

METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO ALTERAM A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM CULTIVO PRIMÁRIO DE ASTRÓCITOS

MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES¹; NATHALIA STARK PEDRA²;
NATÁLIA PONTES BONA³; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA⁴; FRANCIELI
MORO STEFANELLO⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas– mspereirasouares@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– nathaliastark@hotmail.com

³Universidade federal de Pelotas – natinhabona@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre- julianahazambuja@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas- fmstefanello@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas- rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Elevadas concentrações de metionina (Met) e de seus metabólitos como a metionina sulfóxido (MetO) podem ocorrer em virtude de problemas genéticos como na deficiência da enzima Metionina Adenosiltransferase, ou de condições não genéticas como prematuridade e baixo peso ao nascer (MUDD, 2011). Pacientes hipermetioninêmicos podem apresentar alterações neurológicas como déficit cognitivo, retardo no desenvolvimento psicomotor, dismorfismo facial, edema e desmielinização cerebral (SURTEES et al., 1991). Além disso, já tem sido demonstrado que Met e MetO são capazes de induzir dano oxidativo e morte celular em córtex cerebral de ratos jovens (SOARES et al., 2017).

Os astrócitos são células que possuem diversas funções cruciais no sistema nervoso central (SNC) tais como a sustentação e nutrição de neurônios, manutenção da homeostase cerebral, liberação de neurotransmissores, participação na barreira hematoencefálica e regulação de respostas imunes inatas e adaptativas (COLOMBO e FARINA, 2016). Dados da literatura tem demonstrado que os astrócitos expressam vários componentes colinérgicos, incluindo os receptores $\alpha 7$ nicotínicos e a enzima acetilcolinesterase (AChE). A AChE é responsável pela hidrólise da acetilcolina regulando assim a sinalização induzida por esse neurotransmissor (DREVER et al., 2011). Estudos prévios já demonstraram que níveis elevados de Met aumentam a atividade da AChE em cérebro de ratos jovens (STEFANELLO et al., 2007) demonstrando que este aminoácido interfere com a sinalização colinérgica.

Considerando que os mecanismos envolvidos nas disfunções neurológicas associadas a hipermetioninemia permanecem ainda pouco compreendidos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* da exposição a Met e/ou MetO na viabilidade e proliferação celular e na atividade da enzima AChE em cultura primária de astrócitos.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo primário de astrócitos

Foram utilizados ratos *Wistar* obtidos do Biotério Central da UFPel. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEa 6210-2017). Ratos *Wistar* com 1-2 dias foram utilizados para obtenção de astrócitos corticais os quais foram cultivados em placas de 96 (3×10^4 por poço) ou 6 (5×10^6 por poço) poços e mantidos com meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB)

(GOTTFRIED, 1999). As células foram mantidas em condições padrões (5% CO₂, 37°C e atmosfera umidificada) durante 15 dias, recebendo troca periódica de meio de cultivo até receberem os tratamentos.

2.2 Tratamento com metionina e metionina sulfóxido

Os astrócitos foram tratados com as concentrações de 1 e 2 mM de metionina e/ou 0,5 mM de metionina sulfóxido. As células foram expostas a essas concentrações por 24h, 48h e 72h. Após o tratamento, a viabilidade e proliferação celular foram analisadas e o lisado celular foi usado para determinar a atividade da AChE.

2.3 Teste de citotoxicidade e proliferação celular

A viabilidade celular foi determinada pelo teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) que se baseia no número de mitocôndrias ativas das células. O teste de proliferação celular foi realizado pelo teste de Sulforodamina B (SRB), que se baseia no princípio de que a SRB cora proteínas dentro das células. DMEM foi utilizado como controle.

2.4 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi avaliada em lisado celular pelo método colorimétrico de Ellman et al. (1961). A atividade da AChE foi expressa em $\mu\text{mol AcSch/h/mg}$ de proteína.

2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. 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 demonstram que Met, MetO ou a associação de ambas não alteram a viabilidade (Figura 1) e proliferação (Figura 2) dos astrócitos em nenhum dos tempos experimentais ($P > 0,05$).

