

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Efeito da administração crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o
status redox, sistema purinérgico e fenótipo de macrófagos peritoneais de
camundongos**

Thaís Scolari Franceschi

Pelotas, 2019

Thaís Scolari Franceschi

**Efeito da administração crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o
status redox, sistema purinérgico e fenótipo de macrófagos peritoneais de
camundongos**

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

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

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F816e Franceschi, Thaís Scolari

Efeito da administração crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o status redox, sistema purinérgico e fenótipo de macrófagos peritoneais de camundongos / Thaís Scolari Franceschi ; Francieli Moro Stefanello, orientadora. — Pelotas, 2019.

76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Metionina. 2. Metionina sulfóxido. 3. Macrófagos. 4. Inflamação. 5. Status redox. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Título.

CDD : 574.192

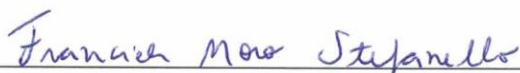
Thaís Scolari Franceschi

Efeito da administração crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o status redox, sistema purinérgico e fenótipo de macrófagos peritoneais de camundongos

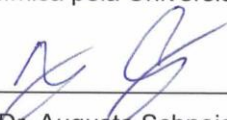
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19 de julho de 2019

Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello (Orientadora) doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof. Dr. Augusto Schneider doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.



Dr. Fabiano B. Carvalho doutor em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.

Dedico

Com todo meu amor e admiração dedico este trabalho aos meus pais Onesio e Janice e minha irmã Stéfany, vocês representam tudo na minha vida.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ser tão generoso e bondoso comigo, dando tantas oportunidades para minha vida, em especial por essa conquista que se concretiza hoje, que é estar defendendo minha dissertação de mestrado. Obrigado senhor, a ti confio minha trajetória.

Aos meus amados pais Janice e Onesio, vocês são meus maiores exemplos de honestidade, humildade, determinação, caráter e respeito, obrigada por sempre fazerem o possível e o impossível para a minha felicidade e a da mana. O dia de hoje só se tornou realidade porque tive o incentivo e apoio de vocês. A maior força que me motiva todos os dias é poder dar de alguma forma orgulho a vocês, tendo a certeza que estou seguindo o caminho que vocês sonharam para mim. Obrigada por serem os melhores pais, amo muito vocês dois, minha eterna gratidão.

A minha querida irmã Stéfany, tu representa um presente de Deus na minha vida, que veio ao mundo para me ensinar muitas coisas e uma delas é esse amor incondicional que sinto por ti. Obrigada pela forte torcida, pelo riso que alegra meus dias, pelo abraço que representa tudo e por ser esse grande ser humano que me dá tanto orgulho, te amo demais mana.

A minha família que sempre compreendeu minha ausência inúmeras vezes, tenho muita saudade de vocês, em especial não poderia deixar de lembrar da minha querida vó Luiza, a quem sempre rezou por mim e pela minha proteção, obrigada pelos teus ensinamento e principalmente pela fé que nos ensinou a ter!

À todas as minha amigas da odonto, agora dentistas, pessoas maravilhosas que Deus colocou em minha vida e tive a oportunidade de compartilhar meus dias, obrigada pela amizade e companheirismo de sempre.

À Marcelinha minha irmã de coração, tu representa muito em minha vida, obrigada ser esse ser iluminado, que sempre me ajudou nos momentos de dificuldade e também se fez presente nos momentos felizes, nunca vou esquecer toda tua ajuda amiga.

À Mayara, não tenho palavras para agradecer o quanto foste importante nessa fase, a primeira pessoa que me acolheu no grupo Neurocan e Biomarcadores, a pessoa que sempre esteve ali para ajudar em tudo de forma sincera e disposta. Uma pessoa iluminada que Deus colocou em meu caminho, um grande exemplo a

ser seguido, saibas que pode contar comigo para sempre amiga, obrigada por tudo May.

As amigas Nati Bona e Luiza, agora vizinhas, mas mais próximas ainda por compartilharmos tantos sentimentos similares, vocês duas são estrelas em noites escuras, foram pessoas que sempre entenderam a saudade de casa, com quem pude compartilhar incertezas e angústias, assim como momentos de alegria e trabalho no campus, obrigada meus amores.

À Nati Pedra que foi muito importante na parte experimental, obrigada pela amizade, companheirismo e por toda tua dedicação em ajudar no meu trabalho. Ao Carlus que vinha de Rio Grande para contribuir com o seu conhecimento na parte do cultivo dos macrófagos, meu muito obrigado.

À todos os colegas e amigos do grupo Neurocan e Biomarcadores, em especial aqueles que ajudaram na execução do meu trabalho: Pathise, Anita, Fernanda, Juliane, Karina, Bruna, Sabrina e Alana, obrigada pelas contribuições de vocês.

À minha querida orientadora Fran a qual tenho imensa admiração, tu és uma grande inspiração para mim, sempre com esse alto astral e energia ímpar consegue nos tornar mais fortes e motivados a continuar, obrigada por todo o conhecimento transmitido, paciência, confiança no meu trabalho, por sempre estar disponível a ajudar e principalmente por ser esse exemplo de profissional, tens um lugar especial em meu coração.

À prof Rose, que desde o início me acolheu da melhor forma no laboratório, fazendo com que me sentisse parte dele, obrigada por compartilhar com todos esse riso frouxo e essa verdade em nos motivar, dando coragem para seguir em frente, obrigada por tudo prof.

Ao PPGBBio e ao corpo docente que compõe este programa, obrigada pelo conhecimento transmitido.

Aos professores convidados a participar da banca, obrigado pela disposição para avaliar meu trabalho.

À UFPel pela minha formação acadêmica, estará eternamente guardada em meu coração.

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos.
(Augusto Cury)

Resumo

FRANCESCHI, Thaís Scolari. **Efeito da administração crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido sobre o *status* redox, sistema purinérgico e fenótipo de macrófagos peritoneais de camundongos.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A hipermetioninemia é uma doença caracterizada pela deficiência ou ausência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Essa condição resulta em elevados níveis sanguíneos de metionina (Met), assim como de seus metabólitos, dentre eles a metionina sulfóxido (MetO). Os pacientes afetados podem apresentar distúrbios neurológicos e hepáticos envolvendo inflamação e estresse oxidativo, porém a fisiopatologia dessas alterações ainda permanece pouco elucidada. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da administração crônica de Met e/ou MetO sobre o fenótipo expresso por macrófagos peritoneais de camundongos jovens, avaliando parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e do sistema purinérgico. Os animais foram divididos em quatro grupos: I (controle); II (Met); III (MetO) e IV (Met + MetO). Nesse protocolo, os animais receberam uma injeção subcutânea de Met (0,35 - 1,2 g/kg) e/ou MetO (0,09-0,3 g/kg) do 10º ao 38º dia de vida, duas vezes ao dia, com intervalo de 8 horas entre as aplicações. Os resultados demonstraram que a Met e/ou MetO induziram um fenótipo de ativação M1/clássico em macrófagos peritoneais, observado através do aumento dos níveis de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e de nitrito, bem como redução da atividade da arginase. Além disso, Met e/ou MetO também alteraram a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, os níveis de tiois totais e as espécies reativas de oxigênio nos macrófagos peritoneais. Por fim, a administração crônica de Met e/ou MetO promoveu alteração na hidrólise dos nucleotídeos de adenina ATP e ADP, observado através do aumento na atividade das ectonucleotidases. Esses resultados demonstraram uma polarização clássica M1/pró-inflamatória dos macrófagos, alterações no *status* redox e no sistema purinérgico pela exposição crônica aos aminoácidos Met/MetO. Em conjunto, nossos achados podem contribuir para o entendimento das alterações presentes nos pacientes hipermetioninêmicos, e assim auxiliar na busca por novos alvos terapêuticos.

Palavras-chave: metionina; metionina sulfóxido; macrófagos; inflamação; *status* redox; nucleotídeos

Abstract

FRANCESCHI, Thaís Scolari. **Effect of chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide on redox status, purinergic system and peritoneal macrophages phenotype from mice.** Dissertation (MSc.) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Hypermethioninemia is a disease characterized by the deficiency or absence of the enzyme methionine adenosyltransferase (MAT), this condition results in high blood levels of methionine (Met) and its metabolites, such as methionine sulfoxide (MetO). Hypermethioninemic patients may present with neurological and hepatic disorders involving inflammation and oxidative stress, but the pathophysiology of these events remains unclear. Thus, the objective of the present study was to investigate the effect of chronic administration of Met and/or MetO on the phenotype expressed by peritoneal macrophages of young mice, evaluating inflammatory, oxidative stress and purinergic parameters. The animals were divided into four groups: I (control); II (Met); III (MetO) and IV (Met + MetO). In this protocol, the animals received a subcutaneous injection of Met (0.35 - 1.2 g/kg) and/or MetO (0.09-0.3 g/kg) from 10 to 38 days of life, twice daily, with an 8-hour interval between applications. The results demonstrated that Met and/or MetO induced a M1/classical activation phenotype in peritoneal macrophages, observed through increased levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and nitrite, and reduction of arginase activity. In addition, Met and/or MetO also altered the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, as well as total thiol content and levels of reactive oxygen species in the peritoneal macrophages. Finally, chronic administration of Met and/or MetO promoted alteration in the hydrolysis of adenine nucleotides ATP and ADP, observed through the increase in ectonucleotidase activity. These findings demonstrated a M1/classical macrophage polarization, alterations in the redox status and purinergic system, which may contribute to the understanding of alterations present in hypermethioninemic patients, in order to aid in the search for new therapeutic targets.

Keywords: methionine; methionine sulfoxide; macrophages; status redox; inflammation; nucleotides

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Metabolismo da Metionina.....	21
Figura 2	Oxidação e Redução da Metionina.....	22
Figura 3	Mecanismo Enzimático Antioxidante.....	26
Figura 4	Polarização de Macrófagos.....	29

Manuscrito

Figure 1	Effect of chronic exposure to methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO) on the viability and proliferation of peritoneal macrophages	54
Figure 2	Characterization of macrophages phenotype post chronic treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO).....	55
Figure 3	Oxidative stress parameters in macrophages post chronic treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO).....	56
Figure 4	Ectonucleotidase activities in macrophages post chronic treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO)....	57

Lista de Abreviaturas

5-Me-THF	5-metiltetrahidrofolato
Ado	Adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
ALA-D	Delta aminolevulínico desidratase
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BHMT	Betaína homocisteína metiltransferase
CAT	Catalase
CBS	Cistationina β -sintase
CGL	Cistationina γ -liase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIM	Erros inatos de metabolismo
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfo-difosfohidrolase
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GNMT	Glicina-N-metiltransferase
GSH	Glutathiona reduzida
GPx	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hcy	Homocisteína
IFN- γ	Interferongamma

IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-23	Interleucina-23
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	Metionina adenosiltransferase
Met	Metionina
MetO	Metionina sulfóxido
MS	Metionina sintase
MTT	3 (4,5-ensaio de dimetil) -2,5-difenil tetrazio
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singleto
P2X	Receptor purinérgico ionotrópico

P2Y	Receptor purinérgico metabotrópico
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAHH	S-adenosil-homocisteína-hidrolase
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforrodamina B
THF	Tetrahidrofolato
TLR	Receptor toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1 Introdução	15
2 Objetivos	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
3 Revisão de literatura	19
Erros Inatos do Metabolismo	19
Metionina e Metionina Sulfóxido	20
Hipermetioninemia	22
Radicais Livres e Estresse Oxidativo	24
Sistema Imunológico e Inflamação	26
Macrófagos	28
Sistema Purinérgico	30
Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	31
Receptores purinérgicos	32
Enzimas que degradam os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	32
4 Manuscrito.....	35
5 Conclusões.....	59
Referências	60
Anexos.	75
Anexo A - Carta de parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)	76

1 Introdução

Os mamíferos necessitam de nutrientes essenciais como aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais oriundos dos alimentos ingeridos para preservar seu estado nutricional adequado, para controle do metabolismo, prevenção de doenças, assim como homeostase fisiológica (STOVER et al., 2017). A metionina (Met) é um aminoácido essencial, obtida a partir da dieta ou degradação endógena de proteínas e que contém enxofre na sua estrutura (PRUDOVA et al., 2005).

O metabolismo da Met é importante pois esse aminoácido está presente em vários processos biológicos indispensáveis ao organismo, como a síntese de proteínas, manutenção das metilações biológicas, formação de poliaminas e de homocisteína, catabolismo de colina e também na manutenção da homeostase redox celular (SUAREZ et al., 2010). Entretanto elevados níveis desse aminoácido apresentam efeitos danosos ao organismo, como os encontrados na hipermetioninemia.

A hipermetioninemia é uma doença pertencente ao grupo dos erros inatos do metabolismo (EIM) que são desordens hereditárias, caracterizadas pela deficiência de uma proteína, na maioria das vezes uma enzima (DHERAI, 2012). Os EIM mais frequentes são aqueles relacionados ao metabolismo de aminoácidos, sendo um exemplo, a hipermetioninemia em que se observa a deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Na deficiência dessa enzima, a concentração plasmática de Met atinge valor elevado, assim como seus metabólitos – metionina sulfóxido (MetO), metanotiol e sulfeto de hidrogênio (MUDD et al., 2001). Pacientes hipermetioninêmicos possuem manifestações clínicas como edema e desmielinização cerebral, déficit cognitivo, alterações hepáticas, bem como deficiência de vitaminas e minerais, além de sinais clínicos, como alopecia. É importante destacar que a fisiopatologia da doença ainda não está completamente elucidada (FERNÁNDEZ-IRIGOYEN et al., 2010; LU et al., 2001; MUDD et al., 2001; NASHABAT et al., 2018).

Sabe-se que as células do sistema imune possuem importantes funções biológicas, podendo ressaltar o controle da inflamação através dos macrófagos,

sendo essas as principais células diferenciadas do sistema fagocitário mononuclear, devido a sua abundância, distribuição e mobilidade (LASKIN & LASKIN, 2001; SILVA et al., 2011). Os macrófagos são ativados em resposta ao reconhecimento de sinais de perigo, que podem ser: produtos microbianos, citocinas, quimiocinas e mediadores extravasados por células danificadas, tais como a adenosina trifosfato (ATP) (LEY et al., 2010).

