inflammatory processes, through its abundance, distribution, mobility and responsiveness (Laskin, 2009). Additionally, these cells are characterized by a marked heterogeneity and its activation spectrum is modulated by the microenvironment (Martinez et al., 2014). M1/classical macrophage activation (pro-inflammatory phenotype) is characterized by pro-inflammatory cytokine production, release of cytotoxic mediators as reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS), increased phagocytic and microbicidal activities, and ability to initiate an adaptive immune response. In opposite, M2/alternative macrophage activation (anti-inflammatory phenotype) is characterized by an anti-inflammatory activity, remodeling function, wound healing and tissue repair, which indicate the resolution of inflammatory response

(Gordon, 2003; Liu et al., 2014; Mantovani, 2009; Martinez and Gordon, 2014; Martinez et al., 2009; Mosser and Edwards, 2008).

Macrophages are activated in response to danger signals such as microbial products, cytokines, chemokines and mediators released by damaged cells, such as nucleotides (Di Virgilio et al., 2001; Ley et al., 2010). Indeed, ATP and adenosine are emerging as important mediators of inflammatory and immune responses via purinergic receptor activation (Bours et al., 2006; Desai and Leitingner, 2014). ATP acts as a pro-inflammatory molecule by stimulating the recruitment of immune cells to damage tissue and by inducing the release of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  (Bours et al., 2006; La Sala et al., 2003; Lemaire and Leduc, 2003). In contrast, adenosine, the breakdown product of ATP hydrolysis, has opposite effects, acting as anti-inflammatory and immunosuppressive molecule. For example, this nucleoside has been known to affect TNF- $\alpha$  secretion and increases IL-10 production in macrophages (Antonioli et al., 2013; Hasko and Crostein, 2004). Purinergic receptor activation is controlled by ectonucleotidases, including members of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family and the ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73), which efficiently hydrolyze extracellular nucleotides to respective nucleosides in the extracellular space (Robson et al., 2006; Longhi et al., 2013).

Although inflammatory complications have been observed in hypermethioninemic patients, little is known with regard to methionine and its metabolite methionine sulfoxide ability to modulate the macrophage activation. Therefore, in the present study we investigated the *in vitro* effect of methionine and/or methionine sulfoxide in mouse macrophage phenotype and evaluated some inflammatory parameters associated as oxidative stress and ectonucleotidase activity.

The potential contribution of methionine and/or methionine sulfoxide-activated macrophages in the pathophysiology of hypermethioninemia is further discussed.

## **2. Materials and Methods**

### *Chemicals*

Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), fetal bovine serum were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Nucleotides (ATP, ADP, AMP), methionine and methionine sulfoxide were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Cytokine kits were provided by R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

### *Animals*

Swiss male mice (8 weeks-old) were maintained under a standard dark–light cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.) at room-controlled temperature ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). The mice had free access to standard laboratory chow and water. All procedures used in the present study followed the “Principles of Laboratory Animal Care” of the National Institutes of Health and were approved by the Ethical Committee of UFPel (protocol number 9221).

### *Macrophage cultures and differential macrophage phenotype activation.*

Macrophages were collected by lavage of peritoneal cavity with 5 mL of sterile RPMI 1640 fetal bovine serum (FBS)-free medium. The cells were washed twice with sterile PBS and suspended in RPMI 1640 FBS-free medium. Cells obtained were then

transferred to 6 or 48 multiwell plates and allowed to attach for 30 min in cell incubator (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Unattached cells were washed out with RPMI 1640 FBS-free medium. Attached cells, mainly peritoneal macrophages, were used for the experiments thereafter. The obtained macrophages were treated for 18 h with methionine (1mM), methionine sulfoxide (0.5 mM) and both in combination (1mM +0.5 mM) in complete medium (RPMI 1640/10% FBS), to evaluate differential macrophage phenotype activation. Macrophages stimulated with LPS (100 ng/mL) or IL-4 (10 ng/mL) were applied as positive controls of classically or alternative macrophage activation, respectively (Gordon, 2003). Macrophage culture purity was evaluated by images captured using a digital camera connected to an inverted microscope (Olympus IX71, Japan).

#### *Nitrite and arginase assays*

Nitrite concentrations were measured using the Greiss reaction (Stuehr and Nathan, 1989). In brief, 200 µL of the tested cell medium were incubated with 100 µL of 1% sulfanilamide and 100 µL of 0.3% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride at room temperature for 5 min. Nitrite was quantified by spectrophotometry at 540 nm using sodium nitrite as standard. The results were expressed as µM per mg of protein.

Arginase activity in cell lysates was measured based on the conversion of L-arginine to L-ornithine and urea according to the technique described by Corraliza and collaborators (1994) with minor modifications. Briefly, cells were lysed for 30 min with 40 µL of 0,1 % Triton X-100. Thirty microliters of 25 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 10 µL of 10 mM MnCl<sub>2</sub> were added and the enzyme was heat-activated for 10 min at 56°C. Similar amounts of samples (40 µL) and 0.5 M L-arginine (pH 9.7) were mixed and incubated for 1 h at 37°C. The reaction was stopped by adding 400 µL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%),

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%), H<sub>2</sub>O (1/3/7, v/v/v). The urea concentration was measured at 540 nm after the addition of 8 µL of α-isonitropropiophenone 6%, followed by heating at 95°C for 30 min. Values were compared with a standard curve of urea concentration and they were expressed as nmol urea per min per mg protein.

#### *Cytokine release determination*

TNF- and IL-10 secreted by macrophage cultures were quantified in the conditioned media of these cells by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). Mouse recombinant TNF- or IL-10 was used as a standard. Results were expressed as ng of cytokine per mL.

#### *Determination of SOD, CAT and GPx activities*

##### *Catalase (CAT) assay*

CAT activity was assayed according to Aebi (1984) based on the decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> monitored at 240 nm at room temperature. One CAT unit is defined as one µmol of hydrogen peroxide consumed per minute. Results were expressed as percentage of control.

##### *Superoxide dismutase (SOD) assay*

SOD activity was measured by the method described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer adjusted at 480 nm. Results were expressed as percentage of control.

##### *Glutathione peroxidase (GPx) assay*



GPx activity was measured by using a commercially available kit (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, United Kingdom). Results were expressed as percentage of control.

#### *Ectonucleotidase Assay*

ATPase, ADPase and AMPase activities were evaluated in 48 well plates containing macrophages that were washed three times with phosphate-free incubation medium in absence of nucleotides. The enzymatic reaction was started by the addition of 200  $\mu$ L of incubation medium containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$  (2 mM  $\text{MgCl}_2$  for AMPase assay), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes (pH 7.4) and 2 mM ATP, ADP or AMP as substrates. Following 10 min incubation at 37°C, the reaction was stopped by transferring an aliquot of the incubation medium to a pre-chilled tube containing trichloroacetic acid (final concentration 5% w/v). The release of inorganic phosphate ( $\text{P}_i$ ) was measured by the malachite green method (Chan et al., 1986), using  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as a  $\text{P}_i$  standard. Controls to determine non-enzymatic  $\text{P}_i$  release were performed by incubating the cells in the absence of the substrate, or the substrate in the absence of the cells. All samples were run in triplicate. Specific activity was expressed as nmol  $\text{P}_i$  released/min/mg of protein.

#### *Protein determination*

The protein concentration was measured by the method of Bradford (1976) or Lowry et al. (1951).

