

EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO NA ATIVIDADE DA ENZIMA ADENOSINA DEAMINASE EM LINFÓCITOS DE RATOS

MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES¹; GABRIELA NOGUEIRA DEBOM²;
JÉSSICA PUREZA², FELIPE GIOVANINI GONÇALVES², FRANCIELI
STEFANELLO²; ROSELIA SPANEVELLO³

¹ Universidade Federal de Pelotas- mayara_sandrielly@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas- gabidebom@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas- rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Elevados níveis de metionina e de seus metabólitos podem ocorrer em várias anormalidades genéticas. A hipermetioninemia é uma patologia caracterizada pelo aumento nos níveis de metionina que pode ser resultante de uma metabolização inadequada desse aminoácido devido à deficiência genética da enzima metionina adenosiltransferase (MUDD, 2011). Dados da literatura têm demonstrado que pacientes hipermetioninêmicos apresentam vários danos hepáticos e cerebrais como, déficit cognitivo, edema e dismielinização cerebral, cuja fisiopatologia ainda não está completamente esclarecida (MUDD, 2011).

É bem estabelecido que a adenosina é uma molécula importante para o funcionamento de vários tecidos. Além de suas propriedades neuroprotetoras e antiagregantes a adenosina possui potentes atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras por inibir a proliferação de células T através da ativação de receptores A_{2A} e a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, essa molécula pode regular a função dos linfócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos modulando também a produção de citocinas (KHODADADI et al., 2011). A adenosina deaminase (ADA) é a enzima responsável pela desaminação da adenosina à inosina, sendo então a principal reguladora da concentração extracelular desse nucleosídeo. A atividade dessa enzima tem sido investigada em várias situações patológicas sugerindo que essa enzima pode ser um importante marcador associado à inflamação e disfunções imunológicas (GINÉS et al., 2002; KHODADADI et al., 2011; MARTINEZ-NAVIO et al., 2011).

Neste contexto, tendo em vista que muitos mecanismos envolvendo a fisiopatologia da hipermetioninemia ainda são pouco compreendidos, e considerando a importância da ADA nos processos inflamatórios, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da Metionina (Met), Metionina Sulfóxido (MetO) e associação da Met + MetO (MIX) na atividade da ADA de linfócitos de ratos com o intuito de elucidar mecanismos inflamatórios envolvidos na hipermetioninemia.

2. METODOLOGIA

2.1 Análise *in vitro* da Met e/ou MetO na atividade da ADA

Foram utilizados 10 ratos machos Wistar (30 dias) provenientes do Biotério da UFPel. Os animais foram submetidos à eutanásia e o sangue foi coletado com anticoagulante EDTA. Os linfócitos foram separados usando um gradiente de densidade (Ficoll) segundo o método de BOYUM (1968) e a atividade da ADA em linfócitos foi determinada pelo método colorimétrico de dosagem da amônia liberada pela ação da enzima segundo o método de GIUSTI & GALANTI (1984). Met e MetO foram dissolvidas em água destilada e adicionadas diretamente no ensaio enzimático em concentrações variando de 20 a 2000 μM para Met, 5 a 500 μM para MetO. Além disso, a associação de Met e Met-O também foi avaliada (MIX= Met 1000 μM + MetO 500 μM).

2.2 Análise *in vivo* da Met e/ou MetO na atividade da ADA

Neste experimento foram utilizados 40 ratos machos Wistar (30 dias) os quais foram divididos em quatro grupos ($n=10$): I (controle), II (Met 0,4 g/Kg), III (MetO 0,1 g/Kg), IV (Met 0,4 g/Kg + MetO 0,1 g/Kg). Os ratos dos grupos II, III e IV receberam uma injeção subcutânea de Met e/ou MetO, enquanto que o grupo I recebeu o volume equivalente de solução salina. Cinco animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia uma hora após a injeção, enquanto que os outros cinco animais foram submetidos à eutanásia após três horas de tratamento. O sangue foi coletado com EDTA e os linfócitos separados. Nessas células a atividade da ADA foi determinada conforme método descrito acima e expressa em U/L. Neste trabalho todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 3527).