Quando ativados para um fenótipo M1, os macrófagos liberam fatores pró-inflamatórios e citotóxicos como espécies reativas de nitrogênio (ERN), espécies reativas de oxigênio (ERO), citocinas, lipídios bioativos e enzimas hidrolíticas (FORMAN & TORRES, 2001; LASKIN & LASKIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2006). A resposta de ativação dos macrófagos está associada às alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas nas células (LASKIN & LASKIN, 2001; SCHULTZ, 1990). Dos Santos e colaboradores (2016) demonstraram que a exposição *in vitro* de macrófagos à Met e/ou MetO induz o fenótipo de ativação M1/pró-inflamatório e também promove alterações no estado redox nessas células.

O estresse oxidativo produz um aumento na produção de oxidantes e/ou diminuição das defesas antioxidantes. Esse processo está relacionado à patogênese de diversas doenças, tais como: inflamação, câncer e doenças neurodegenerativas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Além disso, alguns estudos vem relatando que uma dieta utilizando suplementação com Met aumenta o dano oxidativo (YALÇINKAYA et al., 2007).

Diversos estudos demonstram que altas concentrações de Met e/ou MetO, *in vitro* e *in vivo*, alteram o *status* redox em cérebro (SCHWEINBERGER et al., 2014, 2018; SOARES et al., 2017a; STEFANELLO et al., 2005, 2007a, 2011), fígado (COSTA et al., 2013; MORI & HIRAYAMA, 2000; SOARES et al., 2017b; STEFANELLO et al., 2009, 2011), rim (SOARES et al., 2017b), músculo esquelético (SCHWEINBERGER et al., 2015), soro (SOARES et al., 2019) e componentes do sistema imunológico, como plaquetas (SOARES et al., 2019) e macrófagos (DOS SANTOS et al., 2016).

A inflamação corresponde a uma cascata de eventos tendo como objetivo proteger a integridade do organismo frente a agentes nocivos tanto endógenos quanto exógenos (DI VIRGILIO & VUERICH, 2015). A resposta inflamatória se baseia na liberação de mediadores, assim como recrutamento de células. Essas células inflamatórias são ativadas, resultando na liberação de mediadores, dentre

eles podemos destacar: proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa; citocinas, como a interleucina-1 beta (IL-1 β), interferon gamma (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), quimiocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (NO) (COLTON, 2009; SALERNO et al., 2002; ZHANG, 2008).

A resposta inflamatória possui importância na manutenção das funções biológicas do organismo e a via de sinalização purinérgica pode atuar modulando esse sistema (BODIN & BURNSROCK, 2001). O sistema purinérgico é mediado pelos nucleotídeos de adenina - ATP, difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) e nucleosídeo de adenina - adenosina (Ado) no meio extracelular, sendo consideradas importantes moléculas sinalizadoras (YEGUTKIN, 2008). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento com altas concentrações de Met e/ou MetO altera a atividade das ectonucleotidases (enzimas que degradam os nucleotídeos de adenina) em linfócitos (SOARES et al., 2018), plaquetas e soro de ratos jovens (SOARES et al., 2019).

Considerando o exposto, o presente estudo visa contribuir com o entendimento da fisiopatologia da hipermetioninemia avaliando o fenótipo expresso por macrófagos e a possível relação com o estresse oxidativo e o sistema purinérgico em camundongos jovens submetidos a exposição crônica de Met e/ou MetO.

2 Objetivos

Objetivo geral

Investigar o efeito da administração crônica de Met e/ou MetO sobre o fenótipo expresso por macrófagos, bem como sobre marcadores de estresse oxidativo e do sistema purinérgico em macrófagos peritoneais de camundongos jovens.

Objetivos específicos

- Determinar o fenótipo expresso por macrófagos peritoneais de camundongos jovens após administração crônica de Met e/ou MetO, através da avaliação da citocina pró-inflamatória (TNF- α), atividade da arginase e dos níveis de nitrito.
- Determinar a viabilidade e proliferação de macrófagos peritoneais de camundongos jovens após administração crônica de Met e/ou MetO.
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo (atividade das enzimas antioxidantes, produção de ERO e conteúdo total de sulfidrilas) em macrófagos peritoneais de camundongos jovens após administração crônica de Met e/ou MetO.
- Avaliar alterações na via da sinalização purinérgica através da atividade das NTPDases (ATP e ADP) e da 5'-nucleotidase (AMP) em macrófagos peritoneais após administração crônica de Met e/ou MetO.

3 Revisão da Literatura

Erros Inatos de Metabolismo

Os EIM englobam um grupo de desordens hereditárias majoritariamente autossômicas recessivas, causadas por alterações genéticas, resultando geralmente na deficiência ou ausência da síntese de uma enzima. Esses problemas podem ocasionar mudanças em uma via metabólica, devido à ausência ou redução da atividade enzimática, englobando processos que envolvem a síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo. As principais alterações que podem ser identificadas são: falta de produtos essenciais e acúmulo de metabólitos com seus efeitos pouco elucidados (BARIĆ et al., 2001; SCRIVER et al., 2001).

Os estudos dos EIM iniciaram no século XX por Archibald Garrod, que publicou o livro nomeado “Erros Inatos do Metabolismo”, esse também contempla a descrição de outros distúrbios genéticos metabólicos (EL-HATTAB 2015; SCRIVER et al., 2001). A ocorrência dessas doenças é muito baixa quando estudadas de forma isolada, porém, quando analisadas em conjunto chegam a atingir um a cada mil recém-nascidos vivos (EL-HATTAB 2015; SCRIVER et al., 2001). Os EIM são comumente classificados de acordo com área do metabolismo prejudicada pela alteração genética, subdividindo-se em metabolismo de aminoácidos, glicídeos, lipídeos, glicoproteínas, ácidos orgânicos, lipoproteínas entre outros, porém as aminoacidopatias são um dos EIM mais frequentes (SCRIVER et al., 2001).

A maioria dos EIM são detectados através da triagem neonatal, porém em outros casos o diagnóstico é feito após apresentação de manifestações clínicas da doença que ocorrem primeiramente na infância. Essas desordens quando não tratadas podem ocasionar diversas consequências no período neonatal, levando a manifestações clínicas subsequentes, que compreendem: alterações hepáticas, inflamatórias, déficit neurológico, levando ao atraso no desenvolvimento do indivíduo e podem até resultar em óbito do paciente acometido por essas desordens

metabólicas (CAMP et al., 2012; DHERAI, 2012; RAO et al., 2009; SCRIVER et al., 2001).

O método de tratamento mais utilizado se baseia no fornecimento de suplementos alimentares, com o intuito de tentar reverter um transtorno metabólico específico, que se manifesta em decorrência de anormalidades bioquímicas resultantes da deficiência enzimática (CAMP et al., 2012).

Metionina e Metionina Sulfóxido

A Met é um aminoácido essencial, que contém enxofre na sua estrutura, sendo obtida a partir da dieta ou pela degradação endógena de proteínas (PRUDOVA et al., 2005). O metabolismo da Met se torna importante, pois esse aminoácido se faz presente em vários processos biológicos indispensáveis ao organismo, como a síntese de proteínas, manutenção das metilações biológicas, formação de poliaminas e de homocisteína, catabolismo de colina e também na manutenção da homeostase redox celular (SUAREZ et al., 2010).

Foi relatado na literatura que resíduos de Met presentes nas proteínas exercem proteção antioxidante, uma vez que eles estabelecem uma interação através de ligações hidrofóbicas entre seus átomos sulfurados e os anéis dos aminoácidos aromáticos (VALLEY et al., 2012), os quais possuem grande susceptibilidade a oxidação por espécies reativas (EL REFAEY et al. 2015).

A Met é principalmente metabolizada no fígado pela enzima MAT que catalisa a primeira reação do metabolismo desse aminoácido (STROUS et al., 2008; YAMADA et al., 2012). Essa enzima transfere o grupo adenosil do ATP para a Met, formando S-adenosilmetionina (SAM), um doador de grupamentos metila para compostos como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Essa reação de transmetilação da SAM forma S-adenosil-homocisteína (SAH) que posteriormente é hidrolisada pela SAH hidrolase, formando homocisteína (Hcy) e Ado (FINKELSTEIN 1990; MUDD 1962).

A Hcy pode ser metabolizada por duas vias: remetilação ou transulfuração. A remetilação é catalisada pela metionina sintase (MS), enzima dependente de vitamina B12. A MS regenera a Met através da transferência de um grupo metila para a Hcy, esse grupamento metila é originado do 5-metiltetraidrofolato (5-Me-THF). Além disso, a enzima betaina-homocisteína-metiltransferase (BHMT) transfere

o grupamento metila da betaína para a Hcy, formando Met e N,N-dimetilglicina. Essa reação é importante, principalmente quando toxinas comprometem a atividade da MS (BEATTY & REED 1980; FINKELSTEIN 2000; MOSHAROV et al. 2000).

A via de transulfuração ocorre através da cistationina β -sintase (CBS), enzima dependente de vitamina B6 que realiza a condensação de Hcy e serina, formando cistationina. A cistationina é então convertida em α -cetobutirato e cisteína pela ação da enzima γ -cistationase, também dependente de vitamina B6. Dessa forma, a via de transulfuração é um importante mecanismo antioxidante não enzimático para o fígado, devido ao fato que ocorre a formação de cisteína, o precursor da glutatona. É relevante destacar que a via de transulfuração é basicamente a única via de catabolismo da Met (BEATTY & REED 1980; FINKELSTEIN 2000; MOSHAROV et al. 2000; SELHUB 1999) (Figura 1). Um dos principais reguladores do metabolismo da Met é a SAM, pois esse composto pode ativar ou inibir enzimas como a MAT que controlam a velocidade da rota metabólica (FINKELSTEIN, 2006).

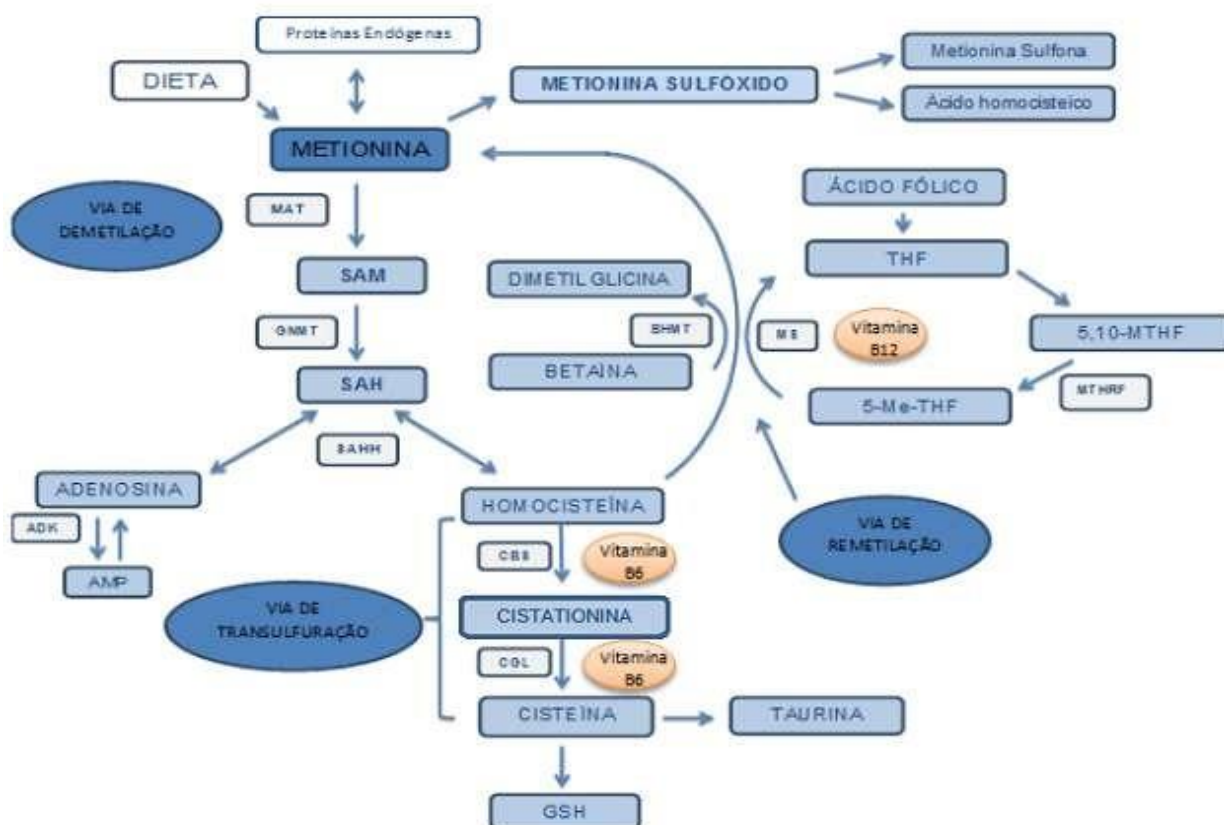


FIGURA 1: Metabolismo da Metionina. MAT - metionina adenosil transferase; SAM - S-adenosil-metionina; GNMT- glicina-N-metiltransferase; SAH- S-adenosil-homocisteína; SAHH - S-adenosil-homocisteína-hidrolase; ADK - adenosina cinase; AMP - adenosina monofosfato; CBS - cistationina β -sintase; CGL - cistationina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

Sendo a Met um aminoácido sulfurado, ela possui grande sensibilidade à oxidação por ERO como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (LIANG et al., 2012; VOGT, 1995). A oxidação da Met forma como principal metabólito a MetO, que está presente em duas formas estereoisoméricas, metionina-S-sulfóxido e metionina-R-sulfóxido. A reação que transforma Met em MetO é reversível (Figura 2), dessa forma a redução de MetO novamente em Met é realizada pela enzima metionina sulfóxido redutase (KOC & GLADYSHEV, 2007; STADTMAN, 2004).

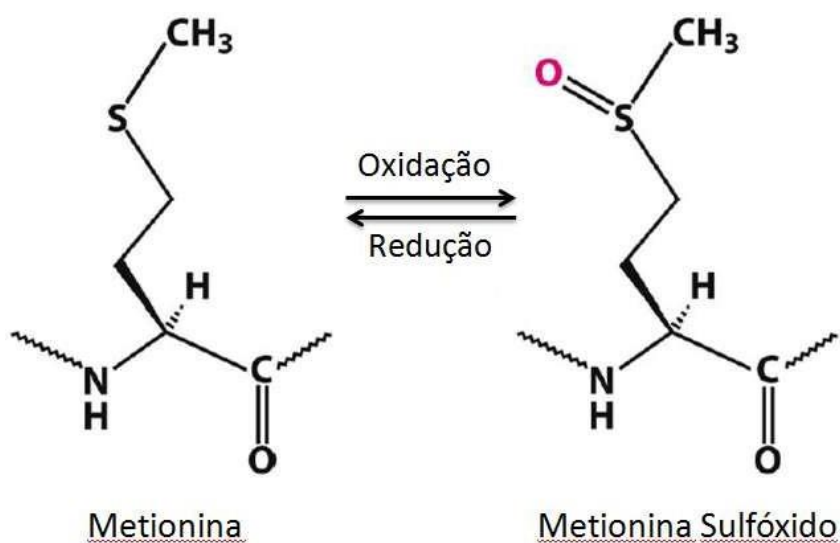


FIGURA 2: Oxidação da Metionina a Metionina Sulfóxido (Adaptado Berg et al., 2012).