#### *Statistical Analysis*

Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. and were subjected to one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post hoc* test (for multiple comparisons). Differences between mean values were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

*Methionine and/or methionine sulfoxide treatment alters macrophage cell shape and induces M1/classical macrophage polarization*

Cell shape, biochemical profile and cytokine changes have been associated with different functional states of M1/classical and M2/alternative macrophage polarization (Jay et al., 20017; Martinez and Gordon, 2014; McWhorter et al., 2013; Waldo et al., 2008). To explore whether methionine and/or methionine sulfoxide treatment may play a role in the phenotypic polarization of macrophages, the cells were cultured on multiwell plates and they were exposed to 1 mM methionine and/or 0.5 mM methionine sulfoxide, which represent the concentrations found in human blood [2, 33-36]. Macrophages exposed to LPS (10 ng/mL) or IL-4 (10 ng/mL) were applied as positive controls to M1/classical and M2/alternative macrophage polarization, respectively. Following 18 h of stimulation, the macrophage polarization was evaluated by analysis of cell morphology, iNOS and arginase activities and TNF- $\alpha$  and IL-10 cytokine release. As shown in Figure 1, exposition of macrophages to methionine, methionine sulfoxide, or its combination (mix) promoted significant morphological alterations, making cells to flatten into a round, pancake-like shape. In addition, methionine, methionine sulfoxide and mix promoted an increase of 1.95, 2.2 and 1.82 times of iNOS

activity, respectively (Fig. 2A) and 4.7, 3.7 and 2.6 times of TNF- $\alpha$ , respectively (Fig. 2C) when compared to controls, whereas arginase (Fig. 2B) and IL-10 secretion (Fig. 2D) were not significantly altered at same condition. Taken together, these data suggest that the methionine and/or methionine sulfoxide treatment is associated with the M1/classical macrophage polarization.

*Methionine and/or methionine sulfoxide modulate antioxidant enzyme activity in macrophage cultures*

To better understand the potential of methionine and/or methionine sulfoxide to modulate M1/classical macrophage polarization, we examined the metabolism of reactive oxygen species in cultured macrophages, which has been implicated in pro-inflammatory signaling (Bohlson et al., 2014; Forman and Torres, 2001; Laskin, 2009; Oliveira et al., 2006; Tyteca et al., 2015). Macrophage cultures were exposed to methionine and/or methionine sulfoxide for 18 h as described above and the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) was determined as described in material and methods. As shown in Figure 3, the treatment with methionine promoted an increase of ~89% of SOD activity, while the methionine sulfoxide alone or in combination with methionine reduced in ~70% its activity (Fig. 3A). In addition, the CAT activity was also altered by the treatments, where methionine, methionine sulfoxide or both in combination reduced in 50%, 20% and 45% the enzyme activity, respectively (Fig. 3B). By other side, GPx activity was not modified by treatment (Fig. 3C). These results show that methionine and methionine sulfoxide modulated differentially the activity of enzymes of antioxidant system and point that the treatments may collaborate to microenvironment enriched in free radicals, which is related to a pro-inflammatory state.

*Methionine and/or methionine sulfoxide treatment alter the extracellular nucleotide metabolism in macrophage cultures*

Given that purinergic signaling play an important role in immune/inflammatory responses and that polarized macrophages are likely to be subjected to extracellular nucleotide modulation *in vivo* microenvironment (Lévesque et al., 2010; Zanin et al., 2012), we examine the methionine and/or methionine sulfoxide effect on ectonucleotidase activities (Fig. 4). Macrophages were cultured and exposed to methionine and/or methionine sulfoxide for 18 h and the ATP, ADP and AMP hydrolysis was evaluated. We found that the macrophage stimulation with methionine sulfoxide alone or in combination with methionine promoted an increase of around 57% and 60% of ATP and ADP hydrolysis, respectively, when compared to control (Fig. 4A and 4B). By other hand, the AMP hydrolysis was not changed (Fig. 4C). This enzyme profile suggests that methionine sulfoxide and its combination with methionine modulates the activity of NTPDase1, which is the main ectonucleotidase expressed by macrophages and that, by hydrolyzing ATP and ADP, regulates the purinergic receptor activation in activated macrophages (Lévesque et al., 2010).

#### **4. Discussion**

The present work demonstrates a novel role of methionine and its metabolite methionine sulfoxide as modulators of macrophage phenotype and inflammatory process. First we evaluated the effect of these compounds on macrophage polarization. We observed that both molecules induced M1/classical macrophage activation, which is related to pro-inflammatory responses characterized by increased iNOS activity and TNF- $\alpha$  release. We further demonstrated that the treatment promoted alterations on

redox state of macrophage cultures by differentially modulate the activity of SOD and CAT. Finally, methionine and/or methionine sulfoxide treatment also altered the extracellular nucleotide metabolism, promoting an increase of ATPase/ADPase activities in macrophages. Such modifications contribute to a pro-inflammatory response.

Methionine is an essential amino acid involved in critical metabolic process, including protein synthesis, sulfur metabolism, methylation, redox regulation and signal transduction (Mudd et al., 2001). However, mammals are not able to synthesize this amino acid, whose only sources are diet and recycling (Yamada et al., 2012). Therefore, the regulation of methionine flux through the metabolism is important to supply this amino acid for cell needs. Elevation in plasma methionine commonly occurs due mutations in genes encoding methionine-metabolizing enzymes, such as MAT (Fernández-Irigoyen et al., 2010; Hirabayashi et al., 2013; Mudd et al., 2001; Stefanello et al., 2007). In this work, we hypothesize that alterations in inflammatory response may contribute to the pathophysiology of hypermethioninemia. To this end, macrophage cultures were exposed to methionine and its metabolite methionine sulfoxide and macrophage polarization and inflammation-related pathways, as oxidative stress and purinergic signaling, were evaluated. The treatment with methionine and/or methionine sulfoxide polarized the macrophages to a M1/classical phenotype, which is pro-inflammatory and in general is associated with tissue injury and inflammation. Recently was reported that methionine affects the immune status by improving the innate immune response to inflammation (Machado et al., 2015). In addition, these results are in according to symptoms exhibited by hypermethioninemic patients and changes in the macrophage activation may explain the diseases associated to high methionine and methionine sulfoxide levels as liver disorders (Costa et al., 2013; Fernández-Irigoyen et

al., 2010; Mudd et al., 2001), neurological abnormalities and brain demyelization (Chamberlin et al., 1996; Furujo et al., 2012; Martinov et al., 2010; Mudd et al., 2001).

Regarding to the enzymatic antioxidant defense system, interestingly methionine and/or methionine sulfoxide treatment differentially modulated the SOD activity in macrophages. Methionine induced an increase of SOD activity while methionine sulfoxide alone or in combination with methionine had the opposite effect. Moreover, CAT activity was decreased by all treatments, while GPx activity remained unchanged. Although we cannot determine precisely the mechanisms by which the methionine and/or methionine sulfoxide alter the activity of these enzymes, our results are in according to literature which has described that these molecules modulate the redox state of cells (Costa et al., 2013; Stefanello et al., 2009). In addition, the alteration in SOD and CAT activities suggest a possible accumulation of ROS in the macrophage environment, which has been related to induce pro-inflammatory cytokine release and sterile inflammation (Pelletier et al., 2013). Taken together, these data are in according to M1/classical macrophage polarization.

