

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E**  
**BIOPROSPECÇÃO MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO**



**Dissertação**

**Papel protetor do ácido tânico sobre alterações oxidativas observadas na  
hipermetioninemia aguda em ratos**

**Bernardo de Moraes Meine**

Pelotas, 2021

**Bernardo de Moraes Meine**

**Papel protetor do ácido tânico sobre alterações oxidativas observadas na hipermetioninemia aguda em ratos**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francieli Moro Stefanello

Co-orientadora: Dr<sup>ª</sup>. Mayara Sandrielly Pereira Soares

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M514p Meine, Bernardo de Moraes

Papel protetor do ácido tânico sobre alterações oxidativas observadas na hipermetioninemia aguda em ratos / Bernardo de Moraes Meine ; Francieli Moro Stefanello, orientadora ; Mayara Sandrielly Pereira Soares, coorientadora. — Pelotas, 2021.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Produtos naturais. 2. Hipermetioninemia aguda. 3. Prevenção. 4. Antioxidante. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Soares, Mayara Sandrielly Pereira, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

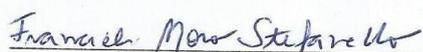
**Bernardo de Moraes Meine**

**Papel protetor do ácido tânico sobre alterações oxidativas observadas na hipermetioninemia aguda em ratos**

Dissertação apresentada, 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: 03 de março de 2021

Banca examinadora:



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Francieli Moro Stefanello (Orientadora) - Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roselia Maria Spanevello - Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



---

Dr<sup>a</sup> Fernanda Cardoso Teixeira - Doutora em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas.

**Dedico este trabalho aos meus pais Daniela e Ben-Hur, a minha irmã Paola e a minha namorada Fernanda.**

## Agradecimentos

Começo agradecendo à minha família mais próxima, que são meus pais Ben-Hur e Daniela e minha irmã Paola, pois sem eles ao meu lado, sempre me incentivando, apoiando, ensinando, as vezes criticando (com razão), enfim, me guiando, eu provavelmente não estaria aqui. Eles são a minha rocha e pessoas que eu sigo como exemplo, então essa conquista também é de vocês, e eu agradeço a Deus todos os dias pelo privilégio de viver minha vida com pessoas maravilhosas, muito obrigado por tudo família.

A minha namorada Fernanda, porque além de encher minha vida de amor e alegria, sempre me incentiva a ser melhor, e por puxar minha orelha quando a “preguiça” batia, mas acima de tudo, por sempre acreditar e confiar em mim, na minha capacidade, inteligência, e por sempre acreditar que eu podia mais do que eu mesmo acreditava, muito obrigado por tudo meu amor.

A minha família mais distante, que são meus dindos, tios, avós e primos, por serem exemplos para mim e me encher de orgulho e determinação de ser tão bom quanto, e por sempre me ajudarem quando foi preciso.

Aos meus amigos-irmãos, que sempre me acompanharam em toda a minha vida, desde o início do colégio até o término dessa dissertação, e que mesmo nessa pandemia se fizeram presentes na minha vida, me animando e me mostrando que no final do dia, o que importa é ter pessoas boas que a gente possa chamar de irmãos, muito obrigado por tudo gurizada.

Aos meus amigos do grupo Efésios IV e ao meu adulto Lúcio, a presença de vocês durante esses 2 anos de mestrado foi fundamental na minha vida, com todas as risadas, choros, confissões, mas acima de tudo muita fé em Deus e Jesus Cristo, que são a nossa base, e sem pessoas como vocês nessa caminhada eu teria facilmente me perdido, muito obrigado por tudo meus irmãos na fé.

As minhas colegas e colega (tu mesmo Fernandin) e professora Rose dos laboratórios Neurocan/Biomarcadores, pois com certeza sem vocês nada disso seria possível, por me ajudarem sempre que eu precisava ou não sabia o que fazer, por me ensinarem com toda a paciência do mundo, e por sempre me tratarem da melhor maneira possível, se todos tivessem a possibilidade de ter

pessoas tão boas como vocês na caminhada acadêmica tenho certeza que haveriam muito mais pessoas fazendo mestrado.

A minha orientadora Fran e minha co-orientadora May, eu não tenho palavras pra descrever toda a minha gratidão, por ter sido abençoado com duas pessoas excepcionais e exemplares na orientação da minha caminhada acadêmica, vocês são o maior exemplo de como professoras/orientadoras deveriam ser, e seu conseguir ser 30% das profissionais que vocês duas são, eu já vou ter conquistado meu objetivo, muito obrigado por tudo que vocês fizeram e fazem por mim.

Agradecer a UFPel pela formação acadêmica.

Agradecer a CAPES pela bolsa concedida.

E por fim, mas de maneira nenhuma menos importante, agradecer a Deus por todas as graças concedidas durante esse tempo, por ter colocado cada uma dessas pessoas incríveis na minha vida e tantas outras bênçãos que eu simplesmente não consigo colocar em palavras, muito obrigado por tudo isso.

*“ 1 O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja,  
não se vangloria, não se orgulha*

*5 Não maltrata, não procura seus interesses, não se irrita  
facilmente, não guarda rancor.*

*6 O amor não se alegra com a injustiça, mas se alegra  
com a verdade.*

*7 Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. ”*

*1 Coríntios 13, 4-7*

## Resumo

MEINE, Bernardo de Moraes. **Papel protetor do ácido tânico sobre alterações oxidativas observadas na hipermetioninemia aguda em ratos.** 2021. 65f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A hipermetioninemia é caracterizada por elevadas concentrações plasmáticas de metionina (Met) e de metabólitos como a metionina sulfóxido (MetO). Pacientes hipermetioninêmicos podem apresentar sintomas neurológicos e hepáticos, cujo tratamento é baseado em uma dieta isenta de Met e suplementação de S-adenosilmetionina. Nesse contexto, compostos naturais podem ser alvos promissores no manejo clínico e prevenção das alterações encontradas nessa patologia, dentre esses destaca-se o ácido tânico (AT), conhecido por possuir ação antioxidante e neuroprotetora. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade do AT em prevenir danos oxidativos e nitrosativos no cérebro, fígado, rim e soro de ratos jovens submetidos ao modelo de hipermetioninemia aguda. Ratos *Wistar* machos de 23 dias foram divididos em quatro grupos: I – controle, II – AT (30 mg/kg), III – Met (0,4 g/kg) + MetO (0,1 g/kg) e IV – AT + Met + MetO. Os animais dos grupos II e IV receberam AT pela via intragástrica durante sete dias, e os ratos dos grupos I e III receberam igual volume de água. Após o pré-tratamento com AT, os ratos dos grupos II e IV receberam uma única injeção subcutânea de Met + MetO e foram eutanasiados 3 horas depois. Nas estruturas cerebrais (córtex cerebral, hipocampo e estriado) e nos rins, observou-se que a associação de Met + MetO aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), de nitrito e causou lipoperoxidação, seguida por uma redução no conteúdo total de tiois e na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa S-transferase (GST). Por outro lado, o pré-tratamento com AT preveniu os danos oxidativos e nitrosativos nas três estruturas cerebrais e nos rins. Em fígado houve uma redução nos níveis de EROS e um aumento no conteúdo tiólico total, que foi acompanhado por uma redução nas atividades da CAT e GPx no grupo Met + MetO, no entanto o pré-tratamento com AT foi capaz de prevenir a redução na atividade da CAT. No soro, Met + MetO aumentou os níveis de EROS e diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, porém o pré-tratamento com AT foi capaz de prevenir essa redução. Nossos resultados demonstraram que a administração de Met + MetO provocou danos oxidativos e nitrosativos no modelo de hipermetioninemia aguda, no entanto, o AT foi capaz de prevenir a maior parte dessas alterações, o que o torna uma possível alternativa terapêutica adjuvante no tratamento da hipermetioninemia.

**Palavras-chave:** produtos naturais, hipermetioninemia aguda, prevenção, antioxidante.

## Abstract

MEINE, Bernardo de Moraes. **Protective role of tannic acid on oxidative changes observed in rats acute hypermethioninemia.** 2021. 65f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Hypermethioninemia is characterized by high plasma concentrations of methionine (Met) and its metabolites such as methionine sulfoxide (MetO). Hypermethioninemic patients may present neurological and hepatic symptoms, which the treatment is based on a Met-free diet and supplementation with S-adenosylmethionine. In this context, natural compounds can be promising targets in clinical management and prevention of changes found in this pathology, such as tannic acid (TA), known to have antioxidant and neuroprotective action. Thus, the aim of this work was to investigate the ability of TA to prevent oxidative and nitrosative damage in the brain, liver, kidney and serum from rats submitted to an acute hypermethioninemia model. Male Wistar rats (23 days old) were divided into four groups: I - control, II - TA (30 mg/kg), III - Met (0.4 g/kg) + MetO (0.1 g/kg) and IV - TA + Met + MetO. The rats of groups II and IV received TA orally for seven days, and the rats of groups I and III received an equal volume of water. After pretreatment with TA, rats of groups II and IV received a single subcutaneous injection of Met + MetO and were euthanized 3 hours later. In brain structures (cerebral cortex, hippocampus and striatum) and in kidney, Met + MetO increased the levels of reactive oxygen species (ROS), nitrite and induced lipid peroxidation, followed by a reduction in the thiol content and in the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST). On the other hand, pretreatment with TA prevented oxidative and nitrosative damage found in brain structures and kidney. In liver, there was a reduction in the levels of ROS and an increase in the total thiol content, which was accompanied by a reduction in the activities of CAT and GPx in the Met + MetO group, however pretreatment with TA was able to prevent the reduction in CAT activity. In serum, Met + MetO increased ROS levels and decreased the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT, but the pretreatment with TA was able to prevent this reduction. Our results demonstrated that the administration of Met + MetO caused oxidative and nitrosative damage in the acute hypermethioninemia model; however, TA was able to prevent most of these changes, which makes it a possible adjunctive therapeutic alternative in the treatment of hypermethioninemia.