Estudos apontam que a presença de resíduos de MetO nas proteínas pode ocasionar perda da atividade biológica proteica. Além do mais, esse excesso de MetO pode resultar em sua oxidação irreversível produzindo metionina sulfona, levando a um desequilíbrio no ciclo oxidação/redução da Met que é um sistema endógeno antioxidante. A MetO também tem demonstrado relação com o envelhecimento e doenças neurodegenerativas (KOC & GLADYSHEV, 2007; MOSKOVITZ, 2014; STADTMAN, 2004).

Hipermetioninemia

A hipermetioninemia é considerada um EIM que possui como característica o acúmulo plasmático do aminoácido Met, assim como deficiência do produto SAM e produção de metabólitos como a MetO. A principal causa da doença é a deficiência total ou parcial da enzima MAT. Elevadas concentrações de Met e seus metabólitos

podem ter origem genética ou não genética, como ocorre na presença de doença hepática, dieta rica em Met, baixo peso ao nascer ou prematuridade (BJURSELL et al., 2011; FURUJO et al., 2012; MUDD et al., 2000, 2001). Estudos afirmam que a Met e seus metabólitos podem ser altamente tóxicos quando encontrados em altas concentrações nos tecidos, podendo exercer dano neurológico e hepático (MUDD et al., 2000, 2001; STEFANELLO et al., 2005, 2007a, 2007b, 2009).

Até o momento, seis alterações genéticas que podem levar a hipermetioninemia já foram descritas na literatura. Entretanto a causa mais comum encontrada em pacientes com hipermetioninemia isolada e persistente é causado pela deficiência da MAT. Pesquisas de caráter genético demonstram que a deficiência da MAT, em pacientes portadores dessa desordem, ocorre através de mutações no gene MAT1A, que é responsável por codificar as subunidades catalíticas de duas isoenzimas presentes nas células hepáticas maduras (MAT I e MAT III) (HIRABAYASHI et al., 2013; MUDD et al., 2000, 2001).

Alguns pacientes hipermetioninêmicos não possuem sintomas, porém danos neurológicos como desmielinização cerebral, associada à deficiência de SAM no líquido cefalorraquidiano, foram evidenciados em diversos estudos (FURUJO et al., 2012; MUDD et al., 2001). Outros problemas foram relatados, dentre eles: edema cerebral, miopatia, retardo do desenvolvimento psicomotor e distúrbios hepáticos envolvendo estresse oxidativo e inflamação (FERNÁNDEZ-IRIGOYEN et al., 2010; MUDD et al., 2001). Os pacientes podem apresentar sinais clínicos como odor incomum na respiração, suor, hálito e urina, provavelmente como resultado do metabolismo alternativo da Met (FURUJO et al., 2012).

As concentrações plasmáticas normais de Met estão em torno de 30 $\mu\text{mol/L}$, entretanto nos casos graves da doença, em que a MAT encontra-se alterada, as concentrações podem atingir até 2.500 $\mu\text{mol/L}$ (MUDD et al., 2001). Adicionalmente, elevados níveis de MetO, de metanotiol e sulfeto de hidrogênio, devido a rota alternativa para o metabolismo da Met, podem ser encontrados no plasma e urina dos pacientes (MUDD et al., 2001).

A hipermetioninemia é de difícil diagnóstico, porém pode ser descoberta nos primeiros dias de vida através do rastreamento neonatal. Um valor de 48 $\mu\text{mol/L}$ de Met pode ser sugestivo para deficiência da MAT, exigindo a avaliação da atividade dessa enzima no fígado. Outros parâmetros utilizados para auxiliar no diagnóstico

são os níveis de SAM e de Hcy que também encontram-se alterados nesta patologia (CHIEN et al., 2005; COUCE et al., 2008; SUAREZ et al., 2010).

Quando a doença for assintomática, é necessário verificar os níveis de Met regularmente, mas não é necessário realizar tratamento. Entretanto, nos casos mais graves da hipermetioninemia, como na presença de alterações neurológicas, o tratamento é indispensável. Esse consiste em uma dieta isenta de proteínas, reduzindo a ingestão de Met. No entanto, essa restrição é controversa, pois pode ocasionar maior redução dos níveis de SAM podendo agravar os danos neurológicos. Dessa forma, uma abordagem terapêutica compreende a administração de SAM (S-adenosilmetionina dissulfato tosilato) em concentrações de 400 mg a 800 mg, duas vezes ao dia. Estudos na literatura demonstram que essa suplementação melhora os sintomas associados a essa desordem metabólica, assim como desmielinização no sistema nervoso central (SNC) (CHIEN et al., 2005; COUCE et al., 2008, 2013).

Estudos realizados com modelos pré-clínicos de hipermetioninemia comprovaram alterações no encéfalo, fígado, rim, músculo esquelético e em células do sistema imune como os linfócitos e macrófagos (DOS SANTOS et al., 2016; SCHWEINBERGER et al., 2015; SOARES et al., 2017a, 2017b, 2018; STEFANELLO et al., 2005, 2007a, 2007b, 2007c, 2009, 2011). No cérebro, ocorrem alterações em parâmetros de estresse oxidativo, na atividade da acetilcolinesterase e da Na^+, K^+ -ATPase e redução do conteúdo de gangliosídeos, fosfolípidos e colesterol (STEFANELLO et al., 2005, 2007a, 2007b, 2011). Também foi observado que a administração aguda de Met e/ou MetO induz redução da viabilidade celular e dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) com consequente morte celular por apoptose em córtex cerebral de ratos jovens (SOARES et al., 2017a). Além disso, já foi demonstrado que elevadas doses de Met e/ou MetO induzem dano oxidativo, alteram a atividade da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALA-D), assim como parâmetros histológicos em fígado e rim de ratos jovens (COSTA et al., 2013; SOARES et al., 2017b; STEFANELLO et al., 2009).

Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Radical livre é um átomo ou molécula que contém um número ímpar de elétrons, ou seja, possui elétrons desemparelhados na sua camada de valência, o

que o torna altamente instável e reativo (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Os radicais livres podem ser divididos em quatro grupos principais com base em seu átomo central, sendo eles o oxigênio, nitrogênio, enxofre e cloro (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As substâncias com maior potencial para gerar os radicais livres são o oxigênio em seu estado fundamental (O_2) e o NO (IGNARRO, 1998).

ERO é o termo usado para designar radicais livres, ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) e alguns não radicais provenientes do oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). Tais espécies são formadas de maneira contínua no metabolismo, principalmente na mitocôndria onde ocorre a cadeia respiratória, em torno de 2-5% do oxigênio consumido é transformado nestas espécies reativas (HALLIWELL, 2011). Essas moléculas possuem importante papel fisiológico: processo fagocitário, regulação da atividade de proteínas, sinalização celular e na resposta imunológica. Entretanto, quando em excesso podem causar danos ao organismo devido a sua alta reatividade (ELLAH, 2011; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O organismo possui defesas antioxidantes, que diminuem ou inibem os efeitos nocivos das espécies reativas. Esse sistema de defesa é dividido em enzimático e não enzimático. Algumas das defesas antioxidantes enzimáticas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já o sistema não enzimático é composto por muitas substâncias antioxidantes que possuem origem endógena ou são ingeridas através da dieta, como por exemplo: ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione reduzida (GSH), carotenoides, flavonoides entre outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2012; SREEKUMAR et al., 2011).

As enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx atuam de forma conjunta. Inicialmente a SOD realiza a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio molecular e H_2O_2 . Já a CAT realiza a decomposição de H_2O_2 em água e oxigênio molecular. A GPx compreende uma família enzimática envolvida na remoção de H_2O_2 dos tecidos, que utiliza como substrato a GSH para converter peróxidos e hidroperóxido em álcoois, água e glutathione oxidada (ANDREAZZA et al., 2008; LOWE, 2014) (Figura 3).

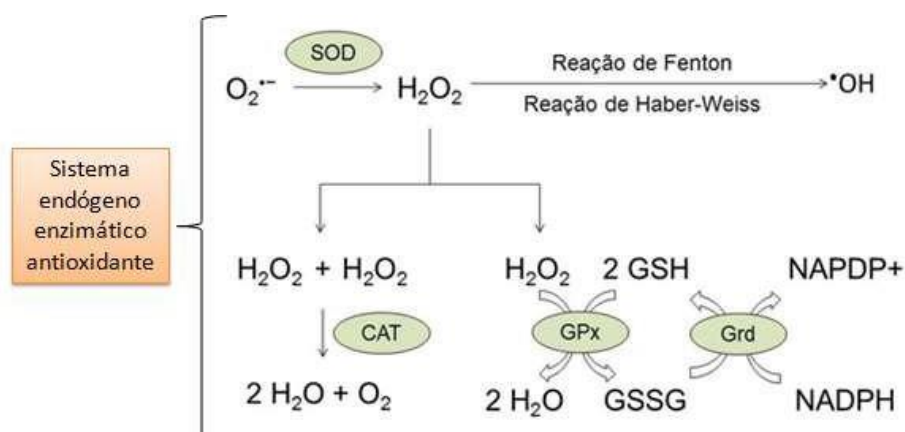


FIGURA 3: Mecanismo enzimático antioxidante (Adaptado de BARBOSA et al., 2010).

Estudos comprovam que o estresse oxidativo, proveniente do desequilíbrio entre espécies reativas e defesas antioxidantes pode estar relacionado a várias doenças como: inflamação, disfunção hepática, carcinogênese, aterosclerose, doença cardíaca isquêmica, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, doenças neurodegenerativas e EIM de aminoácidos (COSTA et al., 2013; FERREIRA et al., 2012; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Diversos trabalhos demonstraram que altas concentrações de Met e/ou MetO, alteram a homeostase redox em soro (SOARES et al., 2019), plaquetas (SOARES et al., 2019) cérebro, (SCHWEINBERGER et al., 2014, 2018; SOARES et al., 2017a; STEFANELLO et al., 2005, 2007a, 2011), fígado (COSTA et al., 2013; SOARES et al., 2017b; STEFANELLO et al., 2009), rim (SOARES et al., 2017b), músculo esquelético (SCHWEINBERGER et al., 2015) e macrófagos *in vitro* (DOS SANTOS et al., 2016).

Sistema Imunológico e Inflamação

O processo inflamatório pode ser definido como uma reação complexa do organismo à infecção ou agressão. Caracteriza-se como um mecanismo com função protetora para controle de infecções e desempenho de reparo tecidual, porém em excesso ou descompensada pode provocar lesões ou até doenças autoimunes. Os sinais clínicos característicos da inflamação são: rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (ABBAS et al., 2008; CRUVINEL et al., 2010). A resposta inflamatória envolve várias moléculas, sendo algumas associadas também à resposta

imunológica, como citocinas e quimiocinas (OLIVEIRA et al., 2011; TURNER et al., 2014).

As citocinas são moléculas proteicas, que enviam sinais estimulatórios, modulatórios e inibitórios para as variadas células do sistema imune. Essas moléculas atuam por ligações com receptores específicos, assim ativam mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica (OLIVEIRA et al., 2011; TURNER et al., 2014). Dessa forma, as citocinas modulam a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência das células do sistema imune, controlando a produção de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. As anti-inflamatórias são interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) e fator transformador de crescimento β (TGF- β) e as pró-inflamatórias são interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7) e TNF- α (OLIVEIRA et al., 2011; TURNER et al., 2014).

O sistema imune pode ser dividido em dois mecanismos principais: o sistema imune inato e o adaptativo. No sistema imune adaptativo é necessário um determinado tempo para atuar contra um organismo agressor, tendo memória imunológica e possuindo especificidade para um antígeno. Ele entende que já encontrou anteriormente o invasor e age mais rapidamente a exposições futuras perante o mesmo agente. O sistema é composto por células como linfócitos T e B e fatores humorais (MACÊDO et al., 2010; ROSA & VAISBERG, 2002).

A defesa inata possui um sistema que, na maioria das vezes, está presente e pronto para ser ativado em determinada infecção, não é específico para um antígeno, pois reage da mesma forma para inúmeros organismos, é caracterizado por não apresentar memória imunológica e ser a defesa de primeira linha do organismo (MACÊDO et al., 2010; ROSA & VAISBERG, 2002). Os mecanismos atuam através de barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. Os componentes da imunidade inata são: epitélios e substâncias químicas antimicrobianas; as células efectoras, sendo as principais as fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas e células *Natural Killer* (NK); sistema complemento; citocinas e quimiocinas (ABBAS et al., 2008; BALESTIERI, 2005; HENDRY et al., 2013).

Cabe salientar que foi demonstrado recentemente que elevados concentrações de Met e/ou MetO são capazes de aumentar os níveis de proteína C

reativa, de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α em soro de ratos jovens (SOARES et al., 2018). Além disso, esses aminoácidos são capazes de induzir *in vitro* um fenótipo pró-inflamatório em macrófagos peritoneais de camundongos (DOS SANTOS et al., 2016).

3.5.1 Macrófagos

Os macrófagos são classificados como componentes do sistema fagocítico mononuclear, juntamente com os monócitos e as células dendríticas. Eles atuam amplamente em parâmetros regulatórios, como na indução ou resolução da inflamação, ação tumoricida, microbicida, produção de citocinas, apresentação de antígenos aos linfócitos, na reparação e renovação tecidual (LEE et al., 2005). Dessa forma, os macrófagos são especializados na fagocitose e neutralização de detritos celulares e agentes perigosos, como os patógenos. Essas células imunes podem estar presentes em vários locais do organismo, diferenciando-se de maneira específica de acordo com a morfologia e funções características de cada tecido (GORDON, 2003; VAROL et al., 2015). São capazes de reconhecer uma ampla gama de moléculas de sinalização, como os lipopolissacarídeos (LPS) liberados da parede celular bacteriana e citocinas, incluindo IFN- γ e TNF- α , produzidas por outras células imunes (SALIM et al., 2016). De maneira geral, possuem um papel fundamental na orquestração da reação inflamatória através do fornecimento de quimiocinas e citocinas, que irão recrutar e ativar os neutrófilos, os monócitos e os linfócitos (GORDON, 2003).