Mounting evidence links the activation of extracellular nucleotide signaling and immune/inflammatory response (Bours et al., 2006). ATP acts as a danger signal during inflammation and, in combination with LPS, trigger the IL-1 $\beta$  release in macrophages (Solle et al., 2001). In addition, changes in the expression of ectonucleotidases during phenotypic differentiation allow the macrophages to adjust their functions during the inflammatory set (Levésque et al., 2010). Here we observed that methionine sulfoxide alone or in combination with methionine increased the ATPase/ADPase activity in macrophages, while the AMPase activity was not altered by the treatment. The enzyme activity profile is consistent with NTPDase1 expression, which has been described as the main NTPDase present in macrophages (Levésque et al., 2010). Since the ATP

exocytosis is required for macrophage activation via P<sub>2</sub>Y<sub>11</sub> sensitization (Sakaki et al., 2013) but, by the other side, high ATP concentration may induce cell death via P2X7 activation, we suggest that the increase of ATPase/ADPase activities is a compensatory mechanism to maintain the macrophage activation and to protect it from cell death. Indeed, NTPDase1 plays a key role in the control of P2X7 dependent macrophage responses (Levésque et al., 2010). In addition, the ectonucleotidase activity of macrophages may be modulated by oxidative/nitrosative stress followed methionine and methionine sulfoxide treatment, as the ectonucleotidase activity can be altered by free radicals (Vuaden et al., 2014).

In summary, our results demonstrate that methionine and/or methionine sulfoxide induced M1/classical macrophage polarization. The pro-inflammatory macrophage phenotype involved the increase of iNOS activity and the TNF- release. In line with this, alterations in oxidative stress and purinergic signaling parameters are in accordance to the pro-inflammatory environment of macrophages exposed to methionine and methionine sulfoxide. Although further studies are necessary to examine the mechanisms involved in the macrophage polarization induced by methionine and methionine sulfoxide in an *in vivo* hypermethioninemia model, the data reported here reinforce the hypothesis that these molecules induce a pro-inflammatory response that could play an important role on cell injury observed in patients. Therefore, novel therapeutic strategies taking into account the participation of inflammatory process in the pathophysiology of hypermethioninemia may be employed to offer alternatives to patients.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Universal Processo nº: 454262/2014-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). T.M. da Silva, J.H. Azambuja, P.T. Ramos, N.S. Pedra, P.S. Oliveira, E.F. da Silveira, K. Galdino, C.A.T. do Couto were recipients of CNPq or CAPES fellowship.

## References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., Hasko, G., 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trend. Mol. Med.* 19, 355–367.
- Augoustides-Savvopoulou, P., Luka, Z., Karyda, S., Stabler, S.P., Allen, R.H., Patsiaoura, K., Wagner, C., Mudd, S.H., 2003. Glycine N-methyltransferase deficiency: a new patient with a novel mutation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 26, 745–759.
- 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., 2000. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 33, 907-914.
- Bjursell, M. K., Blom, H. J., Cayuela, J. A., Engvall, M. L., Lesko, N., Balasubramaniam, S., [Brandberg](#), G., [Halldin](#), M., [Falkenberg](#), M., [Jakobs](#), C., [Smith](#), D., [Struys](#), E., [Von Döbeln](#), U., [Gustafsson](#), C.M., [Lundeberg](#), J., Wedell, A., 2011. Adenosine Kinase Deficiency Disrupts the Methionine Cycle and Causes



Hypermethioninemia, Encephalopathy, and Abnormal Liver Function. *Am. J. Hum. Genet.* 89(4), 507–515.

Bohlson, S.S., O’Conner, S.D., Hulsebus, H.J., HO, M-M., Fraser, D.A., 2014. Complement, C1q, and C1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front. Immunol.* 5, 402.

Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C., 2006. Adenosine 50 -triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 112, 358–404.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254.

Chamberlin, M.E., Ubagai, T., Mudd, S.H., Wilson, W.L., Leonard, J.V., Chou, J.Y., 1996. Demyelination of the brain is association with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *J. Clin. Invest.* 98, 1021-1027.

Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$  -stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.

Corraliza, I.M., Campo, M.L., Soler, G., Modolell, M., 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods.* 174, 231–235.

Costa, M.Z., Da Silva, T.M., Flores, N.P., Schmitz, F., Da Silva Scherer, E.B., Viau, C.M., Saffi, J., Barschak, A.G., De Souza Wyse, A.T., Spanevello, R.M., Stefanello, F.M., 2013. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol. Cel. Biochem.* 384, 21-28.

Desai, B.N., Leitinger, N., 2014. Purinergic and Calcium Signaling in Macrophage Function and Plasticity. *Front. Immunol.* 5, 580.

- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morrelli, A., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., Baricordi, O.R., 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 97, 587-600.
- Fernández-Irigoyen, J., Santamaría, E., Chien, Y.H., Hwu, W.L., Korman, S.H., Faghfoury, H., Schulz, A., Hoganson, G.E., Stable, S.P., Allen, R.H., Wagner, C., Mudd, S.H., Corrales, F.J., 2010. Enzymatic activity of methionine adenosyltransferase variants identified in patients with persistent hypermethioninemia. *Mol. Genet. Metab.* 101, 172–177.
- Finkelstein, J. D., 2006. Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. *J. Nutr.* 136, 1750S-1753S.
- Forman, H.J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.* 22, 189–216.
- Furujo, M., Kinoshita, M., Nagao, M., Kubo, T., 2012. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: Neurological manifestations and relevance of S-adenosylmethionine. *Mol. Genet. Metab.* 107, 253-256.
- Gordon, S., 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23-25.
- Hasko, G., Cronstein, B.N., 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunology.* 25, 33–39.
- Hirabayashi, K., Shiohara, M., Yamada, K., Sueki, A., Ide, Y., Takeuchi, K., Hagimoto, R., Kinoshita, T., Yabuhara, A., Mudd, S.H., Koike, K., 2013. Neurologically normal development of a patient with severe methionine adenosyltransferase I/III deficiency after continuing dietary methionine restriction. *Gene.* 530, 104-108.

- Jay, S.M., Skokos, E., Laiwalla, F., Krady, M.M., Kyriakides, T.R., 2007. Foreign body giant cell formation is preceded by lamellipodia formation and can be attenuated by inhibition of Rac1 activation. *Am. J. Pathol.* 171, 632–640.
- La Sala, A., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., Girolomoni, G., 2003. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.* 73, 339-343.
- Laskin, D. L., 2009. Macrophages and Inflammatory Mediators in Chemical Toxicity: A Battle of Forces. *Chem. Res. Toxicol.* 22(8), 1376–1385.
- Lemaire, I., Leduc, N., 2003. Purinergic P2X7 receptor function in lung alveolar macrophages: pharmacologic characterization and bidirectional regulation by Th1 and Th2 cytokines. *Drug Development Research.* 59, 118–127.
- Lévesque, S.A., Kukulski, F., Enjyoji, K., Robson, S.C., Sévigny, J., 2010. NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 40, 1473–1485.
- Ley, S., Weigert, A., Brune, B., 2010. Neuromediators in inflammation--a macrophage/nerve connection. *Immunobiology.* 215, 674–684.
- Liu, Y.C., Zou, X.B., Chai, Y.F., Yao, Y.M., 2014. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 10, 520-529.
- Longhi, M. S., Robson, S.C., Bernstein, S.H., Serra, S., Deaglio, S., 2013. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J. Mol. Med.* 91, 165-72.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, (1):265-275.
- Lu, S.C., Alvarez, L., Huang, Z.Z., Chen, L., An, W., Corrales, F.J., Avila, M.A., Kanel, G., & Mato, J.M., 2001. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are

predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 5560–5565.

Machado, M., Azeredo, R., DíazRosales, P., Afonso, A., Peres, H., OlivaTeles, A., Costas, B., 2015. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 353-62.

Mantovani, A., 2009. Orchestration of macrophage polarization. *Blood.* 114, 3135-3136.

Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep.* 6, 6 – 13.

Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451-483.

