

TRATAMENTO COM METIONINA E METIONINA SULFÓXIDO POLARIZA OS MACRÓFAGOS PARA FENÓTIPO PRÓ-INFLAMATÓRIO/M1

LIEN M. DOS SANTOS¹; TATIANE M. DA SILVA²; JULIANA H. AZAMBUJA²;
PRISCILA T. RAMOS², FRANCIELI M. STEFANELLO², ELIZANDRA
BRAGANHOL³

¹*Centro de Ciências Químicas, Farmacêutica e de Alimentos - CCQFA - UFPEL –
lienmapelli@yahoo.com.br*

²*Centro de Ciências Químicas, Farmacêutica e de Alimentos - CCQFA - UFPEL*

³*Centro de Ciências Químicas, Farmacêutica e de Alimentos - CCQFA - UFPEL –
elizbraganhol@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são alterações genéticas que se manifestam pela síntese anômala de uma proteína, geralmente uma enzima, por uma diminuição ou mesmo ausência de sua síntese (BICKEL, 1987). Essas alterações resultam em deficiência na atividade da enzima envolvida, ocasionando bloqueio das rotas metabólicas, podendo ocorrer tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais, ambos com doenças subsequentes. Dentre os EIM, os mais freqüentes são os de aminoácidos, sendo um exemplo o EIM da metionina em que se observa a deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Na deficiência da MAT, a concentração plasmática de metionina pode atingir até 2.500 µmol/L, sendo que os valores normais estão em torno de 30 µmol/L. Elevadas concentrações de metabólitos, como a metionina sulfóxido, o metanotiol e o sulfeto de hidrogênio também podem ser observadas no plasma e na urina dos pacientes afetados por essa doença (MUDD et al., 2001). Conseqüentemente, pacientes hipermetioninêmicos apresentam manifestações clínicas, como déficit cognitivo, edema e desmielinização cerebral, assim como alterações hepáticas e inflamatórias, cuja fisiopatologia não está completamente estabelecida (FERNÁNDEZ-IRIGOYEN et al., 2010). Macrófagos são elementos chave do processo inflamatório e, dependendo do microambiente em que se encontram podem exibir um fenótipo pró-inflamatório (clássico/M1), o qual é caracterizado por um aumento da atividade da iNOS, produção de radicais livres e citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatório (alternativo/M2), caracterizado pelo aumento da atividade da arginase e de citocinas angiogênicas que estarão relacionadas com a reconstituição tecidual (GORDON e MARTINEZ, 2010). O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do tratamento com metionina (Met), Metionina-sulfóxido (Met-O) e da combinação dos dois metabólitos (Met + MetO) sobre o fenótipo dos macrófagos em cultura.

2. METODOLOGIA

Isolamento de macrófagos peritoneais: Macrófagos residentes peritoniais foram extraídos de camundongos swiss (8 semanas). Para a extração dos macrófagos foi feita uma injeção de 5 mL de RPMI gelado na cavidade peritoneal

e em seguida, o abdômen foi gentilmente massageado (30 s) e as células aspiradas. As células foram semeadas em placas de 48 poços em meio de cultivo RPMI/10% SFB. Após 30 minutos de adesão em incubadora a 37°C em atmosfera umidificada com 5% CO₂, os macrófagos foram tratados com Met (1 mM), MetO (0,5 mM) ou Mix (Met 1 mM + MetO 0,5 mM). Macrófagos tratados com LPS (10 ng/mL) ou IL-4 (10 ng/mL) foram considerados controles positivos para ativação de macrófagos M1 e M2, respectivamente. Após 24 h de tratamento, o fenótipo dos macrófagos foi determinado.

Análise do fenótipo de ativação dos macrófagos: As culturas de macrófagos de camundongos tiveram seu fenótipo avaliado por meio da análise da atividade da iNOS e da arginase, as quais indicam a ativação macrofágica pró-inflamatória/M1 ou anti-inflamatória/M2, respectivamente.