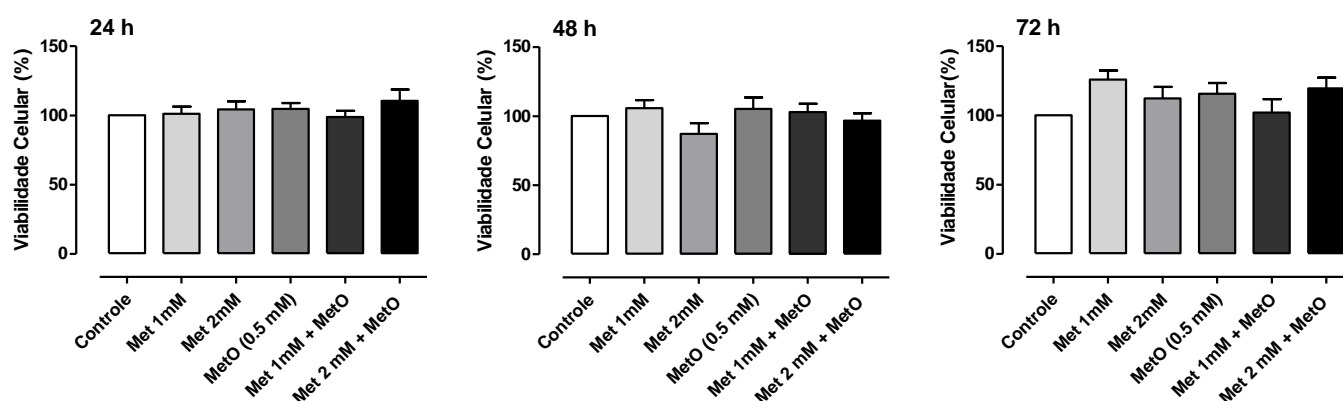


Figura 1 - Avaliação do efeito citotóxico de metionina (Met) e metionina sulfóxido (MetO) em cultura primária de astrócitos. As culturas foram tratadas nas concentrações de 1 e 2 mM de Met, 0,5 mM de MetO ou a associação de Met+MetO nas mesmas concentrações por 24 h, 48 h e 72h. Os dados estão expressos com percentagem comparado com o grupo controle

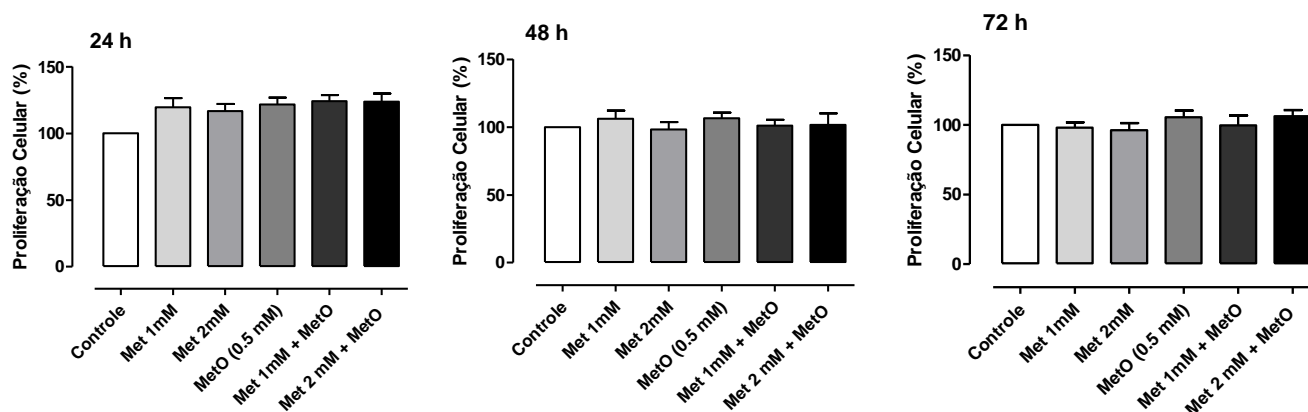


Figura 2 - Avaliação do efeito de metionina (Met) e metionina sulfóxido (MetO) sobre a proliferação celular em cultura primária de astrócitos. As culturas foram tratadas nas concentrações de 1 e 2 mM de Met, 0,5 mM de MetO ou a associação de Met+MetO nas mesmas concentrações por 24 h, 48 h e 72h. Os dados estão expressos com percentagem comparado com o grupo controle.

Em relação à atividade da AChE, nos grupos MetO (0,5 mM) ($P < 0.01$) e Met (1 e 2 mM) + MetO (0,5 mM) ($P < 0.05$) houve um aumento significativo na atividade da AChE em 24 e 48 h após a exposição dos astrócitos aos aminoácidos. Já após 72 h, somente no grupo MetO ocorreu um aumento na atividade da AChE em relação ao grupo controle (DMEM) ($P < 0.01$).