Martinov, M.V., Vitvitsky, V.M., Banerjee, R., Ataulakhanov, F.I., 2010. The Logic of the Hepatic Methionine Metabolic Cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1804(1), 89-96.

McWhorter, F.Y., Wang, T., Nguyen, P., Chung, T., Liu, W.F., 2013. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 17253-17258.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.

Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophages activation. *Nature Reviews. Immunology.* 8, 958-969.

Mudd, S.H., Levy, H.L., Kraus, J.P., 2001. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill, 8 ed, pp. 2007–2056.

- Oliveira, C.C., Oliveira, S.M., Godoy, L.M.F., Gabardo, J., Buchi, D.F., 2006. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. *J. Infect.* 52, 420–432.
- Ozias, M.K., Schalinske, K.L., 2003. All-trans-retinoic acid rapidly induces glycine N-methyltransferase in a dose-dependent manner and reduces circulating methionine and homocysteine levels in rats. *J. Nutr.* 133, 4090–4094.
- Pelletier, M., Lepow, T.S., Billingham, L.K., Murphy, M.P., Siegel, R.M., 2013. New tricks from an old dog: mitochondrial redox signaling in cellular inflammation. *Semin. Immunol.* 24, 384–392.
- Robson, S.C., Sévigny, J., Zimmermann, H., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic. Signal.* 2, 409–430.
- Sakaki, H., Tsukimoto, M., Harada, H., Moriyama, Y., Kojima, S., 2013. Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. *PLoS One.* 8, 59778.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., Gabel, C.A., 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 125–32.
- Stefanello, F.M., Matté S, Scherer EB, Wannmacher CMD, Wajner M, Angela Wyse ATS (2007) Chemically induced model of hypermethioninemia in rats Volume. *J. Neurosci. Methods* 160:1–4.
- Stefanello, F.M., Matté, C., Pederzoli, C.D., Kolling, J., Mescka, C.P., Lamers, M.L., De Assis, A.M., Perry, M.L., Dos Santos, M.F., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., 2009. Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. *Biochimie.* 91, 961–968.

Stuehr, D.J., Nathan, C.F., 1989. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169, 1543–1555.

Tyteca, D., Nishino, T., Debaix, H., Van Der Smissen, P., N’Kuli, F., Hoffmann, D., Cnops, Y., Rabolli, V., Loo, G.V., Beyaert, R., Huaux, F., Devuyst, O., Courtoy, P.J., 2015. Regulation of Macrophage Motility by the Water Channel Aquaporin-1: Crucial Role of M0/M2 Phenotype Switch. *PlosOne*. 10, 2.

Vuaden, F.C., Savio, L.E., Rico, E.P., Mussulini, B.H., Rosemberg, D.B., de Oliveira, D.L., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Wyse, A.T., 2014. Methionine Exposure Alters Glutamate Uptake and Adenine Nucleotide Hydrolysis in the Zebrafish Brain. *Mol. Neurobiol.*

Waldo, S.W., Li, Y., Buono, C., Zhao, B., Billings, E.M., Chang, J., Kruth, H.S., 2008. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* 172, 1112–1126.

Yamada, H., Akahoshia, N., Kamatad, S., Hagiya, Y., Hishikia, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Takanoc, N., Morib, M., Ishizaki, Y., Izumi, T., Kumagaie, Y., Kasahara, T., Suematsu, M., Ishii, I., 2012. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine  $\gamma$ -lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1716–1726.

Zanin, R.F., Braganhol, E., Bergamin, L.S., Campesato, L.F., Filho, A.Z., Moreira, J.C., Morrone, F.B., Sevigny, J., Schetinger, M.R., de Souza Wyse, A.T., Battastini, A.M., 2012. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One* 7, e31205.

## Figure legends

**Figure 1.** Representative images of macrophages exposed to methionine and/or methionine sulfoxide. Cell cultures were exposed to methionine (1 mM) and/or methionine sulfoxide (0.5 mM) and after 18 h of treatment and phase contrast microphotographs were taken using an Olympus inverted microscope. Arrows indicate morphologic changes in macrophages following treatment (20x magnification).

**Figure 2.** Characterization of macrophage phenotype following methionine and/or methionine sulfoxide treatment. Macrophages were exposed to methionine (Met), methionine sulfoxide (MetO) or both (Mix) for 18 h and the cell polarization was evaluated as follow: (A) iNOS and (B) arginase activities: iNOS was estimated by the  $\text{NO}^{-2}$  (nitrite) accumulation in the supernatant of cultured cells and arginase activity was evaluated by measuring the formation of urea from arginine. (C) TNF and (D) IL-10 cytokines were measured from supernatants of macrophage cultures by ELISA. The values represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). \*Significantly different from control cells ( $P < 0.05$ ).

INCLUIR \*\* e \*\*\*

**Figure 3.** Analysis of antioxidant-related enzymes in methionine and/or methionine sulfoxide- treated macrophages. Macrophages were exposed to methionine (Met), methionine sulfoxide (MetO) or both (Mix) as described above and the activity of (A) Superoxide dismutase (SOD); (B) Catalase (CAT) and (C) Glutathione peroxidase (GPx) were evaluated as described in material and methods. The values represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). \*Significantly different from control cells ( $P < 0.05$ ). **inclair \*\*\***

**Figure 4.** Evaluation of ectonucleotidase activity in methionine and/or methionine sulfoxide- treated macrophages. Macrophages were exposed to methionine (Met), methionine sulfoxide (MetO) or both (Mix) as described above and the hydrolysis of (A) ATP; (B) ADP and (C) AMP were evaluated by malaquite green method as described in material and methods. The values represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). \*Significantly different from control cells ( $P < 0.05$ ).