Análise estatística: Os resultados obtidos neste estudo foram analisados por ANOVA seguida por post-hoc de Tukey. Os dados foram considerados significativamente diferentes do controle para um $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de analisar o fenótipo dos macrófagos frente à exposição aos metabólitos acumulados em pacientes portadores de hipermetioninemia, foram utilizadas culturas de macrófagos peritoneais de camundongo. Tais culturas representam uma ferramenta interessante para a análise do efeito de moléculas in vitro, uma vez que o comportamento dos macrófagos de camundongos é semelhante em alguns aspectos a resposta apresentada em humanos. Imediatamente após a adesão dos macrófagos, os mesmos foram expostos a LPS, IL-4, Met, MetO e Mix conforme descrito nos materiais e métodos. Conforme previsto, o tratamento com LPS e com IL-4 induziu um aumento da atividade da iNOS e da arginase, respectivamente, quando comparado ao controle, indicando que os macrófagos estavam responsivos a estímulos e apresentaram ativação do tipo M1 induzida por LPS e M2 induzida por IL-4. Além disso, o tratamento com Met, MetO e o Mix foi eficiente em aumentar a atividade da iNOS em 3 vezes quando comparado ao controle. Por outro lado, a atividade da arginase não foi alterada frente aos tratamentos. Esses dados indicam que a Met, MetO e o Mix induzem uma polarização dos macrófagos do tipo M1/pró-inflamatório.

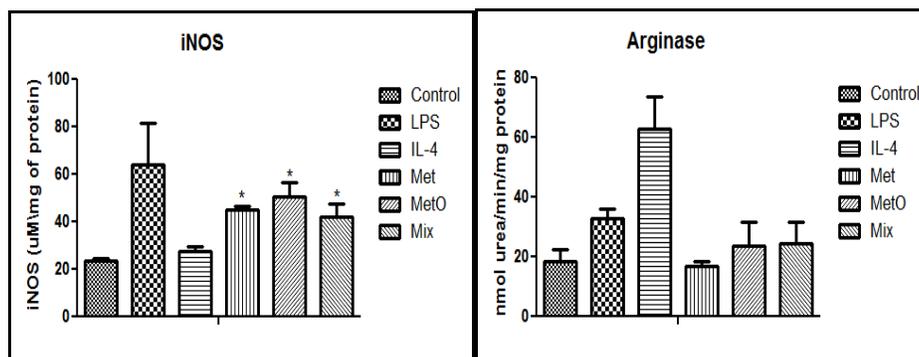


Figura 1. Análise da atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da arginase em macrófagos tratados com LPS, IL-4, metionina (Met), Metionina

sulfóxido (MetO) ou Mix (Met+MetO) por 24 h. Dados representam média \pm DP de quatro experimentos independentes. *Diferença significativa com relação ao controle para um $P \leq 0,05$. Dados analisados por ANOVA seguido de Tukey.

4. CONCLUSÕES

Os dados indicam que a Met, MetO e o Mix induzem a polarização dos macrófagos para um fenótipo M1/pró-inflamatório, o qual está relacionado com injúria tecidual, sendo um componente de processos neurodegenerativos. Assim, a indução de um processo inflamatório com a participação dos macrófagos pode estar envolvida na fisiopatologia da hipermetioninemia, constituindo um alvo terapêutico interessante para contornar o dano tecidual e neurológico observado nos pacientes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. **Enzyme**, v. 38, n.1-4, p. 14-26. 1987.
- MUDD S.H.; CERONE R.; SCHIAFFINO M.C.; FANTASIA A.R.; MINNITI G.; CARUSO U.; LORINI R.; WATKINS D.; MATIASZUK N.; ROSENBLATT D.S.; SCHWAHN B.; ROZEN R.; LEGROS L.; KOTB M.; CAPDEVILA A.; LUKA Z.; FINKELSTEIN J.D.; TANGERMAN A.; STABLER S.P.; ALLEN R.H.; WAGNER C. Glycine N-methyltransferase deficiency: a novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. **J Inherit Metab Disease**, v. 24, n. 4, p. 448-464, 2001.
- FERNÁNDEZ-IRIGOYEN J.; SANTAMARÍA E.; CHIEN Y.H.; HWU W.L.; KORMAN S.H.; FAGHFOURY H.; SCHULZE A.; HOGANSON G.E.; STABLER S.P.; ALLEN R.H.; WAGNER C.; MUDD S.H.; CORRALES F.J. Enzymatic activity of methionine adenosyltransferase variants identified in patients with persistent hypermethioninemia. **Mol Genet Metabolism**, v. 101, n. 2-3, p. 172-177, 2010.
- GORDON S.; MARTINEZ F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 28, n. 32(5), p. 593-604, 2010.