Existem mecanismos que podem realizar mudanças no perfil de ativação dos macrófagos, podendo citar o dano celular através de sinais de perigo endógeno, além de fatores de sinalização, como a produção diferencial de citocinas de linfócitos Th1 e Th2 da resposta imune inata e adaptativa, podendo aumentar a produção de fatores com atividade antimicrobiana ou resultar em susceptibilidade a infecções (ABBAS et al., 2008).

O processo de polarização dos macrófagos ocorre através de sinais externos que os macrófagos recebem, transformando essas células de acordo com os sinais recebidos no seu ambiente. Os macrófagos ativados classicamente/M1 são chamados de pró-inflamatórios - secretam citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-6 e interleucina-23 (IL-23), esses macrófagos são ativados por ligantes do tipo toll-like

(TLR), como LPS ou IFN- γ . Já os macrófagos ativados alternativamente/M2 são anti-inflamatórios - promovem o reparo tecidual, produzem fatores de crescimento e expressam níveis elevados de arginase, sendo ativados pela IL-4 e TGF- β (Figura 4) (LI et al., 2018). Dessa forma, os macrófagos servem como potentes células efetoras imunes, tendo importantes funções na homeostase dos tecidos, assim como na reabilitação da doença, pois desempenham papéis desde o início até a progressão da lesão tecidual, realizam a cicatrização de feridas e a remodelação dos tecidos (DUFFIELD et al., 2005; MANTOVANI & LOCATI, 2013).

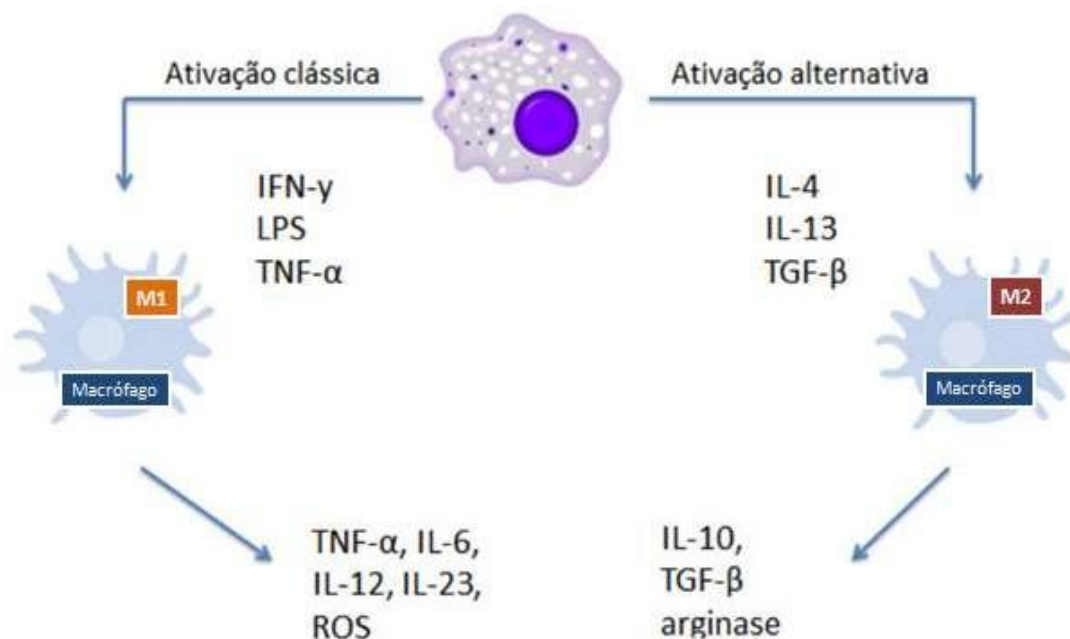


Figura 4: Ativação de macrófagos M1 e M2 (Adaptado Martinez et al., 2009).

A polarização de macrófagos vem sendo associada à expressão de uma variedade de genes. Quando ocorre alta expressão de arginase, os macrófagos M2 geram ornitina, que irá promover proliferação e reparo, já os macrófagos M1 expressam iNOS e geram NO, que participa da defesa do hospedeiro frente a patógenos invasores e inibe a proliferação celular. Os macrófagos de fenótipo M1 caracterizam-se pela alta liberação de TNF- α e produção de ERN e ERO, apresentando atividade pró-inflamatória (MOSSER & EDWARDS, 2008).

Assim, foi proposta a existência de três grupos de macrófagos: ativados, de reparo tecidual e reguladores. Os macrófagos ativados são os clássicos, possuem função tumoricida e microbicida, produzem altas quantidades de mediadores pró-inflamatórios, atuam na apresentação de antígenos aos linfócitos T relacionados

com a resposta imune celular. Já os macrófagos de reparo tecidual são ativados pela IL-4, realizam a estimulação dos fibroblastos e facilitam a deposição de matriz extracelular. Os reguladores agem através da liberação de uma citocina anti-inflamatória, a IL-10 (CRUVINEL et al., 2010).

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, demonstraram que a exposição a Met e/ou MetO induz *in vitro* o fenótipo clássico/M1 de macrófagos peritoneais de camundongos que é caracterizado pelo aumento da atividade da enzima iNOS bem como aos níveis elevados de TNF- α (DOS SANTOS et al., 2016). Nesse mesmo estudo foi mostrado que Met e/ou MetO altera o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de adenina, promovendo o aumento das atividades de ATPase e ADPase em macrófagos. Por fim, foi relatado que os tratamentos promoveram alterações no estado redox dos macrófagos como alteração na atividade da SOD e CAT, bem como nos níveis de ERO (DOS SANTOS et al., 2016).

Sistema Purinérgico

O controle da resposta inflamatória é extremamente importante para a manutenção das funções biológicas do organismo e vias de sinalização, como o sistema purinérgico, modulam esse complexo sistema (AGTERESCH et al., 1999; BODIN & BURNSROCK, 2001). A sinalização purinérgica é mediada pelos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina no meio extracelular, sendo vista como um meio de comunicação célula-célula, relacionada a processos neuronais e não neuronais em eventos de curta e longa duração, incluindo secreção exócrina e endócrina, resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação, proliferação e morte celular. Dessa forma, esse sistema possui grande interesse de estudo levando em conta o seu envolvimento na modulação de diferentes condições fisiopatológicas (BURNSROCK, 2006; ELTZSCHIG et al., 2012).

O sistema purinérgico é composto pelos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina como ATP, ADP, AMP e adenosina (Ado). Essas são importantes moléculas que medeiam a sinalização purinérgica, sendo liberadas para o meio extracelular por exocitose, transportadores específicos, canais ou mecanismos patológicos (VERKHRATSKY et al., 2009). Também fazem parte do sistema os receptores

purinérgicos e as enzimas ectonucleotidases, responsáveis por modular a concentração dessas moléculas no meio extracelular (YEGUTKIN, 2008).

Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

Os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina no meio extracelular estão em baixas concentrações em situações fisiológicas, porém em condições inflamatórias e de estresse ocorre aumento na concentração dessas moléculas. Os nucleotídeos extracelulares ATP, ADP e AMP, bem como a Ado, estão envolvidos em diversas funções fisiológicas. Logo após a descoberta do ATP e ADP, o interesse era voltado apenas a sua função energética intracelular (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; VASSORT, 2001). Atualmente, é bem descrita a funcionalidade dessas moléculas também como mensageiros, capazes de sinalizar uma variedade de efeitos biológicos no meio extracelular (BURNSTOCK, 2006). 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).

O ATP é visto como um sinal de dano, quando liberado em altas concentrações contribui para desencadear a resposta imune inflamatória em conjunto com os padrões moleculares associados a patógenos (MARIATHASAN & MONACK, 2007). A liberação dessa molécula pode ser por exocitose vesicular, por transportadores ou pelos canais acoplados à panexina ou conexina (IDZKO et al., 2014). Dessa forma, estudos demonstram que o ATP é uma molécula pró-inflamatória, devido a sua capacidade de favorecer a ativação e proliferação de linfócitos T além de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2 e IFN- γ) (BOURS et al., 2006; LANGSTON et al., 2003). Além disso, esse nucleotídeo está relacionado ao recrutamento de monócitos circulantes para o tecido alvo, na migração e diferenciação de células dendríticas e a produção de IL-1 β , IL-1 e TNF- α nos macrófagos (ELSSNER et al., 2004; VENTURA & THOMOPOULOS, 1995).

A Ado também é uma molécula importante para o processo inflamatório, mas diferentemente do ATP, atua como imunossupressora e anti-inflamatória (ANTONIOLI et al., 2014). Porém, os mecanismos relacionados a essas ações da Ado ainda são investigados. É descrito que esse nucleosídeo promove a maturação

de monócitos e também inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias: interleucina-12 (IL-12), IL-6 e TNF- α (CSÓKA et al., 2012; HASKÓ 1996, 2000; THIELE, 2004). Além disso, alguns estudos demonstraram que a Ado diminui a adesão de linfócitos durante a inflamação, diminui a proliferação de células-T e inibe a secreção de IL-2, IL-4 e IFN- γ por células CD4⁺ (GESSI et al., 2004; KOSHIBA et al., 1999).

Receptores purinérgicos

No espaço extracelular as purinas atuam através de receptores específicos, subdivididos em duas famílias: receptor purinérgico ionotrópico (P2X), que são ligados a canais iônicos e são ativados pelo ATP e receptor purinérgico metabotrópico (P2Y) os quais são acoplados a proteína G e respondem ao ATP e ADP (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). A família de receptores do tipo P2X compreende sete membros (P2X_{1,2,3,4,5,6,7}) e possuem sua porção amino-terminal e carboxi-terminal voltadas para o citoplasma celular. Já os receptores P2Y apresentam oito subtipos (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}), com porção amino-terminal extracelular e uma carboxi-terminal intracelular e sete regiões transmembrana. Os receptores de Ado são proteínas transmembrana acoplados a proteína G do tipo P1 e são divididos em quatro subtipos (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) (BURNSTOCK, 2006).

Esses receptores purinérgicos estão distribuídos em todo o SNC e são capazes de regular o balanço entre a liberação e os efeitos de ATP, ADP e Ado (BONAN et al., 2001). Na superfície de monócitos e macrófagos encontram-se os receptores P2X e P2Y, cujas expressões são moduladas através de estímulos ambientais e o estágio de maturação celular (DI VIRGILIO et al., 2001; LEMAIRE et al., 2006; SILVA et al., 2011). Quando os macrófagos sofrem ação do IFN- γ , LPS ou TNF- α ocorre aumento na expressão de receptores P2X₇, levando a adesão celular ao endotélio vascular, importante para produção de quimiocinas e a consequente saída dos leucócitos dos vasos sanguíneos - diapedese (HUMPHREYS & DUBYAK, 1996).

Enzimas que degradam os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

Os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina no meio extracelular podem exercer importantes funções relacionadas a resposta imune, a inflamação e a

agregação plaquetária, por exemplo. Dessa forma é de extrema importância a manutenção dos níveis extracelulares dessas moléculas a fim de manter a homeostase fisiológica. As concentrações desses nucleotídeos e nucleosídeos são reguladas pela ação de enzimas que podem estar ancoradas à membrana celular com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular ou podem ser encontradas na forma solúvel no meio intersticial ou fluidos corporais. Dentre essas enzimas se encontram as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase), a família das E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases) as quais hidrolisam o ATP e o ADP até AMP esse conjunto de enzimas são chamadas de ectonucleotidases. Já a 5'-nucleotidase/CD73 hidrolisa AMP formando Ado e a adenosina deaminase a qual faz a desaminação da Ado formando inosina (ROBSON et al., 2006; YEGUTKIN, 2008).

É relatado a presença de oito tipos de NTPDases, os subtipos se diferenciam de acordo com localização celular, funcionalidade, especificidade por substratos e distribuição tecidual. Quatro delas estão na membrana celular (NTPDases 1, 2, 3 e 8) com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular, as demais enzimas estão localizadas no interior da célula (NTPDases 4, 5, 6 e 7)(YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN et al., 2007; ZIMMERMANN, 2001).

A NTPDase 1 é reconhecida como um marcador de ativação de linfócito B, entretanto essa enzima também é expressa em linfócitos T. Além disso, a NTPDase 1 pode ser encontrada em células dendríticas, plaquetas, leucócitos, células endoteliais e células do SNC (DWYER et al., 2007; ROBSON et al., 2006). As NTPDases possuem um papel protetor contra a lise celular causada pelo ATP extracelular em linfócitos T citosólicos, além disso, a atividade da NTPDase 1 é necessária para a funcionalidade dessas células como reconhecimento de antígenos e ativação da atividade efetora das células-T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990a, 1990b).

Estudos evidenciam a relação entre as E-NTPDases e 5'-nucleotidase/CD73 na neurotransmissão em vários processos patológicos. Um aumento na atividade dessas enzimas pode ser um mecanismo adaptativo, diminuindo as concentrações de ATP e aumentando as concentrações de Ado, fornecendo neuroproteção (LUNKES et al., 2004).

Um estudo relata que a Hcy *in vitro* foi capaz de diminuir a hidrólise dos nucleotídeos de adenina - ATP e ADP em plaquetas de ratos (ZANIN et al., 2010).

Em contrapartida, outro estudo verificou que em macrófagos a Hcy promoveu aumento na hidrólise de ATP, ADP e AMP (ZANIN et al., 2013). Outros trabalhos relatam que o acúmulo plasmático de aminoácidos pode modular a atividade das ectonucleotidases, as quais podem estar envolvidas na fisiopatologia de algumas doenças (ROSEMBERG et al., 2010; SCHERER et al., 2012; ZANIN et al., 2012).