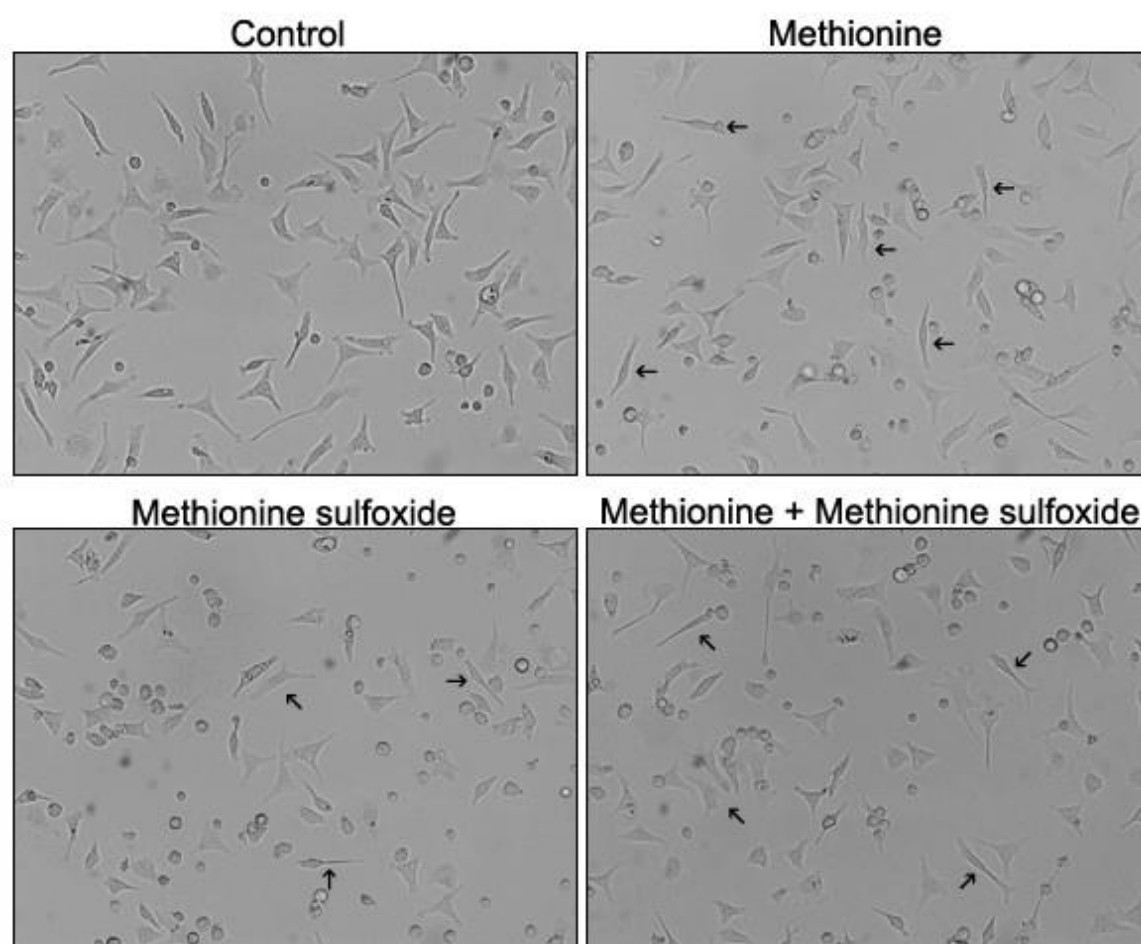
**Figure 1**

Figure 2

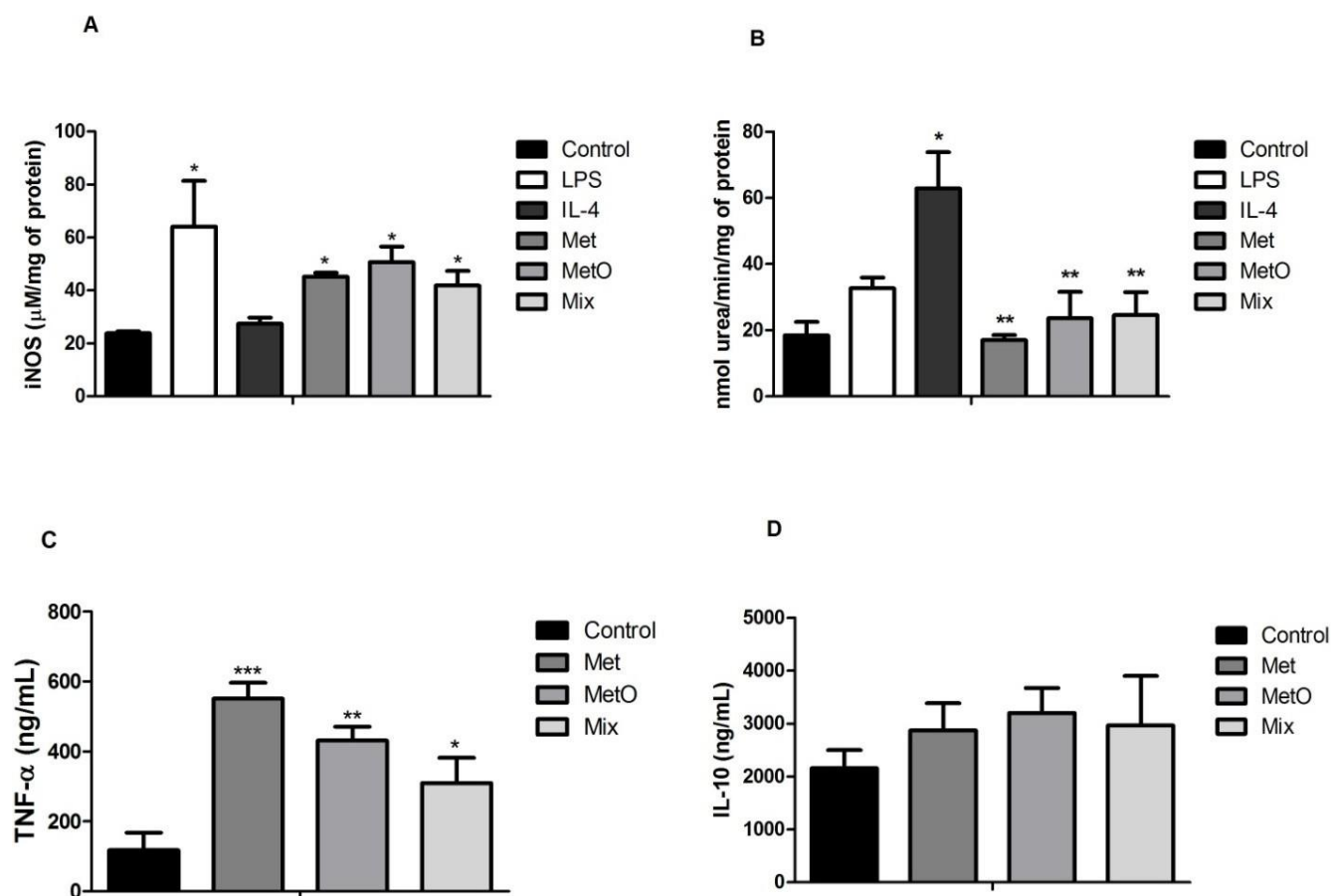


Figure 3

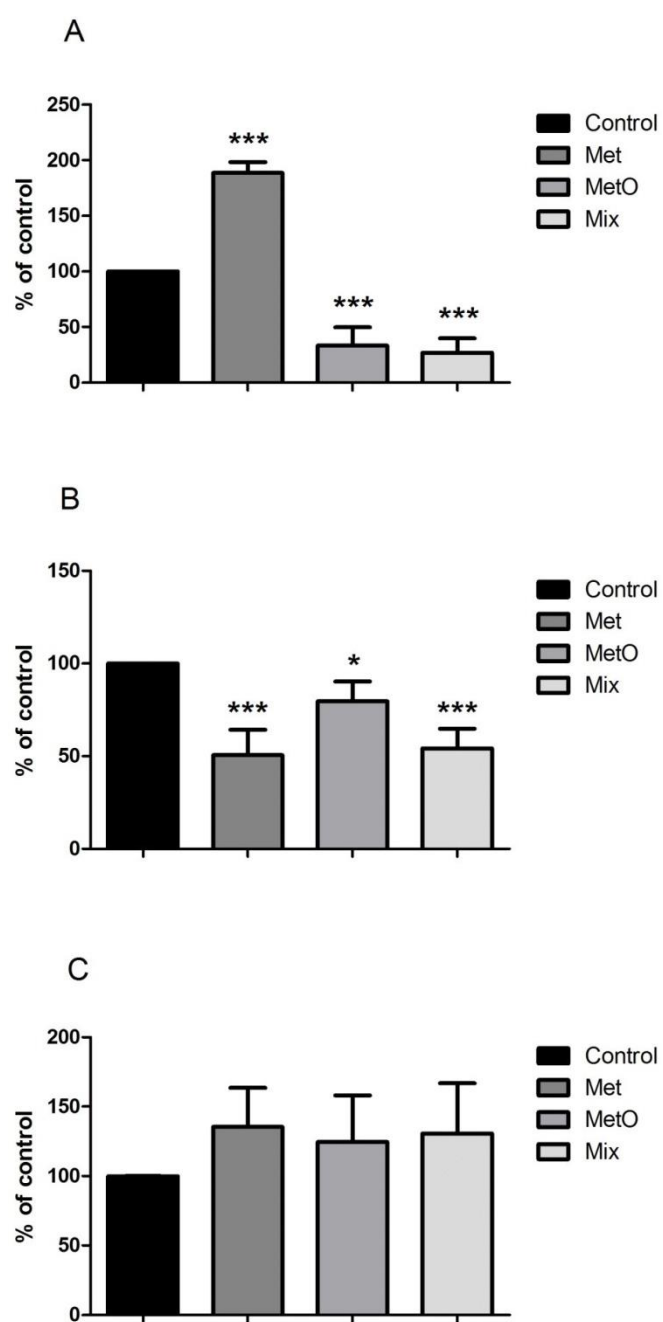
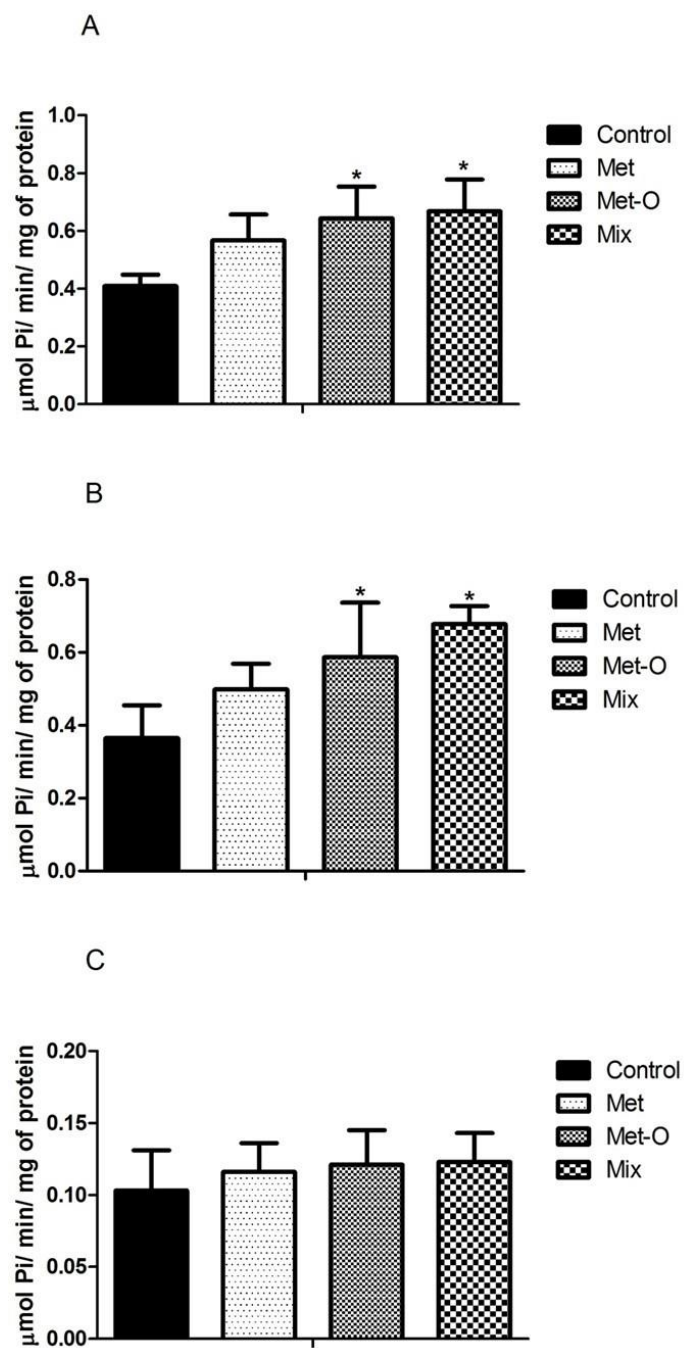


Figure 4



## PARTE IV

## Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos foi possível observar que:

- O tratamento *in vitro* de macrófagos com metionina e/ou metionina sulfóxido induziu o fenótipo de ativação M1/clássica, a qual se relaciona com as respostas pró-inflamatórias caracterizadas pelo aumento da atividade de iNOS e pela liberação de TNF- $\alpha$ .
- O tratamento *in vitro* de macrófagos com metionina e/ou metionina sulfóxido promoveu alterações no estado redox de cultura de macrófagos por modular diferencialmente a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nestas células. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas da atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx).
- Da mesma forma, foi possível observar que a exposição dos macrófagos *in vitro* a altas concentrações de metionina sulfóxido (0.5 mM) isoladamente ou em combinação com a metionina (1mM) aumentou significativamente a atividade ATPásica e ADPásica nestas células. Este perfil sugere que a metionina e/ou metionina sulfóxido modula a atividade de NTPDase1, que é a principal ectonucleotidase expressa por macrófagos e que, por hidrolisar ATP e ADP de forma equivalente, regula a ativação do receptor purinérgico P2X7 e a liberação de IL-1 $\beta$ , através da ativação clássica M1/pró-inflamatória em macrófagos.

Em conjunto, nossos achados podem contribuir para elucidar o papel da metionina e do seu metabólito metionina sulfóxido sobre as respostas do sistema imune/ inflamatório. Além disso, a ativação dos macrófagos pode estar relacionada com os danos neurológicos e hepáticos que envolvem a inflamação

e estresse oxidativo, reservados em pacientes hipermetioninêmicos. Dentro deste contexto, mais estudos em modelo *in vivo* são necessários, a fim de comprovar esta hipótese.