**Keywords:** natural products, acute hypermethioninemia, prevention, antioxidant.

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Metabolismo da metionina.   | 18 |
| <b>Figura 2</b> Via de oxidação/redução da metionina.   | 19 |
| <b>Figura 3</b> Geração de espécies reativas de oxigênio/prevenção através da atividade catalítica de enzimas antioxidantes.      | 25 |
| <b>Figura 4</b> (Esquerda) Castalagina, um tipo de tanino hidrolisável (Direita) Prodelfinidina B9, um tipo de tanino condensado. | 27 |
| <b>Figura 5</b> Estrutura química do ácido tânico.  | 28 |
| <b>Figura 6</b> Biossíntese do ácido tânico.  | 29 |

### **Lista de abreviaturas e siglas**

- AT - Ácido tânico
- ATP - Adenosina trifosfato
- BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BHMT - Betaína homocisteína metiltransferase
- CAT - Catalase
- CBS - Cistationina  $\beta$ -sintase
- CGL - Cistationina  $\gamma$ -liase
- EIM - Erros inatos do metabolismo
- EROS - Espécies reativas de oxigênio
- GPx - Glutaciona peroxidase
- GST - Glutaciona S-transferase
- GNMT - Glicina-N-metiltransferase
- MAT - Metionina adenosiltransferase
- Met - Metionina
- MetO - Metionina sulfóxido
- MS - Metionina sintase
- 5-Me-THF - 5-metiltetrahidrofolato
- SAH - S-adenosil-homocisteína
- SAHH - S-adenosil-homocisteína hidrolase
- SAM - S-adenosilmetionina
- SH - Conteúdo tiólico total
- SOD - Superóxido dismutase
- TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1 Introdução.....                                     | 14 |
| 2 Objetivos.....                                      | 16 |
| 2.1 Objetivo geral.....                               | 16 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                        | 16 |
| 3 Revisão da literatura.....                          | 17 |
| 3.1 Erros inatos do metabolismo.....                  | 17 |
| 3.2 Metionina (Met) e Metionina sulfóxido (MetO)..... | 18 |
| 3.3 Hipermetioninemia.....                            | 21 |
| 3.4 Estresse oxidativo.....                           | 23 |
| 3.4.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS).....       | 23 |
| 3.4.2 Enzimas antioxidantes.....                      | 25 |
| 3.4.3 Dano oxidativo.....                             | 26 |
| 3.5 Taninos.....                                      | 27 |
| 3.6 Ácido tânico (AT).....                            | 29 |
| 3.6.1 Atividade antioxidante do AT.....               | 30 |
| 3.6.2 Atividade neuroprotetora do AT.....             | 31 |
| 4 Artigo.....   | 33 |
| 5 Discussão.....                                      | 46 |
| 6 Perspectivas.....                                   | 50 |
| 7 Conclusão.....                                      | 51 |
| 8 Referências.....                                    | 52 |
| 9 Anexos.....   | 62 |

## 1. Introdução

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios de natureza genética que geralmente se manifestam através de um defeito enzimático, o qual pode acarretar a interrupção de uma via metabólica (KOLODNY & CABLE, 1982; SCATURRO et al., 2013). Essa alteração gera consequências graves, havendo a possibilidade de levar tanto a falta de produtos metabólicos essenciais quanto a produção de metabólitos secundários tóxicos, ambos com doenças subsequentes (SCATURRO et al., 2013). Muitos EIM não apresentam um tratamento específico, assim como as alternativas terapêuticas geralmente visam minimizar os sintomas, não alcançando a cura. No entanto, sabe-se que a maioria dessas desordens pode se beneficiar de um tratamento específico, que será melhor quanto mais precoce for o diagnóstico (EL-HATTAB et al., 2015; SAUDUBRAY e GARCIA-CARZOLA, 2018)

Dentre os EIM mais frequentes na população estão as aminoacidopatias, como a hipermetioninemia, a qual é caracterizada por elevadas concentrações plasmáticas do aminoácido metionina (Met). Existem diversos estudos demonstrando que a Met e/ou seus metabólitos, como a metionina sulfóxido (MetO), podem ser extremamente tóxicos quando encontrados em altas concentrações nos tecidos (MUDD et al., 2000; GARLICK et al., 2006). A hipermetioninemia ocorre em várias desordens metabólicas, dentre elas, na deficiência da enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Nessa condição, a concentração plasmática de Met pode atingir até 2500  $\mu\text{mol/L}$ , sendo que os valores normais estão em torno de 30  $\mu\text{mol/L}$ . Elevadas concentrações de metabólitos, como a MetO, o metanotiol e o sulfeto de hidrogênio, também podem ser observadas no plasma e na urina dos pacientes afetados por essa doença (MUDD, 2011). Alguns dos sintomas encontrados em pacientes com hipermetioninemia estão relacionados principalmente com o sistema nervoso central, onde já foram relatadas formação de edema cerebral, disfunção neurológica e demência (MUDD, 2011).

Stefanello et al. (2005) demonstraram que a administração aguda e crônica de Met inibe a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e aumenta a peroxidação lipídica em hipocampo de ratos. Posteriormente, esses pesquisadores demonstraram que a hipermetioninemia crônica provoca déficit de memória em

ratos, aumenta a atividade da enzima acetilcolinesterase e reduz o conteúdo de lipídios de membrana em cérebro de ratos (STEFANELLO et al., 2007a, 2007b). Recentemente, foi demonstrado que a administração aguda e/ou crônica de Met e da MetO induziu estresse oxidativo em soro, plaquetas, fígado e rim de ratos jovens (SOARES et al., 2016, 2018). Ademais, em cérebro foi demonstrado que a Met e/ou MetO causa estresse nitrosativo e oxidativo, inibe a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, aumenta a atividade da acetilcolinesterase, reduz os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro, reduz o número de neurônios, induz morte celular por apoptose, além de causar déficit de memória em ratos jovens (SOARES et al., 2017, 2020).

Apesar de já serem observadas algumas alterações cerebrais e metabólicas em pacientes com hipermetioninemia, a abordagem terapêutica para essa patologia ainda é extremamente limitada, restringindo-se a dieta isenta de Met e suplementação de S-adenosilmetionina (COUCE et al., 2013). Sendo assim, é de extrema importância a busca por novas terapias para a hipermetioninemia com o intuito de minimizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos seus portadores. Nesse contexto, o ácido tânico (AT), um composto fenólico de origem vegetal pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis (CHUNG et al., 1998), se torna um promissor alvo de estudos, devido às diversas propriedades biológicas já relatadas na literatura.

O AT pode ser encontrado em diversos alimentos, como uva, banana e lentilha, e em diversas bebidas como chá preto, chá verde, cerveja e vinho tinto (KING et al., 1999). Esse tanino possui características que fazem dele um composto com um grande potencial terapêutico, como: atividade antioxidante (GÜLÇİN et al., 2010; MUCCILLI et al., 2017; BASU et al., 2018), antimicrobiana (DONG et al., 2018; HANCOCK et al., 2010), anti-inflamatória (SONG et al., 2018; WU et al., 2019), antitumoral (NAUS et al., 2007; DARVIN et al., 2017; BONA et al., 2019) e neuroprotetora (LU e HOLMGREN, 2006; GERZSON et al., 2019, 2020; LUDUVICO et al., 2020). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade protetora do AT frente a parâmetros de estresse oxidativo em ratos jovens submetidos ao protocolo experimental de hipermetioninemia aguda.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar o efeito antioxidante do pré-tratamento com AT em ratos *Wistar* jovens submetidos ao protocolo experimental de hipermetioninemia aguda.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do pré-tratamento com AT sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e sobre os níveis de nitritos em fígado, rim, soro e cérebro de ratos jovens submetidos ao modelo experimental de hipermetioninemia aguda;
- Verificar o efeito do pré-tratamento com AT sobre o conteúdo tiólico total (SH) e os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado, rim, soro e cérebro de ratos jovens submetidos ao modelo experimental de hipermetioninemia aguda;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com AT sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona S-transferase (GST) em fígado, rim, soro e cérebro de ratos jovens submetidos ao modelo experimental de hipermetioninemia aguda.

### 3. Revisão da literatura

#### 3.1 Erros inatos do metabolismo (EIM)

Os EIM são distúrbios de natureza genética que geralmente desencadeiam um defeito enzimático capaz de acarretar na interrupção de uma via metabólica (KOLODNY e CABLE, 1982; SCATURRO et al., 2013). Como os EIM são compostos por uma variedade de doenças, esses são agrupados com base em sua patologia subjacente, localização do defeito celular ou no tipo de moléculas biológicas envolvidas. Os EIM são associados a complicações multisistêmicas, podendo causar morte prematura, desordens neurológicas severas, retardo mental e baixa qualidade de vida (BÉRRIO et al., 2013). No entanto, os tratamentos disponíveis para os EIM são muito escassos, e normalmente se baseiam em um controle dietético e manejo dos sintomas (FERREIRA et al., 2019).