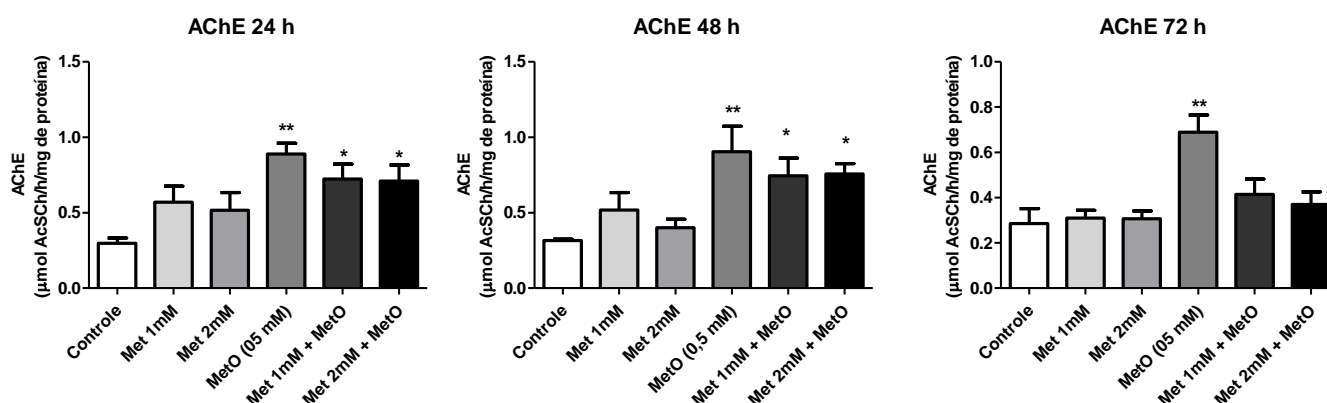


Figura 3 - Avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cultura primária de astrócitos expostas a metionina (Met) e/ou metionina sulfóxido (MetO). As culturas foram tratadas nas concentrações de 1 e 2 mM de Met, 0,5 mM de MetO ou a associação de Met+MetO nas mesmas concentrações por 24 h, 48 h e 72h. ** $P < 0,01$ e * $P < 0.05$ comparado com o grupo controle.

Os astrócitos estão envolvidos em uma variedade de cascatas de sinalização, além disso, desempenham um papel importante na resposta à injúria por mudanças na atividade metabólica, na defesa antioxidante e na secreção de fatores neurotróficos (VASILE et al., 2017). Entretanto, a contribuição dos astrócitos na fisiopatologia da hipermetioninemia ainda é pouco compreendida.

A acetilcolina além de atuar como um neurotransmissor crucial para os processos de aprendizado e memória, também possui um importante papel anti-inflamatório, uma vez que estudos já demonstraram que a exposição de astrócitos a acetilcolina atenua cascatas inflamatórias mediadas pelo TNF- α (DARREH-SHORI et al., 2013). Neste contexto, um aumento da atividade da AChE em astrócitos causado pela exposição a Met e ou Met/O sugere que estes aminoácidos podem levar a uma diminuição dos níveis de acetilcolina

contribuindo assim para processos de neuroinflamação e déficits cognitivos. Corroborando com esta hipótese SURTES et al. (1991) já demonstrou que pacientes com hipermetioninemia apresentam alterações relacionadas com memória e aprendizagem.

4. CONCLUSÕES

Níveis elevados de metionina, especialmente de seu metabólito MetO, aumentam a atividade da enzima AChE em astrócitos sugerindo que esses aminoácidos podem alterar a sinalização colinérgica em células gliais. Esta alteração pode estar associada com as disfunções neurológicas presentes a hipermetioninemia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLOMBO, E.; FARINA, C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. **Trends in Immunology**, v. 37, n.9, p.608-620, 2016
- DARREH-SHORI, T.; VIJAYARAGHAVAN, S.; AEINEHBAND, S.; PIEHL, F.; LINDBLOM, R.P.F.; NILSSON, B.; EKDAHL, K.N.; LÅNGSTRÖM, B.; ALMKVIST, O.; NORDBERG, A. Functional variability in butyrylcholinesterase activity regulates intrathecal cytokine and astroglial biomarker profiles in patients with Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 34, n.1, p. 2465-2481, 2013.
- DREVER, B. D.; RIEDEL, G.; PLATT, B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n.1, p.505–514, 2011.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7,n.1, p. 88-95, 1961.
- GOTTFRIED, C; Valentim, L.; Salbego, C.; Karl, J.; Wofchuk, S.T.; Rodnight, R. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Research**, v. 833, n.2, p 142-149, 1999
- SURTEES, R.; LEONARD, J.; AUSTIN, S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyltransfer pathway. **Lancet**, v. 338, n.1, p. 1550–1554, 1991.
- 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
- 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.; S WYSE, A.T.; 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, 2017.
- STEFANELLO, F.M.; MONTEIRO, S.C.; MATTÉ, C.; SCHERER, E.B.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T. Hypermethioninemia increases cerebral acetylcholinesterase activity and impairs memory in rats. **Neurochemical Research**, v.32, n.11, p.1868-1874, 2007.
- VASILE, F.; DOSSI, E.; ROUACH, N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. **Brain Structure and Function**, v. 222, n.1, p. 2017-2029, 2017.
- SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293-302, 2005.