## Referências

- ABBAS, Abul. K.; Lichtman, Andrew. H.; Pillai, Shiv. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2008. 564 p.
- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, v. 32, p. 19–29, 2009.
- AGTERESCH, H.J.; DAGNELIE, P.C.; VAN DEN BERG, J. W.; WILSON, J.H. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**, v. 58, p. 211-232, 1999.
- AL-RASHIDA, M.; IQBAL, J. Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 4, p. 703- 743, 2014.
- AMÂNCIO, F.A.M.; SCALCO, F.B.; COELHO, C.A.R.; Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo em um hospital universitário. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v.43, n.3, p.169-174, 2007.
- ANTONIOLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E.S.; HASKO, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, p. 355–367, 2013.
- BERTI, Simone Luisa. **Efeitos da fenilalanina, fenilpiruvato e alanina sobre as atividades da ATP-difosfohidrolase (EC 3.6.1.5) e 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos**, 2000. 63 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.



BJURSELL, M.K.; BLOM, H.J.; CAYUELA, J.A.; ENGVALL, M.L.; LESKO, N.; BALASUBRAMANIAM, S.; BRANDBERG, G.; HALLDIN, M.; FALKENBERG, M.; JAKOBS, C.; SMITH, D.; STRUYS, E.; DOBELN, U.V.; GUSTAFSSON, C.M.; LUNDEBERG, J.; WEDELL, A. Adenosine kinase deficiency disrupts the methionine cycle and causes hypermethioninemia, encephalopathy, and abnormal liver function. **The American Journal of Human Genetics**, v.89, p.507–515, 2011.

BLACKBURN, M.R.; VANCE, C.O.; MORSCHL, E.; WILSON, C.N. Adenosine receptors and inflammation. **Handb Exp Pharmacol**, v. 193, p. 215-69, 2009.

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: ATP release. **Neurochemical Research**, v.26, n. 8–9, p. 959–969, 2001.

BOHLSON, S. S.; O'CONNER, S. D.; HULSEBUS, H. J.; HO, M-M.; FRASER, D. A. Complement, C1q, and C1q-related molecules regulate macrophage polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p.402, 2014.