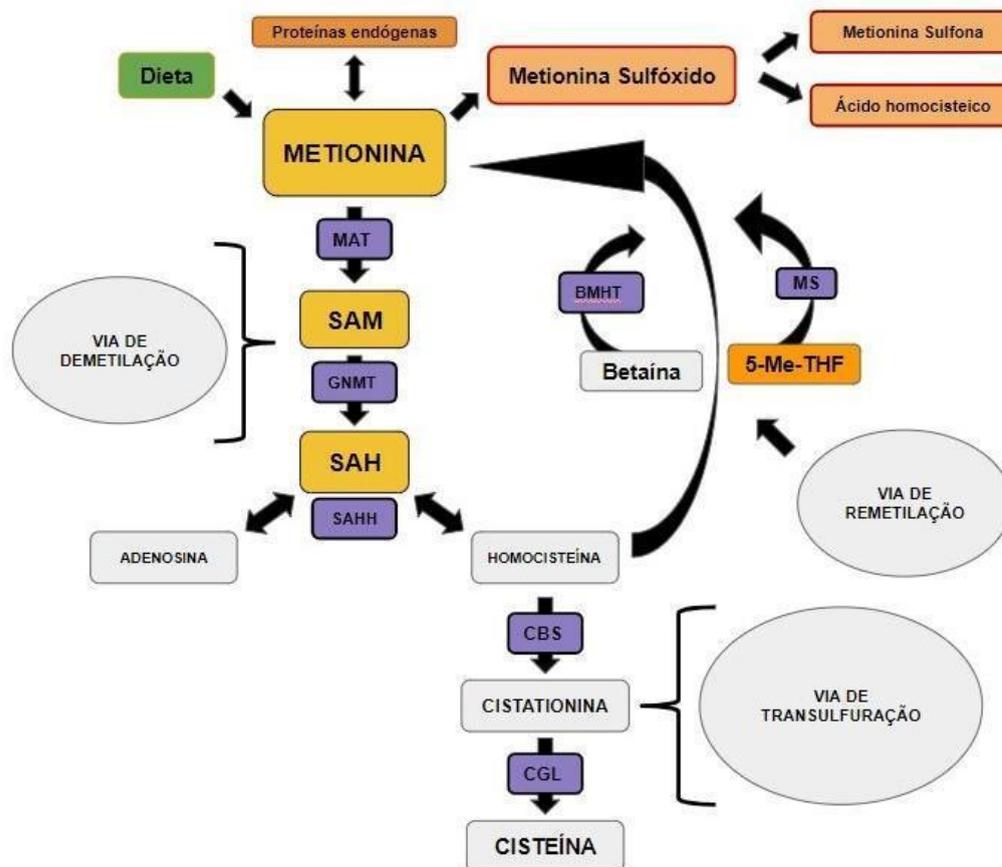
O termo “erro inato do metabolismo” foi introduzido em 1908 pelo médico britânico Sir Archibald Garrod, que postulou que distúrbios hereditários, como alcaptonúria e albinismo, resultam da redução da atividade ou da ausência completa de enzimas envolvidas em certas vias bioquímicas (SCRIVER et al., 2001). Os EIM são doenças raras quando analisadas individualmente, mas coletivamente são bastante frequentes em diferentes populações, com uma prevalência global média de 1 a cada 2.000 nascidos vivos, onde cerca de 25% desses distúrbios se desenvolvem ainda no período neonatal (WATER et al., 2018).

Até o momento quinhentos EIM são conhecidos, e dentre os mais incidentes estão as desordens envolvendo o metabolismo de aminoácidos. No Brasil, cerca de 16% dos EIM são aminoacidopatias e os sinais e sintomas dessas desordens iniciam ainda no período neonatal, após a exposição a alimentação com proteínas formadas por determinados aminoácidos (EL-HATTAB et al., 2015; GIUGLIANI et al., 2016). Algumas das aminoacidopatias conhecidas incluem a fenilcetonúria, doença da urina do xarope de bordo, homocistinúria e hipermetioninemia (WASIM et al., 2018).

### 3.2 Metionina (Met) e Metionina sulfóxido (MetO)

A Met é um aminoácido essencial sulfurado, obtido através da dieta ou da degradação de proteínas endógenas, sendo necessário para o crescimento saudável normal (CHIANG et al., 1996). A metabolização da Met (via da demetilação) ocorre principalmente no fígado, onde a enzima metionina adenosiltransferase (MAT) catalisa a primeira reação, formando S-adenosilmetionina (SAM) a partir de Met e uma molécula de adenosina trifosfato (ATP). Após isso, a SAM é convertida em S-adenosil-homocisteína (SAH) em reação catalisada pela glicina-N-metiltransferase (GNMT). Depois de formada, a SAH é hidrolisada em adenosina e homocisteína, pela enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase (SAHH) (MUDD et al., 2000; MARKHAM et al., 2009; MATO et al., 2013) (Figura 1).

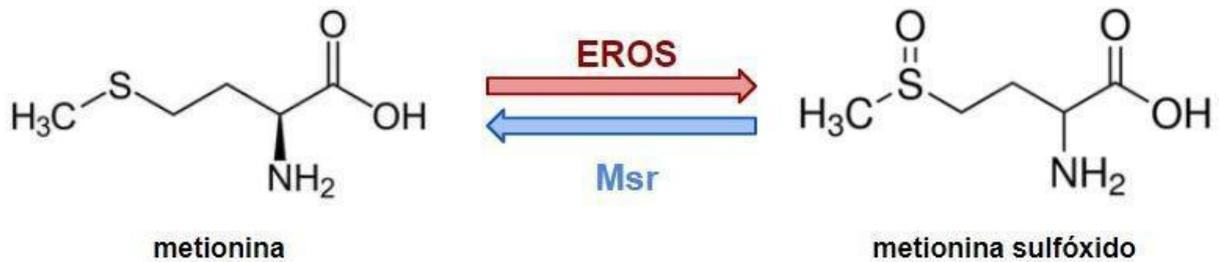
A metabolização da homocisteína pode ocorrer pela via de remetilação, na qual a homocisteína receberá um grupamento metila da betaína ou do 5-metiltetrahydrofolato (5-Me-THF) e assim formará novamente a Met, ou pela via de transulfuração, em que a enzima cistationina  $\beta$ -sintase (CBS) converterá a homocisteína em cistationina, a qual será subsequentemente hidrolisada pela cistationina  $\gamma$ -liase (CGL) formando cisteína. É importante ressaltar que a transulfuração é basicamente a única via de catabolismo da Met (SELHUB et al., 1999; MUDD et al., 2000; KUMAR et al., 2017) (Figura 1).



**Figura 1:** Metabolismo da Met. MAT - metionina adenosiltransferase; SAM S-adenosilmetionina; GNMT glicina N-metiltransferase; SAH - S adenosil-homocisteína; SAHH - S adenosil-homocisteína hidrolase - CBS - cistationina  $\beta$ -sintase; CGL - cistationina  $\gamma$ -liase; BHMT – betaína homocisteína metiltransferase; MS - metionina sintase; 5-Me-THF - 5-metil tetrahydrofolato; (Adaptado de MUDD et al., 2011).

A Met participa da metilação de outras biomoléculas, como o DNA e algumas proteínas, além de estar relacionada à formação de moléculas antioxidantes como a glutatona (CAMPBELL et al., 2013). Vale ressaltar que uma das mais importantes funções da Met é a proteção da célula dos ataques de espécies reativas, visto que está posicionada de maneira estratégica na membrana celular (STADTMAN, 2004). Quando isso ocorre, a Met pode ser oxidada, ocorrendo a formação de MetO, a qual pode ser novamente convertida a Met através da atividade da metionina sulfóxido redutase, reduzindo a MetO e permitindo que a Met possa exercer seu papel antioxidante (Figura 2) (LIM et al., 2018). No entanto, a metionina sulfóxido redutase não é muito expressa em

recém-nascidos, o que contribui para uma maior concentração de MetO em neonatos (STADTMAN, 2004).



**Figura 2:** Via de oxidação/redução da metionina. EROS - espécies reativas de oxigênio; Msr - metionina sulfóxido redutase (Adaptado de MARTINEZ et al., 2017).

Dados da literatura vêm demonstrando o envolvimento da Met em algumas doenças. Na diabetes, por exemplo, a restrição de Met levou a uma maior sensibilidade à insulina e uma melhor homeostase glicídica (YIN et al., 2018). Em trabalhos relacionados ao câncer, modelos animais que tiveram uma restrição de Met na dieta obtiveram uma melhora quanto à progressão dos tumores, pois muitas células tumorais dependem da Met para o seu metabolismo (CHATURVEDI et al., 2018). A Met também está associada ao envelhecimento. Nesse sentido, estudos com moscas-da-fruta e camundongos demonstraram que a restrição de Met na dieta resulta em aumento na expectativa de vida (GRANDISON et al., 2009; LEE et al., 2016).

Ainda, alguns estudos relacionam a Met e seu metabólito MetO à indução do estresse oxidativo em diferentes tecidos. Inicialmente, Stefanello et al. (2005) demonstraram que a administração aguda e crônica de Met inibe a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e aumenta a peroxidação lipídica no hipocampo de ratos. A seguir, esses pesquisadores relataram que a hipermetioninemia crônica provoca déficit de memória em ratos, aumenta a atividade da enzima acetilcolinesterase e reduz o conteúdo de lipídios de membrana em cérebro de ratos (STEFANELLO et al., 2007a, 2007b). Recentemente, observou-se que a administração aguda e/ou crônica de Met e MetO foi responsável por induzir estresse oxidativo em soro, plaquetas, fígado e rim de ratos jovens (SOARES et al., 2016, 2018). Ademais, em cérebro foi evidenciado que a Met e/ou MetO causa

estresse nitrosativo e oxidativo, inibe a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, aumenta a atividade da acetilcolinesterase, reduz os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro, reduz o número de neurônios, induz morte celular por apoptose, além de causar déficit de memória em ratos jovens (SOARES et al., 2017, 2020). Dessa forma, é possível observar que a presença de elevadas concentrações de Met e MetO pode estar relacionada a diversas alterações, principalmente em se tratando de aumento de marcadores de estresse oxidativo e disfunções neurológicas.