4 Manuscrito

O presente manuscrito está formatado segundo as normas da revista a qual foi submetido: Amino Acids

Characterization of Macrophage Phenotype, Redox, and Purinergic Response upon Chronic Treatment with Methionine and Methionine Sulfoxide in Mice

Thaís S. Franceschi¹, Mayara S.P. Soares², Nathalia S. Pedra², Natalia P. Bona¹, Luíza Spohr², Fernanda C. Teixeira², Carlus A.T. do Couto², Roselia M. Spanevello², Marion Deon³, Carmen R. Vargas³, Elizandra Braganhol⁴, Francieli M. Stefanello^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

²Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

³Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DCBS), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding Author:

Francieli M. Stefanello (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

Hypermethioninemia is a disorder characterized by high plasma levels of methionine (Met) and its metabolites such as methionine sulfoxide (MetO). Studies have reported associated inflammatory complications, but the mechanisms involved in the pathophysiology of hypermethioninemia are still uncertain. The present study aims to evaluate the effect of chronic administration of Met and/or MetO on phenotypic characteristics of macrophages, in addition to oxidative stress, purinergic system, and inflammatory mediators in macrophages. In this study, Swiss male mice were subcutaneously injected with Met and MetO at concentrations of 0.35-1.2 g/kg body weight and 0.09-0.3 g/kg body weight, respectively, from the 10th-38th day post-birth, while the control group was treated with saline solution. The results revealed that Met and/or MetO induce an M1/classical activation phenotype associated with increased levels of tumor necrosis factor- α and nitrite, and reduced arginase activity. It was also found that Met and/or MetO alter the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase, as well as the levels of thiol and reactive oxygen species in macrophages. The chronic administration of Met and/or MetO also promotes alteration in the hydrolysis of ATP and ADP, as indicated by the increased activity of ectonucleotidases. These results demonstrate that chronic administration of Met and/or MetO promotes activated pro-inflammatory profile by inducing M1/classical macrophage polarization. Thus, the changes in redox status and purinergic system upon chronic Met and/or MetO exposure may contribute towards better understanding of the alterations consistent with hypermethioninemic patients.

Key words: hypermethioninemia, ectonucleotidases, macrophage polarization, redox state, purinergic system, mice

1. Introduction

Isolated hypermethioninemia is a pathology characterized by abnormal elevation of plasma and tissue levels of methionine (Met)-an essential sulfur amino acid. This condition can be caused by non-genetic ailments and genetic disorders like methionine adenosyltransferase (MAT) deficiency (Mudd et al., 2000, 2003; Mudd 2011). MAT deficiency results in Met accumulation through its non-metabolization to S-adenosylmethionine where the excess Met is metabolized in alternative routes forming methionine sulfoxide (MetO). Hypermethioninemic patients may present clinical symptoms such as hepatic changes and neurological dysfunctions, whose pathophysiology is not yet well established (Gaul and Tallan 1974; Schweinberger and Wyse 2016).

Few studies have shown that high concentration of Met and/or MetO can be extremely harmful for hepatic homeostasis (Costa et al., 2013; Soares et al., 2017b), kidney (Soares et al., 2017b), brain (Soares et al., 2017a; Stefanello et al., 2005) and skeletal muscles (Schweinberger et al., 2015). Experimental models of hypermethioninemia demonstrate an increase in pro-inflammatory mediators and a reduction in anti-inflammatory cytokine production (Dos Santos et al., 2016; Soares et al., 2018, 2019). In addition, high Met and/or MetO levels alter important modulating systems of the cells involved in the immune and inflammatory processes, such as macrophages (Dos Santos et al., 2016), lymphocytes (Soares et al., 2018), and platelets (Soares et al., 2019). Furthermore, Dos Santos et al. have demonstrated that Met and/or MetO increase the activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF- α levels *in vitro*; thereby demonstrating the ability to induce M1/classical macrophage polarization (pro-inflammatory phenotype). However, *in vivo* effects of hypermethioninemia on macrophage polarization has not been investigated.

Macrophages are myeloid cells of immune system and are responsible for the process of phagocytosis (Varol et al., 2015) for maintaining normal homeostasis as well as pathological processes (Li et al., 2018). Macrophages are modulated by the microenvironment and can be activated by M1/classical or M2/alternative pathways. Macrophage polarization is not a fixed phenomenon because these cells are capable of interacting with various signals such as the microbiota, damaged tissues and their danger signals such as cytokines, reactive oxygen species (ROS) and nucleotides

and nucleosides of adenine (Dos Santos et al., 2016; Li et al., 2018; Varol et al., 2015). It is known that M1 macrophages are characterized by the production of nitric oxide (NO) and ROS, which are important molecules that trigger the process of oxidative stress (Halliwell 2011; Mosser and Edwards 2008). Several evidences have demonstrated that oxidative stress plays a crucial role in the development and maintenance of inflammatory processes, thus acting as an important adjuvant in the pathophysiology of various diseases (Lugrin et al., 2014).

Another important modulator of macrophage activation is adenosine triphosphate (ATP) which is an important pro-inflammatory molecule. The release of ATP, by inflammatory cells including macrophages, may favor inflammation by stimulating cells of the immune system and production of interleukin-6 (IL-6) and TNF- α (Dosch et al., 2019; Dos Santos et al., 2016; Idzko et al., 2014; Junger 2011). In contrast, adenosine performs an important anti-inflammatory and immunosuppressive role by reducing the production of pro-inflammatory cytokines (Antonioli et al., 2014). It is known that the regulation of the extracellular levels of these molecules is modulated by E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Robson et al., 2006). Thus, investigating the activity of these enzymes forms an intriguing aspect to be studied for understanding the role of purinergic system in the pathophysiology of hypermethioninemia (Dosch et al., 2019; Dos Santos et al., 2016; Idzko et al., 2014; Junger 2011).

Although studies have demonstrated inflammatory complications associated with hypermethioninemia, the exact pathophysiological mechanisms of this disorder have not been completely elucidated. In this sense, the aim of this work is to investigate the possible role of macrophages in the pathophysiology of hypermethioninemia through the evaluation of macrophage phenotype, cell viability and proliferation. In addition, the study also aimed at studying the involvement of oxidative stress, purinergic system and inflammatory mediators in macrophages from young mice subjected to chronic administration of Met and/or MetO.

2. Materials and Methods

Chemicals

Nucleotides (ATP, ADP, AMP), Met and MetO were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) and fetal bovine serum were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). The cytokine detection kit for TNF- α was supplied by BD optEIA™ (San Jose, CA, USA). The kit to determine glutathione peroxidase activity was obtained from Randox Lab (Antrim, UK). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

Animals

Swiss male mice were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. The animals were maintained at a constant temperature ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) on a 12 hours light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation from the Federal University of Pelotas (protocol under project number: CEEA 9221-2013).

2.3 Chronic treatment with Met and/or MetO

Ten-day-old Swiss mice were divided into four groups: I (control), II (treated with Met), III (treated with MetO), and IV (treated with Met + MetO). Doses of Met and MetO administered were chosen to induce high plasma levels similar to those found in patients affected by hypermethioninemia as described by previous studies (Costa et al., 2013; Soares et al., 2017b; Stefanello et al., 2007a). Met (0.35 – 1.2 g/kg) and MetO (0.09 – 0.3 g/kg) were administered to mice subcutaneously twice a day from day 10 to 38 of life. The animals of group IV received a combination of Met and MetO, whereas control mice received saline solution in the same volume. Twelve hours after the treatment, the mice were anesthetized with isoflurane and macrophages of peritoneal cavity were collected as described further in section 2.5.

Amino acid quantification

Methionine and homocysteine levels were determined in plasma as described by Joseph and Marsden (1986) and Araki and Sako (1987), respectively; using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Macrophage primary culture

The macrophage primary culture was carried out according to the methodology previously established by Dos Santos et al. (2016). Briefly the macrophages were obtained by washing the peritoneal cavity using RPMI1640/FBS-free culture medium. The macrophages were then washed with sterile phosphate buffered saline (PBS), resuspended in RPMI1640/FBS-free medium, and then transferred to 6, 48 or 96-well plates. The plates were incubated (37°C and 5% CO₂ atmosphere) for 30 min for adhesion of the cells. Subsequently, the culture medium was changed and the adhered cells mainly comprising of peritoneal macrophages, were used for subsequent experiments.

Cell viability and proliferation

For both cell viability and proliferation assays, the macrophages were seeded into 96-well plates. After 18 h of culture, the cell viability was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, which evaluates the ability of viable cells to reduce MTT into blue colored formazan crystals. In this assay, according to Dos Santos et al. 2016, MTT was added in the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL for 90 min. After the incubation time, the MTT medium was removed followed by dissolving the formazan crystals in DMSO by shaking. The formazan intensity was then measured at 492 nm. Sulforhodamine B (SRB) was used to evaluate cell proliferation. This assay was also performed after 18 h of culturing the macrophages. Briefly, the cells were washed and fixed in trichloroacetic acid (TCA) for 45 min at 4°C. After removal of TCA, the cells were washed with distilled water and incubated for 30 min with SRB solution for the staining of proteins. The SRB was then removed and the cells were washed with acetic acid. Finally, SRB was eluted in Tris solution (10 mM) and its absorbance was measured at 530 nm

according to Dos Santos et al. 2016. The results of MTT and SRB were expressed as absorbance (cells from the control group).

Characterization of macrophages phenotype

TNF- α levels were evaluated in the conditioned media of macrophage culture using commercial kit Mouse TNF ELISA of brand BD optEIA™. Nitrite levels were determined by Griess assay (Stuehr and Nathan, 1989), in which 100 μ L of culture media was incubated with 100 μ L of 1% sulfanilamide and 100 μ L of N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride at room temperature for 20 min. The nitrite was quantified at 540 nm using sodium nitrite as standard. The results were expressed as μ M per mg of protein.

To determine the activity of arginase, cell lysate was used according to Corraliza et al. 1994. This method is based on the conversion of L-arginine into L-ornithine and urea. Briefly, the macrophage cells were lysed with 0.1% Triton X-100 for 30 min. For activation of the enzyme, 30 μ L of 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 10 μ L of 10 mM $MnCl_2$ were added and then incubated at 56°C for 10 min. Similar quantities of cell lysate samples 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 H_2SO_4 (96 %), H_3PO_4 (85 %), H_2O (1/3/7, v/v/v). The urea concentration was measured at 540 nm after the addition of 6 % α -isonitrosopropiophenone, followed by heating at 95°C for 30 min. Results were expressed as nmol urea per min per mg of protein.

Redox profile

Determination of antioxidant enzyme activities

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the method described by Misra and Fridovich (1972) which is based on the auto-oxidation of adrenaline. Briefly catalase (CAT) was added to macrophage cell lysate followed by addition of glycine buffer and adrenaline to start the enzymatic reaction which was monitored at 480 nm. This enzyme activity was reported as percentage of SOD as compared to control cells.

CAT activity was measured in the macrophage cell lysates based on the hydrogen peroxide (H_2O_2) decomposition, as previously described by Aebi (1984). Phosphate buffer containing hydrogen peroxide was added to the cell lysates and H_2O_2 decomposition was monitored at 240 nm. CAT activity was reported as percentage of CAT activity as compared to control cells.

GPx (glutathione peroxidase) activity was measured in the cell lysates according to the commercial kit instructions (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, United Kingdom). GPx activity was reported as percentage of GPx activity as compared to control cells.

Total sulfhydryl content

Total sulfhydryl levels were measured in the cell lysates as described by Aksenov and Markesbery, 2001. This test is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols along with its conversion to oxidized disulfide form that generates a yellow derivative (TNB) measurable at 412 nm. Briefly, the cell lysates were added to PBS buffer (pH 7.4) containing EDTA. The reaction was started by the addition of DTNB. Thiol levels in different groups of cell lysates were reported as percentage of thiol level as compared to control cells.

Determination of Reactive Oxygen Species (ROS)

The ROS levels were determined according to Dos Santos et al. 2016 using the DCFH-DA assay (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), which reacts with ROS and emits fluorescence. In this assay, the macrophages were incubated with DCFH-DA for 30 min and fluorescence was determined on a microplate reader (485/520nm). ROS production was reported as percentage of ROS as compared to control cells.

ATP, ADP and AMP hydrolysis

The activity of the ectonucleotidases was evaluated in 48 well plates containing viable macrophages, which were first washed 3 times with phosphate and nucleotide free incubation medium. To initiate the enzymatic reaction, the cells were

incubated with medium containing 2 mM CaCl_2 (2 mM 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. After incubation at 37°C for 10 min, the reaction was stopped with 10% TCA. The production of inorganic phosphate (Pi) was measured by the method described previously (Chan et al., 1986) by using malachite green and KH_2PO_4 as standard. The protein concentration was determined by Coomassie blue method (Bradford, 1976). Specific activity was expressed in nmol of Pi released per min per mg of protein.

Statistical analysis

Data are represented as mean $\pm$ standard error and subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test (for multiple comparisons) using GraphPad Prism 5. Difference between the values are considered significant for a $P < 0.05$.

3. Results

Administration of Met and/or MetO increases plasma levels of Met and homocysteine in mice.

In order to assess the suitability of our method for developing an experimental model of hypermethioninemia, male Swiss mice were administered with Met (1.2 g/kg) and/or MetO (0.3 g/kg) and amino acid levels were determined. The results revealed that the plasma concentrations of Met and homocysteine were elevated in the mice treated with Met and Met + MetO at 1 h after administration (**Table 1**).

3.2 Met and/or MetO do not affect viability but increase proliferation of macrophages.

Our results revealed that Met and/or MetO treatment does not present alteration in macrophage cell viability as assessed by MTT (**Figure 1A**, $P > 0.05$). However, an increase in macrophage proliferation is observed in the Met + MetO group as compared to the control group according to the evaluation by SRB assay

(**Figure 1B**, $P<0.05$). No difference in macrophage proliferation is observed in the Met and MetO treated groups (**Figure 1B**, $P>0.05$).

Met and/or MetO treatment induces classical macrophage polarization in mice.

To determine the effect of Met and/or MetO treatment on phenotypic characteristics of mice macrophages, TNF- α and nitrite levels along with arginase activity were assessed. The results revealed that there is a significant increase of TNF- α levels in macrophages from the Met ($P<0.001$), MetO ($P<0.01$) and Met + MetO ($P<0.001$) treated groups when compared to the control group (**Figure 2A**). Similarly, nitrite levels are found to be increased in the Met ($P<0.001$), MetO ($P<0.01$) and Met + MetO ($P<0.05$) when compared to control group (**Figure 2C**). However, arginase activity is found to be significantly lower in the macrophages of the MetO ($P<0.05$) and Met + MetO ($P<0.05$) groups when compared to the control group (**Figure 2B**).

Met and/or MetO affects oxidative stress in macrophages.