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

BULANOVA, E.; BUDAGIAN, V.; ORINSKA, Z.; HEIN, M.; PETERSEN, F.; THON, L.; ADAM, D.; BULFONE-PAUS, S. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. **Journal of Immunology**, V. 174, p. 3880–3890, 2005.

BURNSTOCK, G. Introduction and perspective, historical note. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.7, p. 227, 2013.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: past, present and future. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, n.1, p.3-8. 2009.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p.231-304, 2004.

CAMP, K.M.; LLOYD-PURYEAR, M.A.; HUNTINGTON, K.L. Nutritional treatment for inborn errors of metabolism: Indications, regulations, and availability of medical foods and dietary supplements using phenylketonuria as an example. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 107, p. 3–9, 2012.

CHAMBERLIN, M. E.; UBAGAI, T.; MUDD2, S, H.; THOMAS, J.; PAO, V, Y.; NGUYEN, T, H.; LEVY, T, L.; GREENE, C.; FREEHAUF, C.; CHOU, J, Y. Methionine Adenosyltransferase I/III Deficiency: Novel Mutations and Clinical Variations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 66, p. 347-355, 2000.

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

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

COLTON, C.A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immuneresponse in the brain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 4, p.399-418, 2009.

COSTA, M.Z.; DA SILVA, T.M.; FLORES, N.P.; SCHMITZ, F.; DA SILVA SCHERER, E.B.; VIAU, C.M., SAFFI, J.; BARSCHAK, A.G.; DE SOUZA 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, p. 21-28, 2013.

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, p.218–221, 2013.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M; ARAÚJO, J. A. P.; CATELANIV, T. T. T.; DE SOUZA, A. W. S.; DA SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DESAI, B. N.; LEITINGER, N. Purinergic and Calcium Signaling in Macrophage Function and Plasticity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 580, 2014.

DEY, A.; ALLEN, J.; HANKEY-GIBLIN, P.A. Ontogeny and Polarization of Macrophages in Inflammation: Blood Monocytes versus Tissue Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v.5, p. 683, 2014.

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

DI VIRGILIO, F.; CERUTI, S.; BRAMANTI, P.; ABBRACCHIO, M.P. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 32, p.79-87, 2009.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, p. 587–600, 2001.

Di Virgilio, F., Vuerich, M., Purinergic signaling in the immune system, Autonomic Neuroscience. (2015), Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.011>>. Acesso em: 26 Jul.2015.

DRURY, A.N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **The Journal of Physiology**, v.68, n.3, p.213-37, 1929.

EL HUSNY, A.S.; FERNANDES-CALDATO, M. C. Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. **Revista Paranaense de Medicina**, v.20, p.41-45, 2006.

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

ENGELHART, M.J.; GEERLINGS, M.I.; MEIJER, J.; KILIAAN, A.; RUITENBERG, A.; VAN SWIETEN, J.C.; STIJNEN, T.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J.C.; BRETELER, M.M. Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study. **Archives of neurology**, v. 61, p.668-72, 2004.

FERNÁNDEZ-IRIGOYEN, J.; SANTAMARÍA, E.; CHIEN, Y.H.; 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, p.172–177, 2010.

FERREIRA, A.G.; DA CUNHA, A.A.; SCHERER, E.B.; MACHADO, F.R.; DA CUNHA, M.J.; BRAGA, A.; MUSSULINI, B.H.; MOREIRA, J.D.; WOFCHUK, S.; SOUZA, D.O.; WYSE, A.T. Evidence that hyperprolinemia alters glutamatergic

homeostasis in rat brain: neuroprotector effect of guanosine. **Neurochemical Research**, v 37, p.205-13, 2012.

FIELDS, R.D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 423-436, 2006.

FINDELSTEIN, J.D. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, p.1694-1699, 2007.

FRANTZ, S.; VINCENT, K. A.; FERON, O.; KELLY, R.A. Innate immunity and angiogenesis. **Circulation Research**, v. 96, p. 15–56, 2005.

FORMAN, H. J., TORRES, M. Redox signaling in macrophages **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 189–216, 2001.

FURUJO, M.; KINOSHITA, M.; NAGAO, M.; KUBO, T. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: Neurological manifestations and relevance of S-adenosylmethionine. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 107, p. 253-256, 2012.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 23-25, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 953-964, 2005.

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 Research**, v.9, n.4 p. 256-263, 2003.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, p.125-130, 2011.

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

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v.70, p. 257-65, 2012.

HASKO, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunology**, v. 25, p.33–39, 2004.

HIRABAYASHI, K.; SHIOHARA, M.; YAMADA, K.; SUEKI, A.; IDE, Y.; TAKEUCHI, K.; HAGIMOTO, R.; KINOSHITA, T.; YABUHARA, A.; MUDD, S.H.; KOIKE, K. Neurologically normal development of a patient with severe methionine adenosyltransferase I/III deficiency after continuing dietary methionine restriction. **Gene**, v. 530, p.104- 108, 2013.

HOFFMAN, G.F. Selective screening for inborn errors of metabolism: past, present and future. **European Journal of Pediatrics**, v.153, p. 2-8, 1994.

HUMPHREYS, B. D.; DUBYAK, G. R. Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. **Journal of Immunology**, v.157, n.12, p. 5627–5637, 1996.

IDZKO, M.; Hammad, H.; Nimwegen, M. V.; Kool, M.; Willart, M. A. M.; Muskens, F.; Hoogsteden, H. C.; Luttmann, W.; Ferrari, D.; Di Virgilio, F.; Virchow, J. C.; Lambrecht, J. B. N. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. **Nature Medicine**, v.13, p. 913–919, 2007.

KHAKH, B. S.; NORTH, R.A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**, v.442, p. 527–532, 2006.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

LA SALA, A.; FERRARI, D.; DI VIRGILIO, F.; IDZKO, M.; NORGAUER, 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. P.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.T.; DOMBROWSKI, K. E.; KAPP, J.A. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of Immunology**, v.170, n. 6, p. 2962-2970, 2003.

LASKIN, D.L.; LASKIN, J.D. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. **Toxicology**, v.160, p. 111–118, 2001.

LAZAROWSKI, E. R.; BOUCHER, R.C.; HARDEN, T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y receptor activating molecules. **Molecular Pharmacology**, v 64, n. 4, p. 785–795, 2003.

LAZAROWSKI, E. R. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. **Purinergic Signalling**, v. 8, n.33, p.59-373, 2012.

LEE, J.K.; KIM, J.K.; LEE Y.R.; KIM, H. S.; IM, S. A.; KIM, K.; LEE, C. K. Exposure to chemokines during maturation modulates antigen presenting cell function of mature macrophages. **Cellular Immunology**, v. 234, p. 1–8, 2005.

LEMAIRE, I.; LEDUC, N. Purinergic P2X7 receptor function in lung alveolar macrophages: pharmacologic characterization and bidirectional regulation by Th1 and Th2 cytokines. **Drug Development Research**, v. 59, p.118–127, 2003.

LEMAIRE, I.; FALZONI, S.; LEDUC, N.; ZHANG, B.; PELLEGATTI, P.; ADINOLFI, E.; CHIOZZI, P.; DI VIRGILIO, F. Involvement of the purinergic P2X7 receptor in the formation of multinucleated giant cells. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 7257–7265, 2006.

LENTZ, S.R. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 1646-54, 2005.

LEY, S.; WEIGERT, A.; BRUNE, B. Neuromediators in inflammation--a macrophage/nerve connection. **Immunobiology**, v. 215, p. 674–684, 2010.

LIU, Y.C., ZOU, X.B., CHAI, Y.F., YAO, Y.M. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v.10, p. 520–529, 2014.

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 of the United States of America**. V. 98, p. 5560-5565, 2001.