### 3.3 Hipermetioninemia

A hipermetioninemia é caracterizada pelo acúmulo tecidual e plasmático de Met e seus metabólitos, como MetO, além de deficiência de SAM. Essa doença pode ter origem genética como na deficiência da enzima MAT, indispensável no metabolismo da Met, e não genética, relacionada ao baixo peso ao nascer, distúrbios hepáticos, prematuridade e alimentação rica em Met (MUDD et al., 2000; 2011)

Atualmente, seis doenças genéticas que ocasionam elevações anormais nos níveis de Met são conhecidas sendo elas: a deficiência da enzima MAT I/III; Homocistinúria devido à deficiência de CBS; deficiência da glicina N-metiltransferase (GNMT); deficiência de S-adenosil-homocisteína hidrolase (AHCY); deficiência de citrina e deficiência de fumarilacetoacetato hidrolase (FAH) - Tirosinemia tipo I (MUDD, 2011). Dentre as alterações genéticas descritas acima, a mais comum é a deficiência de MAT, doença autossômica recessiva, ocasionada principalmente por um defeito no gene MATA1 (que codifica a MAT) que pode levar a diminuição ou até mesmo ausência da atividade dessa enzima, gerando acúmulo de Met e deficiência na produção de SAM (MUDD, 2011). Nessa doença, os níveis de Met podem chegar a 2500  $\mu\text{mol/L}$ , sendo que os valores normais estão em torno de 30  $\mu\text{mol/L}$  (MUDD, 2011).

Embora o diagnóstico da hipermetioninemia seja difícil e extremamente inespecífico, alguns sinais como níveis de Met superiores a 48  $\mu\text{mol/L}$  podem servir como alerta para a presença de deficiência de MAT. Além disso, outros fatores como diminuição nos níveis de homocisteína e tirosina, no caso de

deficiência de MAT, podem servir como indicativo para hipermetioninemia (SCHWEINBERGER et al., 2016)

A hipermetioninemia é uma doença subdiagnosticada mundialmente, tornando muito difícil o cálculo de sua prevalência mundial. No entanto, algumas cidades que possuem programas de triagem neonatal bem desenvolvidos foram capazes de estimar dados de prevalência. Em Taiwan por exemplo, a prevalência média de deficiência de MAT foi de aproximadamente 1 a cada 100.000 nascidos vivos (CHIEN et al., 2005). Em Portugal, na região de Douro (pertencente à península ibérica), a prevalência foi estimada em 1 a cada 26.000 nascidos vivos (MARTINS et al., 2012). Em Sucheu, na China, o programa de triagem neonatal local estimou uma prevalência média de 1 a cada 30.000 nascidos vivos (WANG et al., 2019).

Muitos pacientes hipermetioninêmicos são assintomáticos, no entanto, na presença de sintomas, esses podem apresentar-se como problemas neurológicos, deficiência no desenvolvimento psicomotor e inteligência, tremor, dor de cabeça, nistagmo (movimento involuntário dos olhos), disdiadococinesia (dificuldade em realizar movimentos rápidos em sequência), desmielinização cerebral, dificuldades de fala e atrasos de aprendizagem (SURTEES et al., 1991; MUDD et al., 1995; BANNICK et al., 2020). Sintomas que vão além do sistema nervoso central podem incluir hepatomegalia, deficiência de zinco e ferro, além de odores anormais no corpo e na respiração, que se assemelham ao odor de couve cozida, devido a presença de dimetilsulfitos (GAHL et al., 1987; NASHABAT et al., 2018).

O tratamento conhecido para hipermetioninemia consiste basicamente em uma restrição alimentar de Met. No entanto, a baixa ingestão de proteínas está associada a falhas no desenvolvimento, além de diminuir ainda mais os níveis de SAM do indivíduo (COUCE et al., 2013). Outro tratamento utilizado se baseia na suplementação de SAM, nas doses de 400 a 800 mg duas vezes ao dia. Essa alternativa terapêutica promove melhora de alguns sintomas, como redução do déficit cognitivo, porém formulações de SAM possuem um custo considerável, além de existir a necessidade de se manter o controle dietético (FURUJO et al., 2012; BANNICK et al., 2020).

Ainda que a fisiopatologia exata da hipermetioninemia não seja completamente elucidada, alguns estudos vêm sendo realizados com o objetivo

de melhor compreender a origem das modificações que ocorrem em alguns órgãos e células de pacientes acometidos por essa doença. Nesse sentido, modelos experimentais de hipermetioninemia aguda e crônica encontraram diversas alterações relacionadas ao cérebro, como na atividade das enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e acetilcolinesterase, redução do nível de lipídios, aumento do estresse oxidativo e indução de déficit de memória (STEFANELLO et al., 2005, 2007a, 2007b, 2011; SOARES et al., 2017b, 2020). Em fígado e rim foi possível observar alterações na morfologia de células hepáticas, peroxidação lipídica e diminuição de defesas antioxidantes, bem como diminuição na atividade da enzima ácido delta-aminolevulínico desidratase em fígado (STEFANELLO et al., 2009; COSTA et al., 2013; SOARES et al., 2016).

Ademais, alterações em soro, plaquetas e linfócitos foram observadas tanto no modelo agudo quanto no crônico de hipermetioninemia. Nesse sentido, elevadas concentrações de Met e/ou MetO foram capazes de aumentar o nível de interleucinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a IL-6, além de reduzir citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, aumentar os níveis de proteína C-reativa, alterar componentes do sistema purinérgico e colinérgico, induzir estresse oxidativo e disfunção plaquetária (SOARES et al., 2017a, 2018).

Em macrófagos, o tratamento *in vitro* com Met e/ou MetO induziu fenótipo de ativação clássica M1/pró-inflamatório, mudanças em marcadores purinérgicos e na homeostase redox. Nos astrócitos houve uma hipertrofia e também indução de estresse oxidativo (DOS SANTOS et al., 2016; SOARES et al., 2019; FRANCESCHI et al., 2020).

Dessa forma, considerando que o estresse oxidativo é uma das principais manifestações de hipermetioninemia em modelos experimentais (STEFANELLO et al., 2011; SOARES et al., 2017a, 2018), é importante investigar agentes com potencial antioxidante, uma vez que abordagens terapêuticas alternativas para o tratamento da hipermetioninemia são amplamente ausentes ou estão restritas a uma dieta livre de Met e suplementação de SAM (FURUJO et al., 2012).

### **3.4 Estresse oxidativo**

#### **3.4.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS)**

O oxigênio é um dos elementos químicos mais abundantes na terra, ficando atrás apenas do hélio e do hidrogênio (SOSA TORRES et al., 2015). O oxigênio está presente na fórmula química de diferentes compostos, nos tecidos orgânicos, e na forma gasosa ( $O_2$ ) é um dos gases mais abundantes na atmosfera (SOSA TORRES et al., 2015). Além disso, todos os seres vivos aeróbios utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons na fosforilação oxidativa, permitindo que ocorra a geração de energia e também mantendo o metabolismo e a homeostase adequados (SOSA TORRES et al., 2015).

A principal via de metabolismo do oxigênio no organismo envolve a sua completa redução em água, incorporando quatro elétrons ao final da cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria, permitindo a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa. No entanto, uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido na mitocôndria, originando uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, que por possuírem um elétron desemparelhado na sua camada de valência, são denominadas EROS (FERREIRA et al., 1997; BARBOSA et al., 2010).

É importante ressaltar que uma pequena concentração de EROS pode ser benéfica, participando da diferenciação celular, apoptose, fagocitose, além de modular a resposta inflamatória (HALLIWELL, 2006). No entanto, essas espécies podem provocar injúria tecidual e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (DA SILVA e CALDERON, 2010).

Alguns exemplos de EROS são o ânion superóxido, espécie pouco reativa, porém capaz de gerar outras EROS mais reativas e danosas e de reagir com metais de transição como o ferro iônico, ocasionando então efeitos deletérios em outras estruturas (HALLIWELL, 2007). O peróxido de hidrogênio, que também é pouco reativo, possui uma meia vida mais longa e consegue atravessar membranas celulares com maior facilidade. A geração de peróxido de hidrogênio em si não é considerada perigosa, mas ele é capaz de participar da reação de Fenton e Haber-Weiss, formando o radical hidroxila. Esse radical é o mais reativo dentre as EROS, possuindo uma meia-vida curta e podendo reagir com diversas moléculas, como proteínas (alterando sua estrutura), lipídios (danificando membranas celulares) e até mesmo ácidos nucleicos (causando mutações). O fato de não existir um sistema antioxidante capaz de lidar diretamente com o radical hidroxila, o torna ainda mais danoso, havendo assim a necessidade de prevenir a formação desse composto (HALLIWELL, 2007).

### 3.4.2 Enzimas antioxidantes

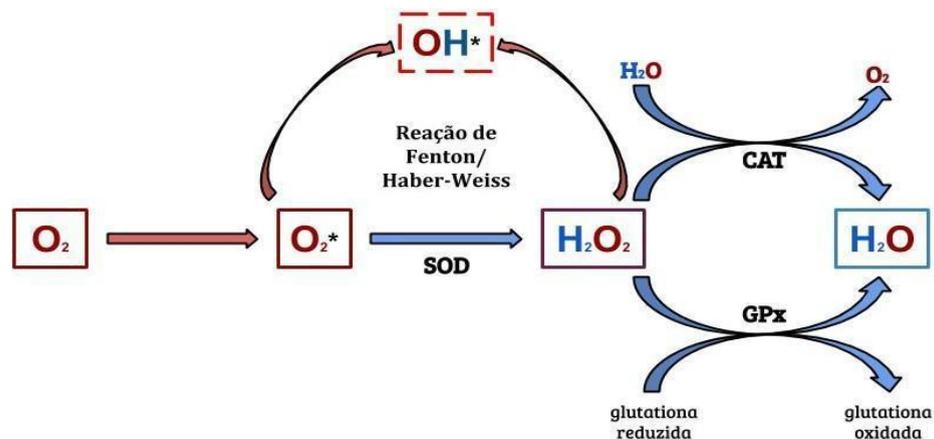
O organismo estaria em grande risco devido a geração de espécies reativas de maneira constante na respiração celular, porém existe um sistema de defesa antioxidante que controla os níveis dessas espécies. A definição de antioxidante pode ser explicada por Halliwell e Gutteridge (2007) como “qualquer substância que retarde, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula alvo”. Nesse sistema fazem parte enzimas e outros compostos antioxidantes, que têm a capacidade de prevenir a formação de espécies reativas, convertendo os radicais formados em moléculas menos reativas e menos prejudiciais. Como parte do sistema antioxidante enzimático tem-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (MATÉS et al., 1999; HALLIWELL et al., 2007; LEI et al., 2016).