In order to assess the effect of Met and/or MetO treatment on oxidative stress inside the macrophages, various parameters of oxidative stress were determined. Our results revealed that there is a significant increase in the SOD activity in the macrophages of the Met group ($P<0.001$) whereas it is reduced in the macrophages of the Met + MetO group ($P<0.01$) as compared to the control group. However, there was no significant difference in SOD activity in the cells of MetO group ($P>0.05$) (**Figure 3A**). With respect to CAT activity, our data showed that there is a reduction in the enzymatic activity in the macrophages of the Met ($P<0.01$), MetO ($P<0.001$) and Met + MetO groups ($P<0.001$) as compared to the control group (**Figure 3B**). Similar results were obtained for GPx activity, which is found to be significantly lower in the macrophages of the MetO ($P<0.001$) and Met + MetO ($P<0.001$) groups (**Figure 3C**).

Thiol content analysis revealed that it is increased in the macrophages of the Met group ($P<0.01$); however, a reduction in this marker was observed in the MetO ($P<0.01$) and Met + MetO ($P<0.001$) groups when compared with the control group

(**Figure 3D**). Upon assessment of ROS levels, it was found that there is reduction in the production of these species in the macrophages of the Met ($P<0.05$), MetO ($P<0.05$) and Met + MetO ($P<0.05$) groups as compared to the control group (**Figure 3E**).

Met and/or MetO alters nucleotide hydrolysis in macrophages.

In order to assess the effect of Met and/or MetO on ATP metabolism- an important modulator of macrophage activation; the activity of macrophage ectonucleotidases was determined. Our data shows that there is an increase in the ATP hydrolysis upon Met ($P<0.001$) and MetO ($P<0.01$) treatment (**Figure 4A**). Similarly, ADP hydrolysis is also increased in the macrophages of the Met ($P<0.05$) and MetO ($P<0.05$) groups (**Figure 4B**). However, no significant difference is observed in AMP hydrolysis in any of the experimental conditions ($P>0.05$) (**Figure 4C**).

4. Discussion

Although hypermethioninemia is a rare disease, it can cause a number of significant changes that can compromise the quality and life expectancy of affected patients. Some symptoms and clinical signs associated with this pathological condition have been reported in recent years. However, the pathophysiological mechanisms involved in the origin and maintenance of these symptoms remain poorly understood (Martins et al., 2012; Mudd et al., 2000, 2001; Nashabat et al., 2018). In order to overcome the gap in this knowledge, our research group has made efforts to understand the pathophysiology of hypermethioninemia using pre-clinical animal models. We believe that using pre-clinical animal models to understand hypermethioninemia, may shed light on the better therapeutic approaches for the management of this pathological condition in future. In this regard, we have first determined the plasma levels of amino acids after acute administration of Met/MetO to verify whether the doses administered in mice are capable to reproduce the concentrations of Met observed in hypermethioninemic patients as previously demonstrated in rats by Stefanello and colleagues (2007a). The results revealed that concentrations of Met approximately 50-fold the normal levels (control) are

achievable in the plasma of Met and Met+MetO groups upon subcutaneous administration. The homocysteine levels were also found to be increased in these experimental groups. Similarly, Stefanello et al (2011) had demonstrated that the plasma levels of homocysteine, a metabolite of Met, enhances 1 h after last injection of Met chronic treatment.

Some studies have demonstrated the intrinsic relationship between the experimental models of hypermethioninemia and inflammatory process (Dos Santos et al., 2016; Schweinberger et al., 2015; Soares et al., 2018). It has been reported that acute and chronic hypermethioninemia induces a pro-inflammatory environment (Soares et al., 2018). In addition, alterations in the pathways capable of modulating the immune and inflammatory processes such as the purinergic and cholinergic systems are observed in lymphocytes (Soares et al., 2018).

Dos Santos et al. (2016) had performed an *in vitro* study in which peritoneal macrophages were exposed to concentrations of Met and/or MetO similar to those found in hypermethioninemia. The authors reported that these amino acids induce M1/classical macrophages polarization as observed by the increased levels of TNF- α and iNOS activity, as well as modulation of oxidative stress and purinergic signaling; favoring the pro-inflammatory environment (Dos Santos et al., 2016). Therefore, in order to explore deeper into the work previously performed by our research group, we investigated the effect of chronic hypermethioninemia on the polarization of macrophages and the involvement of oxidative and inflammatory markers.

We observed that chronic administration of Met and/or MetO did not alter the viability of peritoneal macrophages after 18 hr incubation for subsequent analysis. However, Met + MetO increased macrophage proliferation. On the other hand, we demonstrated an increase in the production of TNF- α and nitrite levels- the indirect marker of iNOS activity, as well as a reduction in arginase activity. Altogether, these findings implicate the involvement of M1/classical polarization of macrophage as these cells have cytotoxic capacity through increased iNOS activity- elevated NO production in response to inflammatory mediators. In addition, M1 macrophages also increase the release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, and IL-1 β (Mosser and Edwards 2008). These findings are in accordance with previous *in vitro* data described by Dos Santos and colleagues, (2016) demonstrating that Met and/or MetO increase the activity of iNOS and TNF- α levels. In contrast to previous findings, we have observed a significant reduction in the arginase activity,

thus demonstrating that chronic hypermethioninemia *in vivo* may potentiate macrophage polarization to a pro-inflammatory phenotype.

Various reports suggest a potential role of oxidative stress in the pathophysiology of hypermethioninemia (Costa et al., 2013; Dos Santos et al., 2016; Schweinberger et al., 2014, 2018; Soares et al., 2017a, b; Stefanello et al., 2005, 2007b, 2009, 2011). In the present study, we have demonstrated that chronic exposure to Met increases total thiol content in macrophages, which could contribute to reduction in ROS levels also observed in this group. In addition, Met increases the activity of SOD and reduces CAT activity; which are enzymes that detoxify superoxide anion and hydrogen peroxide respectively. Corroborating with our findings, similar results were reported in liver and macrophages *in vitro* (Costa et al., 2013; Dos Santos et al., 2016). However, the peritoneal macrophages from the MetO and the association of Met + MetO groups present a reduction in total thiol and ROS levels, as well as in CAT and GPx activities. The reduction in the activity of antioxidant enzymes may be due to the reduction of ROS, which are the substrates of these enzymes. In addition, ROS reduction may be a compensatory response of macrophages in order to attenuate the inflammatory response caused by hypermethioninemia. On the other hand, MetO can be reduced by the enzymes methionine sulfoxide reductase until Met in turn can form S-adenosylmethionine (Yoon et al., 2016); which can reduce the oxidative stress. In addition, the phenomenon of ROS scavenging by Met-MetO cycle cannot be sidelined, since these species react with Met residues forming MetO (Luo and Levine 2009).

Although several studies show that the M1/classical macrophages polarization increases ROS production (Mosser and Edwards 2008), study we did not observe this relationship in the present. This leads us to infer that other antioxidant or compensatory mechanisms may be interfering with ROS levels. However, it is well established that there is a positive correlation between the presence of oxidative stress and the inflammatory process, since many mediators released in both these conditions can exert a multidirectional effect and are involved in the pathophysiology of many disorders (Suzuki et al., 2016). In a similar way, other systems such as the purinergic can also modulate the immune and inflammatory response (Dosch et al., 2018, 2019). ATP and adenosine play an opposite role on the inflammatory process, where the ATP acts as a pro-inflammatory molecule via mainly the P2x7 and P2y11 receptors on macrophages; while adenosine plays an anti-inflammatory role through

its binding to purinergic receptors present on the cell membranes (Dosch et al., 2019; Junger 2011). The importance of signaling by these molecules is already well established in literature and delineating the mechanisms by which their levels are modulated in the extracellular environment become important; in order to understand pathophysiological mechanisms as well as possible therapeutic targets. Thus, the investigation of the activity of ectonucleotidases- the enzymes that modulate the extracellular levels of the nucleotides and adenine nucleosides; becomes an important aspect to be studied in the macrophages of animals subjected to the chronic protocol of hypermethioninemia.

Here it can be noted that when Met or MetO are given alone, they induce an increase in the hydrolysis of ATP and ADP by macrophages. Increase in the extracellular concentrations of ATP stimulated by high levels of TNF- α may account for this increase in the enzymatic activity of NTPDases under the given conditions. Thus, it can be inferred that the increase in the activity of NTPDases may be a mechanism for an underlying attempt to moderate the pro-inflammatory response induced by ATP (Dosch et al., 2018). On the other hand, the association of Met and MetO did not alter the activity of NTPDases, in addition to exhibiting a lower proportion of ATP hydrolysis. Although precise explanation for this result is unavailable yet, it can be speculated that Met and MetO together prevent the compensatory response to the increased activities of NTPDases to hydrolyze ATP that potentiates the inflammatory response. Besides, it is feasible that the increase of proteins observed by the increase in SRB may be a determining factor for the maintenance of the hydrolysis of these nucleotides in the Met + MetO groups in a fashion observed similarly in the control group.

5. Conclusion

Overall, findings of the present study demonstrate that chronic hypermethioninemia alters oxidative and inflammatory parameters and modulates the activity of ectonucleotidases in peritoneal macrophage, leading to M1/classical pro-inflammatory phenotype. Thus, these results strengthen the relationship between the inflammatory processes that are associated with hypermethioninemia. Furthermore, these findings may potentially contribute in future to the establishment of adequate therapeutics as well as promising agents for the better management of this disorder.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Universal Processo 454262/2014-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Finance code 001.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145.
- Antonioli L, Csóka B, Fornai M, Colucci R, Kokai E, Blandizzi C, Haskó G (2014) Adenosine and inflammation: what's new on the horizon?. *Drug Discov Today* 19:1051-1068.
- Araki A, Sako Y (1987) Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 422:43-52.
- Bradford MM (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.
- Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375-380.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174:231-235.
- Costa MZ, Da Silva TM, Flores NP, Schmitz F, Scherer EB, Viau CM, Saffi J, Barschak AG, Wyse AT, Spanevello RM, Stefanello FM (2013) Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol Cell Biochem* 384:21-28.

Dos Santos LM, Da Silva, TM, Azambuja JH, Ramos PT, Oliveira PS, Da Silveira EF, Pedra NS, Galdino K, Do Couto CAT, Soares MSP, Tavares RG, Spanevello RM, Stefanello FM, Braganhol E (2017) Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. *Mol Cell Biochem* 424:69-78.

Dosch M1, Gerber J, Jebbawi F, Beldi G (2018) Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *Int J Mol Sci* 19:1222.

Dosch M, Zindel J, Jebbawi F, Melin N, Sanchez-Taltavull D, Stroka D, Candinas D, Beldi G (2019) Connexin-43-dependent ATP release mediates macrophage activation during sepsis. *Elife* 8:e42670.

Gaull GE, Tallan HH (1974) Methionine adenosyltransferase deficiency: new enzymatic defect associated with hypermethioninemia. *Science* 186:59-60.

Halliwell B (2011) Free radicals and antioxidants-quo vadis?. *Trends Pharmacol Sci* 32:125-130.

Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509:310.

Joseph MH, Marsden CA (1986) Amino acids and small peptides. HPLC of small peptides. IRL Press, Oxford 13-27.

Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11:201.

Li Z, Wang L, Liu H, Muyayalo KP, Huang X, Mor G, Liao A (2018) Galectin-9 alleviates LPS-induced preeclampsia-like impairment in rats via switching decidual macrophage polarization to M2 subtype. *Front Immunol* 9:3142.

Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L (2014) The role of oxidative stress during inflammatory processes. *J Biol Chem* 395:203-230.

Luo S, Levine RL (2009) Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J* 23:464-472.

Martins E, Marcao A, Bandeira A, Fonseca H, Nogueira C, Vilarinho L (2012) Methionine adenosyltransferase I/III deficiency in Portugal: high frequency of a dominantly inherited form in a small area of Douro High Lands. *JIMD Rep* 6:107-112.

Misra HP, 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 DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958.

Mudd SH (2011) Hypermethioninemias of Genetic and Non-Genetic Origin: A Review. *Am J Med Genet Part C (Seminars in Medical Genetics)* 157:3-32.

Mudd SH, Jenden DJ, Capdevila A, Roch M, Levy HL, Wagner C (2000) Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. *Metabolism* 49:1542-1547.

Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 2001, vol. 2, pp 1279-1327.

Mudd SH, Tangerman A, Stabler SP, Allen RH, Wagner C, Zeisel SH, Levy HL (2003) Maternal methionine adenosyltransferase I/III deficiency: reproductive outcomes in a woman with four pregnancies. *JIMD* 26:443-458.

Nashabat M, Al-Khenaizan S, Alfadhel M (2018) Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: beyond the central nervous system manifestations. *Ther Clin Risk Manag* 14:225.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2:409.

Schweinberger BM, Rodrigues AF, Turcatel E, Pierozan P, Pettenuzzo LF, Grings M, Scaini, G, Parisi MM, Leipnitz G, Streck EL, Barbé-Tuana FM, Wyse ATS (2018) Maternal hypermethioninemia affects neurons number, neurotrophins levels, energy metabolism, and Na⁺, K⁺-ATPase Expression/Content in Brain of Rat Offspring. *Mol Neurobiol* 55:980-988.

Schweinberger BM, Schwieder L, Scherer E, Sitta A, Vargas CR, Wyse AT (2014) Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain Na⁺, K⁺-ATPase/Mg²⁺-ATPase activity and oxidative status of the offspring. *Metab Brain Dis* 29:153-160.

Schweinberger BM, Turcatel E, Rodrigues AF, Wyse AT (2015) Gestational hypermethioninaemia alters oxidative/nitrative status in skeletal muscle and biomarkers of muscular injury and inflammation in serum of rat offspring. *Int J Exp Pathol* 96:277-284.

Schweinberger BM, Wyse AT (2016) Mechanistic basis of hypermethioninemia. *Amino acids* 48:2479-2489.

Soares MSP, Costa MZ, da Silva TM, Gazal M, do Couto CAT, Debon GN, Rodrigues R, Azambuja JH, Casali EA, Moritz CEJ, Duarte MF, Braganhol E, Stefanello FM, Spanevello RM (2018) Methionine and/or methionine sulfoxide alter ectoenzymes activities in lymphocytes and inflammatory parameters in serum from young rats: acute and chronic effects. *Cell Biochem Biophys* 76:243-253.

Soares MSP, Mattos BS, Ávila AA, Spohr L, Pedra NS, Teixeira FC, Bona NP, Oliveira PS, Stefanello FM, Spanevello RM (2019) High levels of methionine and methionine sulfoxide: Impact on adenine nucleotide hydrolysis and redox status in platelets and serum of young rats. *J Cell Biochem* 120:2289-2303.