MACÊDO, E. M. C.; AMORIM, M. A. F.; DA SILVA, A. C. S.; DE CASTRO, CÉLIA MARIA M. B. Effects of copper, zinc and magnesium deficiency on the immune system of severely malnourished children. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, p.329-36, 2010.

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



MANCUSO, M.; COPPEDE, F.; MIGLIORE, L.; SICILIANO, G.; MURRI, L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. **J. Alzheimers Dis**, v. 10, p. 59–73, 2006.

MANTOVANI, A. Orchestration of macrophage polarization. **Blood**, v. 114, p. 3135-3136, 2009.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p.451-483, 2009.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v.6, p. 6 – 13, 2014.

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

MARTINS, E.; MARCÃO, A.; BANDEIRA, A., FONSECA, H., NOGUEIRA, C., VILARINHO, L. Methionine Adenosyltransferase I/III Deficiency in Portugal: High Frequency of a Dominantly Inherited Form in a Small Area of Douro High Lands. **JIMD Reports**, v. 6, p.107–112, 2012.

MISRA, M.K.; SARWAT, M.; BHAKUNI, P.; TUTEJA, R.; TUTEJA, N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. **Medical Science Monitor**, v.15, p. 209-219, 2009.

MORI, N.; HIRAYAMA, K. Long-term consumption of a methionine supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. **The Journal of Nutrition**, v.130, p. 2349-2355, 2000.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophages activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 958-969, 2008.

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

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

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, p. 3–32, 2011.

NAGAO, M.; TANAKA, T.; FURUJO, M. Spectrum of mutations associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency among individuals identified during newborn screening in Japan. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 110, p. 460–464, 2013.

NEDIANI, C.; RAIMONDI, L.; BORCHI, E.; CERBALI, E. Nitric oxide/reactive oxygen species generation and nitroso/redox imbalance in heart failure: from molecular mechanisms to therapeutic implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, p. 289-331, 2011.

OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; GODOY, L. M. F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, v. 52, p. 420–432, 2006.

PELLEGATTI, P.; RAFFAGHELLO, L.; BIANCHI, G.; PICCARDI, F.; PISTOIA, V.; DI VIRGILIO, F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. **PLoS One**, v.3, n.7, p. e2599, 2008.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E.N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.

RAO, A. N.; KAVITHA, J.; KOCH, M.; SURESH KUMAR, V. Inborn Errors of Metabolism: Review and Data from a tertiary care center. **Indian Journal of clinical biochemistry**, v. 24, p. 215-222, 2009.

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

ROSA, L. F. P. B. C.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 8, p.167 – 172, 2002.

ROSEMBERG, D. B.; KIST, L. W.; ETCHART, R. J.; RICO, E. P.; LANGONI, A. S.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; SOUZA, D. O. Evidence that acute taurine treatment alters extracellular AMP hydrolysis and adenosine deaminase activity in zebrafish brain membranes. **Neuroscience Letters**, v.481, p. 105-109, 2010.

SALERNO, L., SORRENTI, V., DI GIACOMO, C., ROMEO, G., SIRACUSA, M.A. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 177-200, 2002.

SCHULTZ, R.M. The role of cytokines in macrophage activation. **Progress in Drug Research**, v. 35, p.109-38, 1990.

SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1489-1520.

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, p. 187-194, 2012.

SILVA, C.; BURNSTOCK, B.; OJCIUSC, D.M.; SILVA, R.C. Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. **Immunobiology**, v. 216, p. 1–11, 2011.

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

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

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

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

STEFANELLO, F.M.; FERREIRA, A.G.K.; PEREIRA, T.C.B.; CUNHA, M.J.; BONAN, C.D.; BOGO, M.R.; WYSE, A.T.S. Acute and chronic hypermethioninemia alter Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus:

prevention by antioxidants. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.29, p.483-488, 2011.

STEIN, M.; KESHAV, S.; HARRIS, N.; GORDON, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v.176, p. 287-292, 1992.

STRECK, E.L.; ZUGNO, A.I.; TAGLIARI, B.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. **Metabolic Brain Disease**, v. 17, p.83-91, 2002.

STRECK, E.L.; VIEIRA, P.S.; WANNMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. **Metabolic Brain Disease**, v.18, p.147-154, 2003.

STROUS, R.D.; MICHAEL, S.; RITSNER, S.; ADLER, S.; RATNER, Y.; MAAYAN, R.; KOTLER, M.; LACHMAN, H.; WEIZMAN, A. Improvement of aggressive behavior and quality of life impairment following S-Adenosyl-Methionine (SAM-e) augmentation in schizophrenia. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, p. 14-22, 2008.

TYTECA, D.; NISHINO, T.; DEBAIX, H.; VAN DER SMISSEN, P.; N'KULI, F.; HOFFMANN, D.; CNOPS, Y.; RABOLLI, V.; LOO, G. V.; BEYAERT, R.; HUAUX, [F.](#); [DEVUYST](#), O.; COURTOY, P. J. Regulation of Macrophage Motility by the Water Channel Aquaporin-1: Crucial Role of M0/M2 Phenotype Switch. **PlosOne**, v. 10, p. 2, 2015.

VELASQUEZ, S.; EUGENIN, E. A. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. **Frontiers in Physiology**, v.5, p. 96, 2014.

WELTER-STAHN, L.; SILVA, C.M.; SCHACHTER, J.; PERSECHINI, P. M.; SOUZA, H. S.; OJCIUS, D. M.; COUTINHO-SILVA, R. Expression of purinergic receptors and modulation of P2X7 function by the inflammatory cytokine IFN $\gamma$  in human epithelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 1176–1187, 2009.

WILLIAMS, K.T.; SCHALINSKE, K.L. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. **Biofactors**, v.36, p.19-24, 2010.

WRIGHT, S.D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J.; MATHISON, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, p. 1431-1433, 1990.

YALÇINKAYA, S.; UNLÜÇERÇİ, Y.; UYSAL, M. Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. **Patologia Experimental e Toxicologica**, v. 58, p. 455–459, 2007.

YAMADA, H.; AKAHOSHIA, N.; KAMATAD, S.; HAGIYAD, Y.; HISHIKIA, T.; NAGAHATAC, Y.; MATSUURAC, T.; TAKANOC, N.; MORIB, M.; ISHIZAKIB, Y.; IZUMIB, T.; KUMAGAIE, Y.; KASAHARAD, T.; SUEMATSUBA, M.; ISHII, I. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine  $\gamma$ -lyase, an animal model of cystathioninuria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 1716–1726, 2012.

ZANIN, R. F.; CAMPESATO, L. F.; BRAGANHOL, E.; SCHETING, M. R.; WYSE, A.T.; BATTASTINI, A.M. Homocysteine decreases extracellular nucleotide hydrolysis in rat platelets. **Thrombosis Research**, v. 25, n. 3, p. 87-92, 2010.

ZANIN, R.F.; BERGAMIN, L.S.; BRAGANHOL, E.; SEVIGNY, J.; DE SOUZA WYSE, A.T.; BATTASTINI, A.M. Homocysteine modifies extracellular ATP availability in macrophages. **Toxicology In Vitro**, v. 27, p.2273-8, 2013.

ZANIN, R.F.; BRAGANHOL, E.; BERGAMIN, L.S.; CAMPESATO, L.F.; FILHO, A.Z.; MOREIRA, J.C.; MORRONE, F.B.; SÉVIGNY, J.; SCHETINGER, M.R.; DE SOUZA WYSE, A.T.; BATTASTINI, A.M. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. **PLoS One**, v. 7, p.31205, 2012.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, v. 103, p.398-406, 2008.

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