A SOD é a enzima antioxidante responsável por catalisar a reação que converte o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Figura 3). Existem três tipos diferentes de SOD: Cu-Zn-SOD, que utiliza cobre e zinco como cofatores na reação de dismutação; Mn-SOD, onde o magnésio é o cofator presente na reação de dismutação; e SOD extracelular, que utiliza cobre e zinco como cofatores, mas atua no espaço extracelular (MATÉS et al., 1999; VEAL et al., 2018).

A CAT é uma enzima tetramérica que apresenta quatro subunidades tetraédricas idênticas de 60 kDa, contendo um único grupo ferriprotoporfirina por subunidade (MATÉS et al., 1999). É uma das enzimas que reage com o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em oxigênio e água (Figura 3). Embora a CAT não seja essencial para alguns tipos de células em condições normais, ela desempenha um papel importante na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo na resposta adaptativa das células (CHAE et al., 1999; DAI et al., 2009; VEAL et al., 2018).

A GPx é uma peroxidase que contém um único resíduo de selenocisteína em cada uma das quatro subunidades idênticas, sendo esse um composto indispensável para o funcionamento da enzima (MATÉS et al., 1999). A GPx também é responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio, porém utiliza a glutathione reduzida na reação, convertendo peróxido de hidrogênio em água e glutathione reduzida em glutathione oxidada (Figura 3). Essa enzima é essencial na proteção de lipídeos contra ataques oxidativos (LU HOLMGREN 2014; LOWE, 2014).

Além das enzimas antioxidantes mencionadas acima, existem também outras enzimas que auxiliam no manejo do estresse oxidativo e remoção de elementos tóxicos e xenobióticos, que é o caso da glutathiona S-transferase (GST) (ATKINSON e BABBIT, 2009). A GST compreende uma família de isoenzimas presentes em eucariotos e procariotos que catalisam a reação de conjugação da forma reduzida da glutathiona a substratos xenobióticos, toxinas e lipídeos peroxidados com o objetivo de neutralizá-los. Ao conjugar a glutathiona reduzida a centros eletrofílicos desses substratos ela os torna mais solúveis em água, assim facilitando sua remoção do corpo (MUKANGANYAMA et al., 2011).



**Figura 3:** Geração de espécies reativas de oxigênio/prevenção através da atividade catalítica de enzimas antioxidantes.  $\text{O}_2$  - oxigênio;  $\text{O}_2^*$  - ânion superóxido;  $\text{OH}^*$  - radical hidroxila;  $\text{H}_2\text{O}_2$  - peróxido de hidrogênio;  $\text{H}_2\text{O}$  - água; CAT - catalase; GPx - glutathiona peroxidase (Adaptado de MATÉS et al., 1999).

### 3.4.3 Dano oxidativo

Mesmo que exista um sistema de defesa eficaz na retirada de espécies reativas que são constantemente formadas no organismo, existem situações onde há um desequilíbrio na geração de compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da produção excessiva de espécies reativas e/ou no detrimento da velocidade de remoção dessas, o que caracteriza um quadro de estresse oxidativo (SIES, 1985).

O dano oxidativo pode ocorrer diretamente através da formação de radicais hidroxila, as quais podem ocasionar a peroxidação de lipídeos de membrana, levando a perda da seletividade na troca iônica e à liberação do conteúdo de organelas (enzimas lisossômicas), além da formação de produtos

citotóxicos, resultando em morte celular. De forma indireta, o radical hidroxila pode danificar enzimas importantes no metabolismo energético, como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (DAMASCENO et al., 2002; LIU et al., 2012).

O estresse oxidativo está associado a um número considerável de doenças, tais como: câncer, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, aterosclerose, diabetes e depressão (HALLIWELL, 2007; HWANG, 2013; CHEN et al., 2014; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015; KATOOR et al., 2017; LUC et al., 2019). Em decorrência do estresse oxidativo, o dano oxidativo também foi demonstrado em modelos de hipermetioninemia em diferentes órgãos e células como: o cérebro (STEFANELLO et al., 2005, 2011; SOARES et al., 2017b, 2020), o fígado (STEFANELLO et al., 2009; COSTA et al., 2013; SOARES et al., 2016), o rim (SOARES et al., 2016), o soro, as plaquetas (SOARES et al., 2018), os astrócitos (SOARES et al., 2019) e os macrófagos (DOS SANTOS et al., 2016; FRANCESCHI et al., 2020). Sendo assim, a busca por compostos com capacidade antioxidante torna-se importante como possível alternativa terapêutica para o manejo clínico da hipermetioninemia.

### 3.5 Taninos

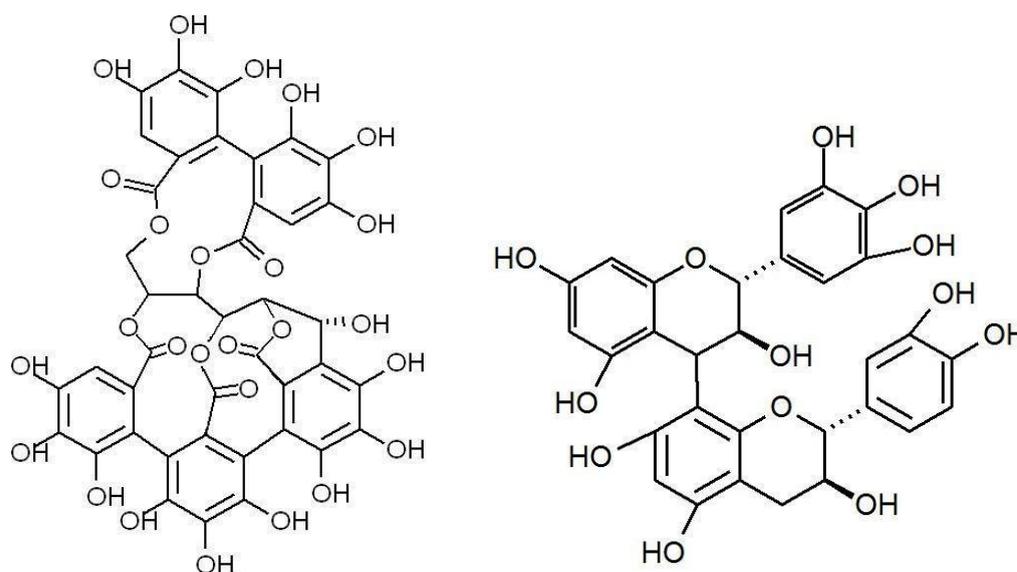
Os taninos são uma classe de biomoléculas polifenólicas adstringentes que se ligam e precipitam proteínas e vários outros compostos orgânicos, incluindo aminoácidos e alcalóides. São metabólitos secundários de plantas com pesos moleculares que variam de 300 a 5000 kDa (ésteres de ácido gálico) e até 20.000 kDa (proantocianidinas) (SIENIAWSKA e BAJ, 2017).

Essa classe é dividida em dois grupos principais com base na sua resistência ou não à hidrólise na presença de água quente ou das enzimas tanases: taninos hidrolisáveis e condensados (Figura 4). Os hidrolisáveis englobam os poliésteres do ácido gálico e hexaidroxidifênico (galotaninos e elagitaninos, respectivamente), enquanto os taninos condensados incluem os oligômeros e polímeros compostos por núcleos de flavan-3-ol (proantocianidinas) (OKUDA e ITO, 2011; RAUF et al., 2019).

Taninos hidrolisáveis são poliésteres que apresentam uma porção de açúcar e uma porção composta por ácidos orgânicos (ácidos gálico e elágico). Os galotaninos e os elagitaninos são as duas categorias presentes nos taninos hidrolisáveis, em que a hidrólise dos galotaninos produz açúcar e ácidos gálicos,

enquanto a dos elagitaninos produz ácidos hexaidroxifênicos e ácido elágico (PLAZA et al., 2016). Um exemplo de tanino hidrolisável e galotanino é o AT.

Taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas, são oligômeros ou polímeros formados pela condensação de unidades de flavanos (flavan-3-ol) ligadas por ligações ácido-lábeis 4 → 6 ou 4 → 8, e não contêm resíduos de glicose. Os polímeros são polidispersos e as cadeias são irregulares, podendo ser ramificadas e geralmente contêm mais de um tipo de unidade de base configuracional (TAMOKOU et al., 2017).



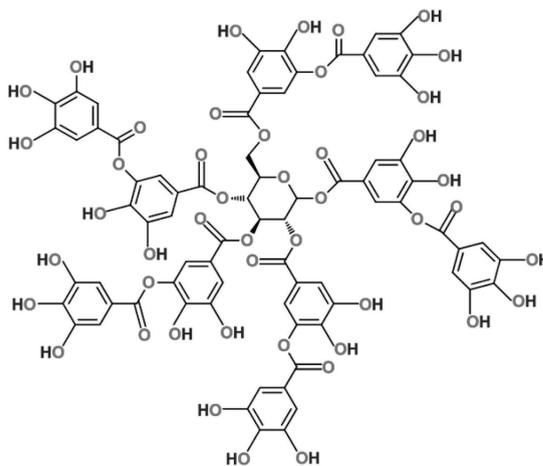
**Figura 4:** (Esquerda) Castalagina, um tipo de tanino hidrolisável (Direita) Prodelfinidina B9, um tipo de tanino condensado (Adaptado de OKUDA et al., 2011).