Soares MSP, Oliveira PS, Debom GN, Da Silveira BM, Polachini CR, Baldissarelli J, Morsch VM, Schetinger MRC, Tavares RG, Stefanello FM, Spanevello RM (2017b) Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. *Amino acids* 49:129-138.

Soares MSP, Viau CM, Saffi J, Costa MZ, Da Silva TM, Oliveira PS, Azambuja JH, Barschak AG, Braganhol E, Wyse ATS, Stefanello FM, Spanevello RM (2017a) Acute administration of methionine and/or methionine sulfoxide impairs redox status and induces apoptosis in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 32:1693-1703.

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

Stefanello FM, Ferreira AG, Pereira TC, da Cunha MJ, Bonan CD, Bogo MR, Wyse AT (2011) Acute and chronic hypermethioninemia alter Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. *Int J Dev Neurosci* 29:483-488.

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

Stefanello FM, Matté C, Scherer EB, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT (2007a) Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. *J Neurosci Methods* 160:1-4.

Stefanello FM, Scherer EB, Kurek AG, Mattos CB, Wyse AT (2007b) Effect of hypermethioninemia on some parameters of oxidative stress and on Na^+ , K^+ -ATPase activity in hippocampus of rats. *Metab Brain Dis* 22:172-182.

Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT (2003) In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18:147-154.

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

Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543-1555.

Suzuki S, Kodera Y, Saito T, Fujimoto K, Momozono A, Hayashi A, Kamata Y, Shichiri M (2016) Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. *Sci Rep* 6:38299.

Varol C, Mildner A, Jung S. (2015) Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol* 33:643-675.

Yoon SY, Hong GH, Kwon HS, Park S, Park SY, Shin B, Kim TB, Moon HB, Cho YS (2016) S-Adenosylmethionine reduces airway inflammation and fibrosis in a murine model of chronic severe asthma via suppression of oxidative stress. *Exp Mol Med* 48:236

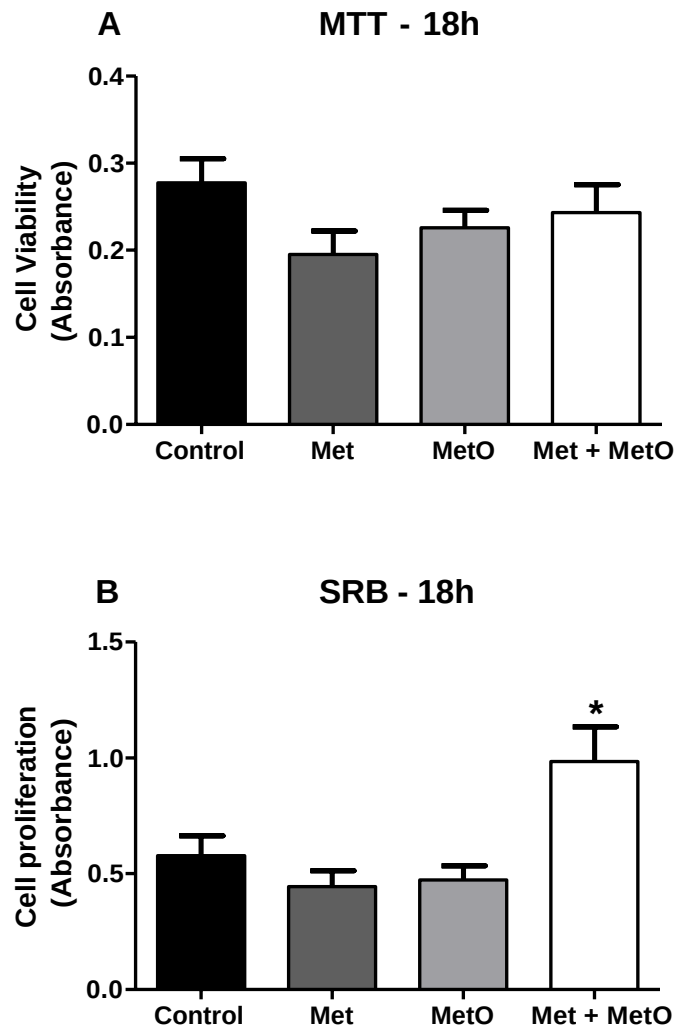


Figure 1. Effect of chronic exposure to methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO) on the viability and proliferation of peritoneal macrophages. Cell cultures were collected and analyzed after 18 hours of incubation. **(A)** The macrophage cell viability as determined by MTT assay. **(B)** The proliferation of peritoneal macrophages as evaluated by SRB assay. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n= 4 to 6 per group). (*) denotes $P<0.05$ as compared to the control group (One-way ANOVA followed by Tukey test).

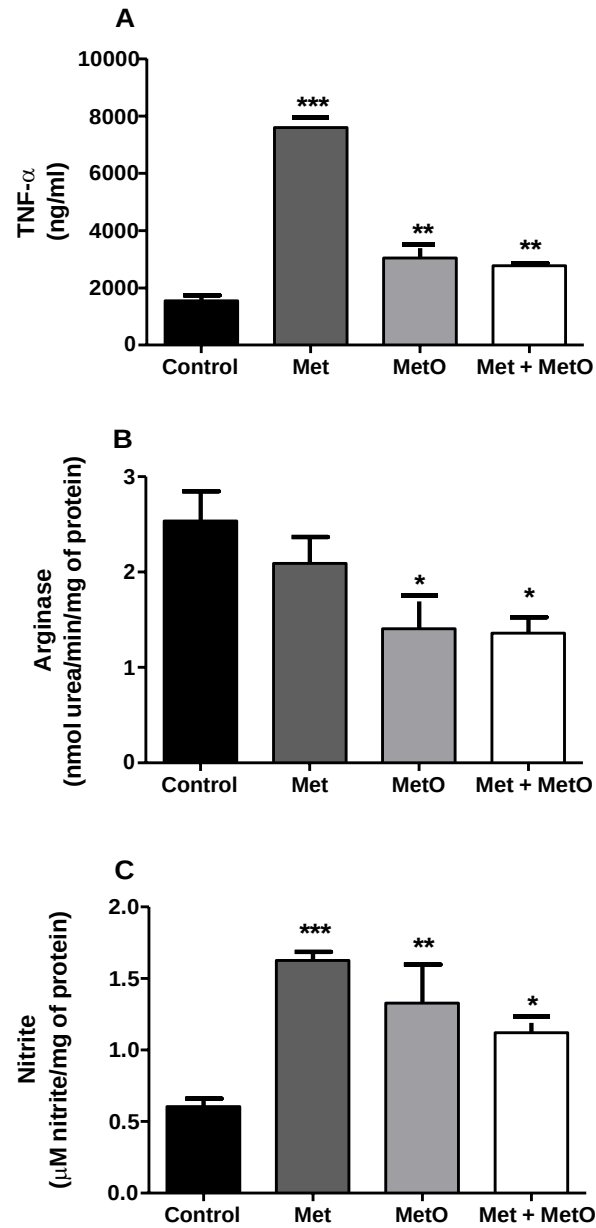


Figure 2. Characterization of macrophages phenotype post chronic treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). Macrophages were cultured to evaluate polarization using *ex vivo* analyses. **(A)** TNF- α levels, **(B)** arginase activity were determined and **(C)** nitrite levels. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n = 4 to 5 per group). (*) Denotes $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared to the control group (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

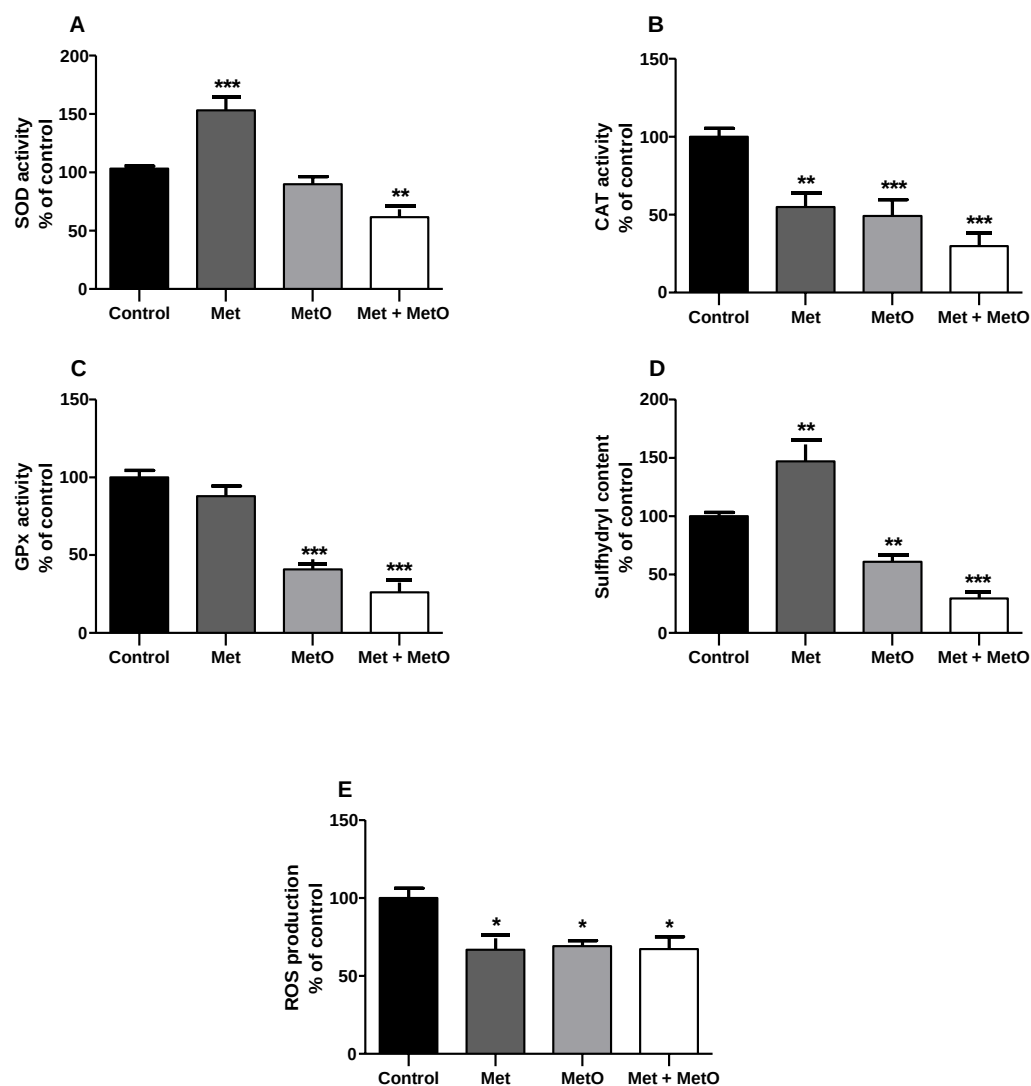


Figure 3. Oxidative stress parameters in macrophages post chronic treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). **(A)** Superoxide dismutase (SOD), **(B)** Catalase (CAT), **(C)** Glutathione peroxidase (GPx) activities, **(D)** Total sulfhydryl content (SH) and **(E)** ROS production. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n = 4 to 8 per group). (*) Denotes $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared to the control group (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

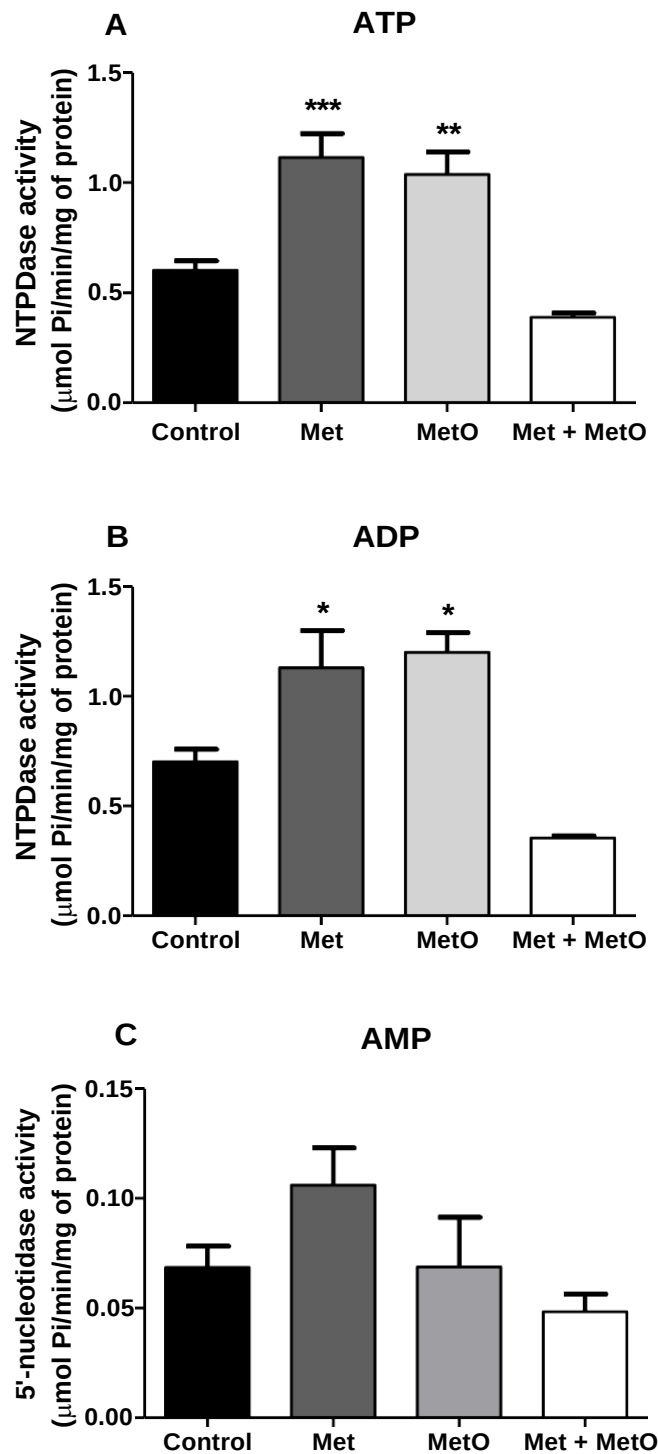


Figure 4. Ectonucleotidase activities in macrophages post chronic treatment with methionine (Met) and/or methionine sulfoxide (MetO). **(A)** ATP; **(B)** ADP and **(C)** AMP hydrolysis were evaluated. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n = 4 to 6 per group). (*) Denotes $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared to the control group (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Table 1. Amino acids plasma levels following methionine (1.2 g/kg) and/or methionine sulfoxide (0.3 g/kg) administration. The blood was collected 1 h after subcutaneous injection.