2.3 Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$. Todos os dados foram expressos com média \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados *in vitro* demonstraram que a Met nas concentrações de 1000 e 2000 μM causou uma inibição 23% e 43%, respectivamente, na atividade da ADA de linfócitos quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). A MetO causou uma inibição na atividade da enzima de 28% somente na maior concentração testada (500 μM) ($P < 0,05$). A associação *in vitro* de Met + MetO (MIX) teve um resultado similar, onde foi observado uma inibição de 42% na atividade da ADA de linfócitos de ratos quando comparados com os dados do grupo controle ($P < 0,05$).

Em relação aos resultados *in vivo* não foram observadas alterações na atividade da ADA de linfócitos após uma hora da administração de Met e/ou MetO (Figura 1). Entretanto, após três horas somente a MetO causou um aumento

significativo na atividade desta enzima quando comparado aos demais grupos avaliados ($P < 0.05$) (Figura 2).

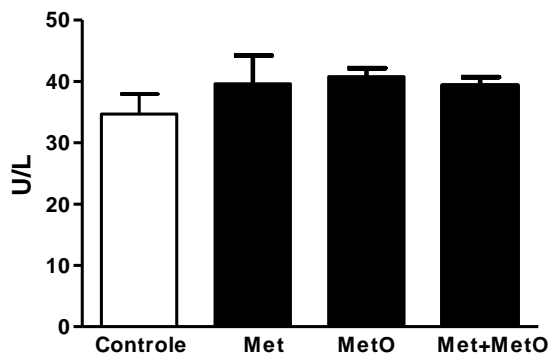


Figura 1: Atividade da enzima ADA em linfócitos de ratos após uma hora da administração de metionina e/ou metionina sulfóxido.

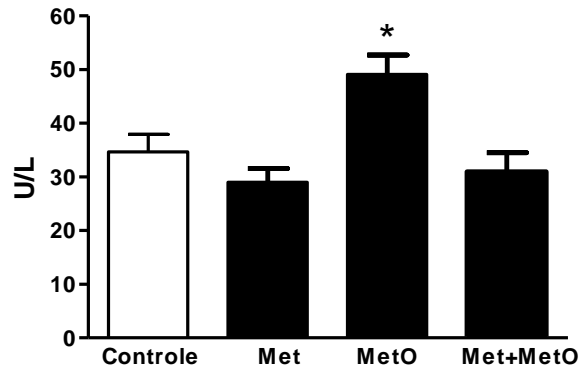


Figura 2: Atividade da enzima ADA em linfócitos de ratos após três horas da administração de metionina e/ou metionina sulfóxido. *Diferente dos outros grupos ($P < 0,05$)

Nos resultados *in vitro* ocorreram alterações nas maiores concentrações testadas de Met e MetO. É importante destacar que essas concentrações são semelhantes às encontradas em pacientes hipermetioninêmicos. Os resultados obtidos *in vivo* foram diferentes dos resultados obtidos *in vitro* o que pode ser justificado pela absorção e metabolismo da Met e MetO no organismo. É importante ressaltar que *in vivo* a MetO, um metabólito da metionina, altera a atividade da ADA em linfócitos de ratos. Um aumento na ADA pode levar a uma diminuição nos níveis de adenosina, uma molécula com ações anti-inflamatórias (MARTÍNEZ-NAVIO et al., 2011)

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado que Met e MetO podem alterar a atividade da ADA em linfócitos de ratos. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesta alteração enzimática e sua contribuição para o desenvolvimento de processos inflamatórios em pacientes hipermetioninêmicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation** v.97, n.1. p. 77-89, 1968.

GINÉS, S.; MARIÑO, M.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; MARIMOTO, C.; CALLEBAUTS, C.; HOVANESSIANS, A.; CASADÓ, V.; LLUIS, C.; FRANCO R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. **Biochemical Journal**, London v. 361, n. 2, p. 203-209, 2002.

GIUSTI, G. and B. GALANTI,. Colorimetric method. In: Methods of Enzymatic Analysis. **Bergmeyer H.U.**, ed. Weinheim Verlag Chemie, p.315–323, 1984.

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

MARTINEZ-NAVIO, J.M.; CASANOVA, V.; PACHECO, R.; MACABUHAV, I.N.; CLIMENT, N.; GARCIA, F.; GATELL, J.M.; MALLOL, J.; GALLART, T.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4⁺ T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n.1, p. 127-136, 2011.

MUDD, S.H. Hypermethioninemias of Genetic and Non-Genetic Origin: A Review. **American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)**. v.157, n.1, p.3–32, 2011