Um dos principais efeitos adversos relacionados aos taninos está relacionado a sua capacidade de formar complexos não absorvíveis com proteínas (especialmente aquelas que são ricas em prolina) (GONÇALVES et al., 2011a), enzimas (GONÇALVES et al., 2011b), açúcares (MANSOORI e MORDIRSANEI, 2012) e íons metálicos, o que pode diminuir o valor nutricional de alguns alimentos contendo esses compostos (GILANI et al., 2012). Porém, no caso dos taninos hidrolisáveis, sua ação pode não ser tão prejudicial na digestão das proteínas, uma vez que os taninos dessa classe serão hidrolisados no estômago em ambiente ácido, liberando as proteínas conjugadas (SERRANO et al., 2009).

É importante salientar que os taninos vêm sendo usados na medicina oriental a muito tempo, em função da sua presença em vegetais considerados “medicinais”, e que a administração desses alimentos ricos em taninos apresentaram efeitos benéficos para a saúde, tratando lesões cutâneas e inflamatórias e com capacidade de prevenir doenças crônicas (LILA, 2007; KUMARI e JAIN, 2012). Ainda, uma pesquisa recente, utilizando *docking* molecular, identificou taninos condensados capazes de inibir a atividade da principal protease do SARS-CoV-2 (ZHU e XIE, 2020).

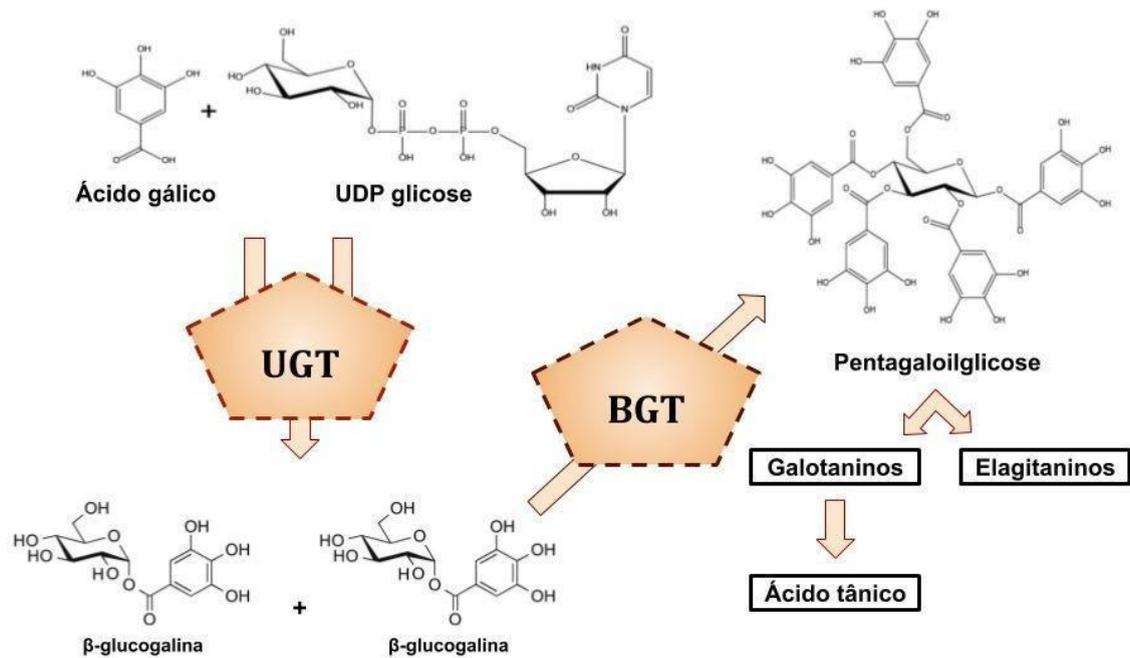
### 3.6 Ácido tânico (AT)

O AT é um composto polifenólico de origem vegetal, fazendo parte do grupo dos taninos hidrolisáveis e caracterizado como um galotanino, além de possuir um alto peso molecular (500-3000 kDa). Estruturalmente, o AT possui uma porção de glicose como núcleo e os grupos hidroxila da glicose são esterificados por 5 ácidos digálicos (Figura 5) (CHUNG, 1998).



**Figura 5:** Estrutura química do ácido tânico (SERRANO et al., 2019).

A biossíntese do AT está relacionada com a dos taninos hidrolisáveis, uma ligação éster é formada entre o ácido gálico e a glicose pela ação da UDP-glucosiltransferase (UGT) resultando em  $\beta$ -glucogalina. A enzima  $\beta$ -glucogalina O-galoiltransferase transfere um grupo galoil de uma unidade de  $\beta$ -glucogalina para outra molécula de  $\beta$ -glucogalina, ocorrendo de maneira sucessiva até gerar a pentagaloilglicose, que é posteriormente transformada em galotaninos ou elagitaninos (Figura 6) (ONO et al., 2016).



**Figura 6:** Biossíntese do AT. UGT - UDP-glucosiltransferase; BGT - β-glucogalina O-galoil transferase (SIENIAWSKA., 2017).

O AT pode ser encontrado em diversos alimentos, como uva, banana e lentilha, e em diversas bebidas como chá preto, chá verde, cerveja, café e vinho tinto (KING et al., 1999). No entanto, sua forma comercial provém normalmente de 3 fontes vegetais: Falso pau-Brasil (*Caesalpinia spinosa*), Galha chinesa (*Rhus chinensis*) e Sumagre (*Rhus coriaria*) (MONTEIRO et al., 2005).

### 3.6.1 Atividade antioxidante do AT

A atividade biológica mais documentada e relatada do AT é o seu efeito antioxidante, que pode ser exercido principalmente através da eliminação de radicais livres, quelação de metais de transição e modulação da atividade de enzimas pró e antioxidantes (OLEJAR et al., 2015; TIAN et al., 2012). A atividade de eliminação de radicais livres é baseada na capacidade de um antioxidante doar elétrons para um radical livre, tornando esse radical mais estável e menos prejudicial. O AT, *in vitro*, foi capaz de eliminar os radicais DPPH e ABTS com mais eficiência que antioxidantes padrão (GULÇIN et al., 2010). Além disso, extratos contendo grandes concentrações de AT também foram

capazes de eliminar esses radicais com capacidade semelhante ao AT puro (QA'DAN et al., 2011; ZHAO et al., 2011).

A quelação de metais de transição é outro aspecto da atividade antioxidante dos taninos, pois, por meio dessa ação, esses compostos são capazes de prevenir a reação de Fenton, conjugando-se com íons metálicos (por exemplo,  $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ ). Dessa forma ele evita que esses íons reajam com o peróxido de hidrogênio e interrompendo a geração do radical hidroxila, que é extremamente prejudicial à membrana celular e outras biomoléculas (PHIWCHAI et al., 2018; BASU et al., 2018).

Por fim, é relatado na literatura que os taninos, especialmente o AT, têm a capacidade de interferir na atividade de enzimas pró e antioxidantes. Um estudo realizado com AT demonstrou que esse composto inibiu de forma eficaz a atividade da NADPH oxidase, uma enzima pró-oxidante que gera o ânion superóxido (YU, 2018), enquanto outro estudo associou o aumento da ingestão de AT na dieta de animais com melhora na atividade das enzimas antioxidantes GPx e CAT (YE et al., 2016).

### **3.6.2 Atividade neuroprotetora do AT**

O AT também exibe atividade neuroprotetora frente a vários modelos experimentais de doenças neurodegenerativas e neuro debilitantes (TEJADA et al., 2017). Estudos demonstraram que essa atividade ocorre por meio de seu efeito antioxidante e da capacidade de alguns taninos hidrolisáveis de serem metabolizados em taninos absorvíveis de peso molecular muito inferior, que podem atravessar a barreira sangue-cérebro, exercendo sua atividade biológica no cérebro (MEDIC-SARIC et al., 2009; MORI et al., 2012).

Estudos utilizando o AT como ferramenta preventiva em modelos experimentais de doença de Alzheimer elucidaram a capacidade desse tanino em reduzir a atividade de colinesterases, enzimas cuja atividade encontra-se elevada nessa patologia (TURKAN et al., 2019; GERZSON et al., 2019). Além disso, Gerzson e colaboradores demonstraram que o AT foi capaz de prevenir a neuroinflamação e de restabelecer a expressão da Akt em modelo animal de demência esporádica do tipo Alzheimer (GERZSON et al., 2020).

A capacidade neuroprotetora e antidepressiva do AT foi observada em um modelo animal de depressão induzida pelo lipopolissacarídeo. Nesse estudo o

AT reduziu os níveis de TNF- $\alpha$ , e mostrou ação tipo-antidepressiva nesses animais (LUDUVICO et al., 2020). Ademais, extratos vegetais contendo altas concentrações de AT também exerceram efeitos tipo-antidepressivos, os quais foram associados ao fato desse composto ser um inibidor não seletivo da monoamina oxidase, e, portanto, aumentar indiretamente os níveis de neurotransmissores monoaminérgicos no cérebro (CHANDRASEKHAR et al., 2017).