Groups	Plasma Methionine ($\mu\text{mol/L}$)	Plasma Homocysteine ($\mu\text{mol/L}$)
Control	35.5 ± 3.36	n.d.
Met	1889 ± 75.28	53.67 ± 2.05
MetO	106.6 ± 0.80	n.d.
Met + MetO	1615 ± 53.03	44.00 ± 4.74

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n=4). Met: methionine. MetO: methionine sulfoxide.

5 Conclusões

Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que a administração crônica de Met e/ou MetO induziu o fenótipo de ativação M1 nos macrófagos, o que foi verificado pelo aumento nos níveis de nitritos, aumento na liberação de TNF- α e diminuição da arginase, sendo esta polarização M1/clássica indutora da resposta pró-inflamatória.

Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo, pode-se observar que a exposição crônica à Met e/ou MetO promoveu alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, e redução dos níveis de ERO.

Sobre os parâmetros avaliados do sistema purinérgico, foi possível verificar que a administração de Met e/ou MetO aumentou a atividade das enzimas NTDases (ATPásica e ADPásica) nos macrófagos de camundongos jovens.

Em conjunto, esses achados podem auxiliar no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da hipermetioninemia, e futuramente podem contribuir para com descobertas de terapias mais específicas voltadas a melhor qualidade de vida dos pacientes acometidos por essa patologia.

Referências

ABBAS, Abul. K.; Lichtman, Andrew. H.; Pillai, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2008. 564 p.

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.

ANDREAZZA, A. C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B. N.; BOND, D. J.; KAPCZINSKI, F.; YOUNG, L. T.; YATHAM, L. N. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 111, n. 2-3, p. 135-144, 2008.

ANTONIOLI, L.; CSÓKA, B.; FORNAI, M.; COLUCCI, R.; KÓKAI E.; BLANDIZZI, C.; HASKÓ, G. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon?. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1051-1068, 2014.

BALESTIERI, Filomena Maria Perrella. **Imunologia**. Manole, 2005. 840pg.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; de PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010.

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

BEATTY, P. W.; REED, D. J. Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 204, n. 1, p. 80-87, 1980.

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

BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A. C.; DEAN, O. M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YUCEL, M.; GAMA, C. S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHÃES, P. V.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; MALHI, G. S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 804-817, 2011.

BJURSELL, M. K.; BLOM, H. J.; CAYUELA, J. A.; ENGVALL, M. L.; LESKO, N.; BALASUBRAMANIAM, S.; BRANDBERG, G.; HALLDIN, M.; FALKENBERG, M.; JAKOBS, C.; SMITH, D.; STRUYS, E.; DOBELN, U. V.; 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. **Neurochemistry**, v. 26, n. 8-9, p. 959-969, 2001.

BONAN, C. D.; SCHETINGER, M. R. C.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F. Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and pathological conditions. **Drug Development Research**, v. 52, p. 57-65, 2001.

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

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

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.

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

COUCE, M. L.; BÓVEDA, M. D.; CASTINEIRAS, D. E.; CORRALES, F. J.; MORA, M. I.; FRAGA, J. M.; MUDD, S. H. Hypermethioninemia due to methionine adenosyltransferase I/III (MAT I/III) deficiency: Diagnosis in an expanded neonatal screening programme. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 31, n. 2, p. 233-239, 2008.

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

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

DHERAI, A. J. Inborn errors of metabolism and their status in India. **Clinics in laboratory medicine**, v. 32, n. 2, 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.; FALZONI, S.; SANZ, J. M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, R. 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**, v. 191, n. 1, p. 117-123, 2015.

DOS SANTOS, L. M.; DA SILVA, T. M.; AZAMBUJA, J. H.; RAMOS, P. T.; OLIVEIRA, P. S.; DA SILVEIRA, E. F.; PEDRA, N. S.; GALDINO, K.; COUTO, C. A. T.; SOARES, M. S. P.; TAVARES, R. G.; SPANEVELLO, R. M.; STEFANELLO, F. M.; BRAGANHOL, E. Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 424, n. 1-2, p. 69-78, 2017.

DUFFIELD, J.; FORBES, S. J.; CONSTANDINO, C. M.; CLAY, S.; PARTOLINA, M.; VUTHOOTI, S.; WU, S.; LANG, R.; IREDALE, J. P. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 1, p. 56-65, 2005.

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

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

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

EL REFAEY, M.; WATKINS, C. P.; KENNEDY, E. J.; CHANG, A.; ZHONG, Q.; DING, K. H.; SHI, X. M.; XU, J.; BOLLAG, W. B.; HILL, W. D.; JOHNSON, M.; HUNTER, M.; HAMRICK, M. W.; ISALES, C. M. Oxidation of the aromatic amino acids tryptophan and tyrosine disrupts their anabolic effects on bone marrow mesenchymal stem cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 410, p. 87-96, 2015.

ELSSNER, A.; DUNCAN, M.; GAVRILIN, M.; WEWERS, M. D. A Novel P2X (7) receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1beta processing and release. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4987-4994, 2004.

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

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

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

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. S. Evidence that hyperprolinemia alters glutamatergic homeostasis in rat brain: neuroprotector effect of guanosine. **Neurochemical Research**, v 37, p.205-13, 2012.

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

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

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

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

FINKELSTEIN, J. D. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Copyright© 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, 2000. p. 219-226.

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

IGNARRO, L. J.; **Rev. Farm. Bioquim.** Univ. S. Paulo 1998, 34 (C04), 3.

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

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

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

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

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.; 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.

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

LI, Z. H.; WANG, L. L.; LIU, H.; MUYAYALO, K. P.; HUANG, X. B.; MOR, G.; AH, L. Galectin-9 alleviates LPS-induced preeclampsia-like impairment in rats via switching decidual macrophage polarization to M2 subtype. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 3142, 2018.

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

LOWE, F. Biomarkers of oxidative stress. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, ed. I. Laher, Springer, Berlin, Heidelberg, 1st edn, 2014, vol. 2, ch. 3, pp. 65-87, 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 USA**, v. 98, n. 10, p. 5560-5565, 2001.

LUNKES, G. I. L.; LUNKES, D. S.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M.; MORSCH, A. L. B.; MIRON, V. R.; SCHETINGER, M. R. C. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 65, n. 1, p. 1-6, 2004.

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-VIEIRA, R. Lithium, Stress, and Resilience in Bipolar Disorder: Deciphering this key homeostatic synaptic plasticity regulator. **Journal of Affective Disorders**, 2017.

MACHADO-VIEIRA, R.; ANDREAZZA, A. C.; VIALE, C. I.; ZANATTO, V.; CERESER, V. JR.; DA SILVA, V. R.; KAPCZINSKI, F.; PORTELA, L. V.; SOUZA, D. O.; SALVADOR, M.; GENTIL, V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. **Neuroscience Letters**, v. 421, n. 1, p. 33-36. 2007.

MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 33, n. 7, p. 1478-1483, 2013.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 1, p. 31, 2007.

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.

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.

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.

MOSHAROV, E.; CRANFORD, M. R.; BANERJEE, R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. **Biochemistry**, v. 39, n. 42, p. 13005-13011, 2000.

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

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. Activation of methionine for transmethylation V. The mechanism of action of the methionine-activating enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 4, p. PC1372-PC1375, 1962.

MUDD, S. H.; JENDEN, D. J.; CAPDEVILA, A.; ROCH, M.; LEVY, H. L.; WAGNER, C. Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. **Metabolism**, v. 49, n. 12, p. 1542-1547, 2000.

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

NASHABAT, M.; AL-KHENAIZAN, S.; ALFADHEL, M. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: beyond the central nervous system manifestations. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 14, p. 225, 2018.

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.

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

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

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

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

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.

SALIM, T.; SERSHEN, C. L.; MAY, E. E. Investigating the role of TNF- α and IFN- γ activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0153289, 2016.

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.

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

SCHWEINBERGER, B. M.; RODRIGUES, A. F.; TURCATEL, E.; PIEROZAN, P.; PETTENUZZO, L. F.; GRINGS, M.; SCAINI, G.; PARISI, M. M.; LEIPNITZ, G.; STRECK, E. L.; BARBÉ-TUANA, F. M.; WYSE, A. T. S. Maternal hypermethioninemia affects neurons number, neurotrophins levels, energy metabolism, and Na⁺, K⁺-ATPase Expression/Content in Brain of Rat Offspring. **Molecular neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 980-988, 2018.

SCHWEINBERGER, B. M.; SCHWIEDER, L.; SCHERER, E.; SITTA, A.; VARGAS, C. R.; WYSE, A. T. S. Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain Na⁺, K⁺-ATPase/Mg 2⁺-ATPase activity and oxidative status of the offspring. **Metabolic brain disease**, v. 29, n. 1, p. 153-160, 2014.

SCHWEINBERGER, B. M.; TURCATEL, E.; RODRIGUES, A. F.; WYSE, A. T. S. Gestational hypermethioninaemia alters oxidative/nitrative status in skeletal muscle and biomarkers of muscular injury and inflammation in serum of rat offspring. **International journal of experimental pathology**, v. 96, n. 5, p. 277-284, 2015.

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

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 19, n. 1, p. 217-246, 1999.

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.

SOARES, M. S. P.; MATTOS, B. S.; ÁVILA, A. A.; SPOHR, L.; PEDRA, N. S.; TEIXEIRA, F. C.; BONA, N. P.; OLIVEIRA, P. S.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, R. M. High levels of methionine and methionine sulfoxide: Impact on adenine nucleotide hydrolysis and redox status in platelets and serum of young rats. **Journal of cellular biochemistry**, 2019.

SOARES, M. S. P.; OLIVEIRA, P. S.; DEBOM, G. N.; MATTOS, B. S.; POLACHINI, C. R.; BALDISARELLI, J.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; TAVARES, R. G.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, R. M. Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. **Amino acids**, v. 49, n. 1, p. 129-138, 2017b.

SOARES, M. S. P.; VIAU, C. M.; SAFFI, J.; COSTA, M. Z.; DA SILVA, T. M.; OLIVEIRA, P. S.; AZAMBUJA, J. H.; BARSCHAK, A. G.; BRAGANHOL, E.; WYSE, A. T. S.; SPANEVELLO R. M.; STEFANELLO, F. M. Acute administration of methionine and/or methionine sulfoxide impairs redox status and induces apoptosis in rat cerebral cortex. **Metabolic brain disease**, v. 32, n. 5, p. 1693-1703, 2017a.

SOARES, M. S. P.; COSTA, M. Z.; DA SILVA, T. M.; GAZAL, M.; DO COUTO, C. A. T.; DEBOM, G. N.; RODRIGUES, R.; AZAMBUJA, J. H.; CASALI, E. A.; MORITZ, C. E. J.; DUARTE, M. F.; BRAGANHOL, E.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, R. Methionine and/or Methionine Sulfoxide Alter Ectoenzymes Activities in Lymphocytes and Inflammatory Parameters in Serum from Young Rats: Acute and Chronic Effects. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 76, n. 1-2, p. 243-253, 2018.

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

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

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

STEFANELLO, F. M.; FERREIRA, A. G. K.; PEREIRA, T. C. B.; DA CUNHA, M. J.; BONAN, C. D.; BOGO, M. R.; WYSE, A. T. S. Acute and chronic hypermethioninemia alter Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 4, p. 483-488, 2011.

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

STEFANELLO, F. M.; MATTÉ, C.; PEDERZOLLI, C. D.; KOLLING, J.; MESCKA, C. P.; LAMERS, M. L.; ASSIS, A. M.; PERRY, M. L.; SANTOS, M. F.; DUTRA-FILHO, C. S.; WYSE, A. T. S. Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. **Biochimie**, v. 91, n. 8, p. 961-968, 2009.

STEFANELLO, F. M.; MATTÉ, C.; SCHERER, E. B.; WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. S. Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. **Journal of neuroscience methods**, v. 160, n. 1, p. 1-4, 2007c.

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

STOVER, P. J.; DURGA, J.; FIELD, M. S. Folate nutrition and blood-brain barrier dysfunction. **Current opinion in biotechnology**, v. 44, p. 146-152, 2017.

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.

SUAREZ, O. L.; PICO, M. L. C.; MUÑOZURI, A. P.; RAMOS, D. E. C.; LORENZO, J. R. F. Hipermethioninemia en el recién nacido pretérmino. Estudio de los factores predisponentes. In: **Anales de Pediatría**. Elsevier Doyma, 2010. p. 179-184.

TER-MINASSIAN, A. Cerebral metabolism, brain injury. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, v. 7, p. 714-721, 2006.

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

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

VALLEY, C. C., CEMBRAN, A., PERLMUTTER, J. D., LEWIS, A. K., LABELLO, N. P., GAO, J., & SACHS, J. N. The methionine-aromatic motif plays a unique role in stabilizing protein structure. **Journal of Biological Chemistry**, 287(42), 34979-34991. 2012

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: development and tissue specialization. **Annual review of immunology**, v. 33, p. 643-675, 2015.

VASSORT, G. Adenosine 5-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 767-806, 2001.

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

VERKHRATSKY, A.; KRISHTAL, O. A.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors on neuroglia. **Molecular Neurobiology**, v. 39, p. 190-208, 2009.

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

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 γ -lyase, an animal model of cystathioninuria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 1716-1726, 2012.

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

ZANIN, R. F.; BERGAMIN, L. S.; BRAGANHOL, E.; SEVIGNY, J.; 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.; 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.

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.

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, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

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

Anexos

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



Pelotas, 16 de agosto de 2017

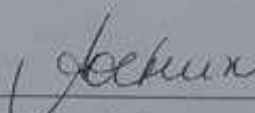
Certificado

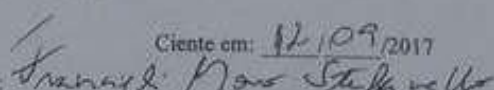
Certificamos que a solicitação de adendo proposta intitulada "**Avaliação do efeito da metionina e/ou metionina sulfoxido sobre marcadores de inflamação e fenótipo de macrófagos de camundongos**" registrada com o nº 23110.009221/2013-24, sob a responsabilidade de **Elizandra Braganhol e Francieli Stefanello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/07/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Prorrogado até 12 de janeiro de 2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i>
Nº de animais	Acréscimo de 110
Idade	10-15 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

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

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 9221-2013**).


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:  Ciente em: 12/09/2017