Adicionalmente, Bona e colaboradores (2019) relataram o efeito antiproliferativo do AT em modelos de glioblastoma *in vitro* e *in vivo*, sendo esse composto capaz de causar morte celular por apoptose, parada no ciclo celular e redução na formação de colônias, além de apresentar efeito antioxidante (BONA et al., 2019). Dessa forma, considerando a atividade antioxidante e neuroprotetora do AT relatadas na literatura, e que o estresse oxidativo e dano neurológico estão presentes em quadros de hipermetioninemia, se torna relevante avaliar o papel protetor do AT frente às alterações observadas na hipermetioninemia.

#### 4. ARTIGO

A metodologia e resultados serão apresentados na forma de um artigo publicado no periódico *Amino Acids*.



## Ameliorative effect of tannic acid on hypermethioninemia-induced oxidative and nitrosative damage in rats: biochemical-based evidences in liver, kidney, brain, and serum

Bernardo de Moraes Meine<sup>1</sup> · Natália Pontes Bona<sup>1</sup> · Karina Pereira Luduvico<sup>1</sup> · Juliane de Souza Cardoso<sup>1</sup> · Luiza Spohr<sup>2</sup> · Anita Ávila de Souza<sup>2</sup> · Roselia Maria Spanevello<sup>2</sup> · Mayara Sandrielly Pereira Soares<sup>2</sup> · Francieli Moro Stefanello<sup>1</sup>

Received: 26 June 2020 / Accepted: 6 November 2020  
 © Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020

### Abstract

We investigated the ability of tannic acid (TA) to prevent oxidative and nitrosative damage in the brain, liver, kidney, and serum of a rat model of acute hypermethioninemia. Young Wistar rats were divided into four groups: I (control), II (TA 30 mg/kg), III (methionine (Met) 0.4 g/kg + methionine sulfoxide (MetO) 0.1 g/kg), and IV (TA/Met + MetO). Rats in groups II and IV received TA orally for seven days, and rats of groups I and III received an equal volume of water. After pretreatment with TA, rats from groups II and IV received a single subcutaneous injection of Met + MetO, and were euthanized 3 h afterwards. In specific brain structures and the kidneys, we observed that Met + MetO led to increased reactive oxygen species (ROS), nitrite, and lipid peroxidation levels, followed by a reduction in thiol content and antioxidant enzyme activity. On the other hand, pretreatment with TA prevented both oxidative and nitrosative damage. In the serum, Met + MetO caused a decrease in the activity of antioxidant enzymes, which was again prevented by TA pretreatment. In contrast, in the liver, there was a reduction in ROS levels and an increase in total thiol content, which was accompanied by a reduction in catalase and superoxide dismutase activities in the Met + MetO group, and pretreatment with TA was able to prevent only the reduction in catalase activity. Conclusively, pretreatment with TA has proven effective in preventing oxidative and nitrosative changes caused by the administration of Met + MetO, and may thus represent an adjunctive therapeutic approach for treatment of hypermethioninemia.

**Keywords** Redox status · Prevention · Natural product · Tissue damage · Acute hypermethioninemia

### Introduction

Methionine (Met) is an essential sulfur-containing amino acid necessary for normal healthy growth (Chiang et al. 1996). However, elevation of Met body levels due to the accumulation of Met and/or methionine sulfoxide (MetO), which is caused mainly by methionine adenosyltransferase (MAT) deficiency, leads to a condition known as hypermethioninemia (Mudd et al. 2011; Martinez et al. 2017).

Clinical manifestations of hypermethioninemia include variable degrees of hepatic and neurological alterations (Schweinberger et al. 2016, 2018). Although the pathophysiology has not been completely elucidated, it has recently been shown that this condition can be extremely harmful to organs and tissues, and that the associated imbalance in redox status could lead to hepatic (Stefanello et al. 2009; Costa et al. 2013), renal (Soares et al. 2017a), and

Handling Editor: E. Agostinelli.

✉ Mayara Sandrielly Pereira Soares  
 mspereirasoes@gmail.com

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

neurological dysfunctions (Stefanello et al. 2007a, b; Stefanello et al. 2011; Soares et al. 2018), as well as to biochemical alterations in cell blood as lymphocytes and platelets (Soares et al. 2017b, 2019).

Considering that oxidative stress, which is caused by an imbalance between reactive oxygen species (ROS) levels and antioxidant defense systems (Gonsette et al. 2008; Ljubisavljevic et al. 2016), is one of the main manifestations of hypermethioninemia in experimental models (Soares et al. 2017a, 2018; Stefanello et al. 2011), it is important to investigate agents with antioxidant potential, especially since alternative therapeutic approaches for treating hypermethioninemia are largely lacking, or are restricted to a Met-free diet and supplementation of *S*-adenosylmethionine (SAM; Furujo et al. 2012). In addition, the therapy used is generally based on treatment of a clinical condition already present (Barić et al. 2017). However, adopting a preventive strategy can prove extremely valuable in avoiding the potential damage caused by species reactive to biomolecules, cells, and tissues, especially by preventing their production in the first place.

In this sense, compounds isolated from natural products have promising therapeutic potential, and are of great interest for treatment of hypermethioninemia, since they can act in the prevention of biochemical changes found in this condition. In recent years, polyphenols have surfaced in the scientific world owing to their various important bioactivities (Fraga et al. 2019). In this regard, tannic acid (TA), a naturally occurring large polyphenol, which is found in several herbaceous and woody plants, wines, and a broad selection of teas (Serrano et al. 2009), was found to exert various biological effects, ranging from antioxidant (Basu et al. 2018), to neuroprotective (Ashafaq et al. 2017; Gerszon et al. 2019, 2020; Luduvico et al. 2020), and antitumoral effects (Bona et al. 2020). TA possesses powerful antioxidant potential and free radical scavenging properties, along with iron chelation capacity (Gulçin et al. 2010), making it an excellent therapeutic agent. In addition, in other experimental models of aminoacidopathies, promising effects could be achieved by making use of phenolic compounds (Malinowska et al. 2013; Malinowska and Olas 2010, 2011; Noll et al. 2011).

Therefore, the aim of this study was to investigate the protective effects of TA against oxidative and nitrosative stress in the brain, liver, kidney, and serum of an acute hypermethioninemia model in young Wistar rats.

## Materials and methods

### Drugs and reagents

MetO and TA were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and had the highest purity.

### Animals

Wistar rats (23 days old) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas (Pelotas, RS, Brazil). Animals were housed in an air-conditioned constant temperature colony room ( $22 \pm 1$  °C) with 12 h light/dark cycles. Rats had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. All animal procedures were approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation from the Federal University of Pelotas under the protocol number CEEA 38255-2019.

### In vivo studies

Twenty Wistar rats were divided into four groups: group I (control); group II (treated with TA at 30 mg/kg of body weight); group III (treated with Met at 0.4 g/kg + MetO at 0.1 g/kg of body weight), and group IV (treated with TA at 30 mg/kg of body weight, and Met at 0.4 g/kg + MetO at 0.1 g/kg of body weight). Rats in groups II and IV received TA orally for seven days, and rats of groups I and III received an equal volume of water. On the eighth day, the animals of groups III and IV received a single subcutaneous injection of Met and MetO dissolved in saline. The animals in groups I and II received an equivalent volume of saline. The animals were euthanized 3 h after injection. The protocol used and the doses of Met and MetO administered were based on previous studies performed by Stefanello et al. (2007a) and Costa et al. (2013). The dose of TA that was chosen in this study was based on previous data from our research group (Gerszon et al. 2020; Luduvico et al. 2020).

### Sample preparation

After euthanasia, the hippocampus, striatum, cerebral cortex, kidney, liver, and blood were collected for further analyses.

### Serum preparation

Blood samples were collected in tubes without anticoagulant, and subsequently centrifuged at  $2500 \times g$  for 15 min at

room temperature. The clot was removed, and the resulting serum was used for biochemical analyses.

### Tissue and homogenate preparation

Brain regions of interest, livers, and kidneys were dissected and homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C, the pellet was discarded, and the supernatant was immediately separated and used for subsequent measurements.

### Biochemical analyses

#### ROS detection

ROS formation was determined according to the method of Ali et al. (1992), with minor modifications. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was measured to determine ROS production. DCF fluorescence emission was recorded at excitation wavelengths of 525 and 488 nm at 30 min after adding DCFH-DA to the medium containing 5 µL of the sample. ROS production is shown as µmol DCF per mg of protein.

#### Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS, a measure of lipid peroxidation, was determined according to Esterbauer and Cheeseman (1990). For this, homogenates were mixed with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid, and heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS was determined by measuring the absorbance at 535 nm. Results are reported as nmol of TBARS per mg of protein.

#### Total sulfhydryl content

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery (2001), which is based on the reduction of 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) (DTNB) by thiols, which in turn become oxidized (disulfide production), generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, homogenates were added to PBS buffer, pH 7.4, containing EDTA. The reaction was initiated by addition of DTNB. Results are reported as nmol TNB per mg of protein.

#### Nitrite level quantification

Nitrite levels were measured using the Griess reaction, following the method of Stuehr and Nathan (1989). In brief, 50 µL of serum were incubated with 50 µL of 1%

sulfanilamide and 50 µL of 0.3% *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride at room temperature for 10 min. Nitrite was quantified by spectrophotometry at 540 nm using sodium nitrite as a standard. Results are expressed as µM nitrite per mg of protein.

#### Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD activity was measured using the method described by Misra and Fridovich (1972). It is based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer adjusted to 480 nm. The specific activity of SOD is reported as units per mg of protein.

#### Catalase (CAT) assay

Catalase (CAT) activity was assayed using the method of Aebi (1984). Depletion of hydrogen peroxide was continuously monitored on a spectrophotometer at 240 nm over 90 s. One unit of the enzyme was defined as 1 µmol of hydrogen peroxide consumed per minute, and the specific activity is reported as units per mg of protein.

#### Glutathione peroxidase (GPx) assay

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured using a commercial kit (Randox Lab, Antrim, United Kingdom). GPx catalyzes glutathione oxidation by cumene hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH, oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted to its reduced form with concomitant oxidation of NADPH to NADP<sup>+</sup>. The decrease in absorption was measured at 340 nm. The specific activity of GPx is shown as units per mg of protein.

#### Glutathione S-transferase (GST) activity assay

Glutathione S-transferase (GST) activity was measured using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate according to the method of Habig et al. (1974). The assay mixture contained 1 mM CDNB (in ethanol), 10 mM glutathione, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), and 20 µL of serum. The activity is expressed as µmol GS-DNB min per mg of protein.

#### Protein determination

Protein levels were measured by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

## Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test for mean comparison using GraphPad Prism version 5.0 software (Intuitive Software for Science, São Diego, CA). A  $P$  value of less than or equal to 0.05 was considered statistically significant. All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The  $F$  is the ratio of two mean square values, which means that if the value is close to 1.00 the null hypothesis is true, and a larger  $F$  ratio means the variation between groups is more than you would see by chance.

## Results

### Effect of TA on oxidative and nitrosative stress during acute hypermethioninemia in rat cerebral cortex tissue

Initially, we investigated the protective capacity of TA against exposure of the cerebral cortex to Met and MetO under oxidative stress conditions. As shown in Fig. 1, combination treatment increased ROS ( $F_{(3-15)}=9.42$ ,  $P<0.001$ ), nitrite ( $F_{(3-15)}=6.64$ ,  $P<0.01$ ), and TBARS ( $F_{(3-15)}=7.1$ ,  $P<0.05$ ) levels in the cerebral cortex, whereas pretreatment with TA prevented the increase in ROS ( $F_{(3-15)}=9.42$ ,  $P<0.01$ ) and nitrite ( $F_{(3-15)}=6.64$ ,  $P<0.05$ ) levels. The SH content was similar to that of the control in all of the experimental groups ( $F_{(3-15)}=0.74$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 1).

Regarding the activity of antioxidant enzymes, the combination treatment resulted in reduced CAT ( $F_{(3-15)}=4.74$ ,  $P<0.05$ ) and GPx ( $F_{(3-13)}=6.87$ ,  $P<0.01$ ) activities, and TA was able to prevent this decrease in enzymatic activities ( $P<0.05$ ). No changes were observed for SOD ( $F_{(3-16)}=0.68$ ,  $P>0.05$ ) and GST ( $F_{(3-15)}=0.57$ ,  $P>0.05$ ) in all groups when compared to the control (Fig. 1).

### Effect of TA on oxidative and nitrosative stress during acute hypermethioninemia in the rat hippocampus

Figure 2 shows that ROS ( $F_{(3-11)}=5.50$ ,  $P<0.05$ ) and TBARS ( $F_{(3-11)}=7.69$ ,  $P<0.01$ ) levels were increased by the combination treatment, while SH levels ( $F_{(3-13)}=14.49$ ,  $P<0.01$ ) were reduced in the hippocampus; however, TA pretreatment was able to prevent the increase in ROS ( $F_{(3-11)}=5.50$ ,  $P<0.05$ ) and the decrease in thiol ( $F_{(3-13)}=14.49$ ,  $P<0.001$ ) levels. The nitrite level did not change in any of the groups when compared to the control ( $F_{(3-13)}=0.64$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 2).

Furthermore, SOD ( $F_{(3-12)}=9.76$ ,  $P<0.01$ ), CAT ( $F_{(3-13)}=6.82$ ,  $P<0.05$ ), and GPx ( $F_{(3-14)}=9.84$ ,  $P<0.05$ )

activities were decreased in the combination treatment group, and TA administration was capable of preventing this change in both CAT ( $F_{(3-13)}=6.82$ ,  $P<0.05$ ) and GPx ( $F_{(3-14)}=9.84$ ,  $P<0.05$ ) activities. In contrast, GST activity remained unchanged in all groups ( $F_{(3-14)}=0.82$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 2).

### Effect of TA on oxidative and nitrosative stress during acute hypermethioninemia in the rat striatum

We then evaluated the same parameters in the rat striatum, as shown in Fig. 3. The combination treatment increased the levels of ROS ( $F_{(3-13)}=8.73$ ,  $P<0.05$ ), nitrites ( $F_{(3-15)}=17.08$ ,  $P<0.001$ ), and TBARS ( $F_{(3-74)}=6.45$ ,  $P<0.05$ ), and pretreatment with TA prevented the increase in both ROS ( $F_{(3-13)}=8.73$ ,  $P<0.05$ ) and nitrite ( $F_{(3-15)}=17.08$ ,  $P<0.001$ ) levels. The SH content did not change between the different groups when compared to the control ( $F_{(3-14)}=0.19$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 3).

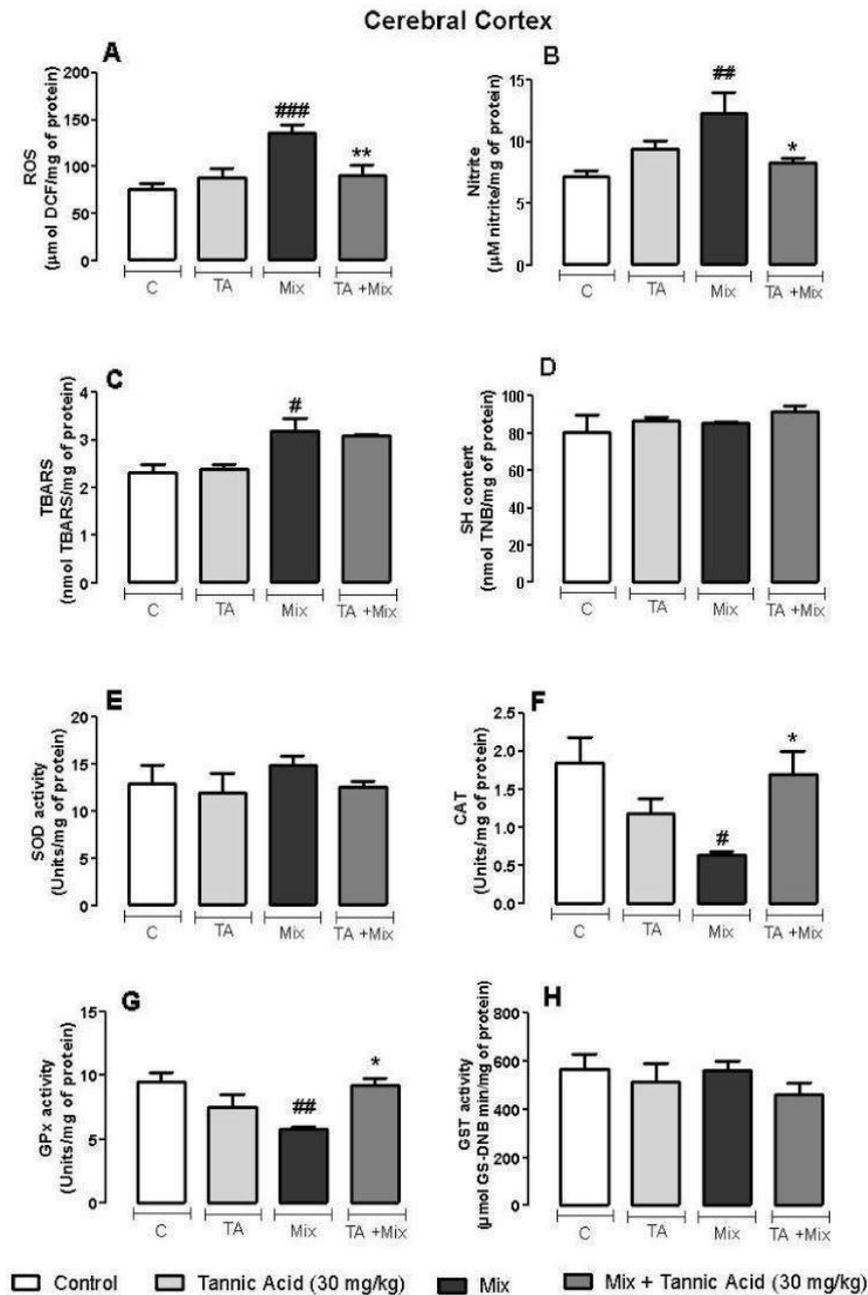
Regarding the activity of the antioxidant enzymes, the combination treatment was able to decrease the activity of both CAT ( $F_{(3-13)}=6.62$ ,  $P<0.01$ ) and GPx ( $F_{(3-14)}=5.89$ ,  $P<0.01$ ); however, pretreatment with TA did not prevent this alteration ( $P>0.05$ ). The activities of both SOD ( $F_{(3-15)}=0.13$ ,  $P>0.05$ ) and GST ( $F_{(3-15)}=1.32$ ,  $P>0.05$ ) remained unchanged between the groups when compared to the control (Fig. 3).

### Effect of TA on oxidative and nitrosative stress during acute hypermethioninemia in the rat liver

Then, as shown in Fig. 4, we analyzed the same parameters with respect to the protective capacity of TA on the liver. In the course of this, we observed a reduction in ROS levels ( $F_{(3-14)}=4.33$ ,  $P<0.05$ ), and an increase in the SH content ( $F_{(3-15)}=12.50$ ,  $P<0.05$ ) induced by the combination treatment, but pretreatment with TA did not change this increase ( $P>0.05$ ). The levels of nitrite ( $F_{(3-16)}=3.10$ ,  $P>0.05$ ) and TBARS ( $F_{(3-26)}=1.42$ ,  $P>0.05$ ) were not affected in any of the groups when compared to the control (Fig. 4).

Regarding antioxidant enzymes, a decrease was observed in the activity of both CAT ( $F_{(3-13)}=8.83$ ,  $P<0.05$ ) and GPx ( $F_{(3-16)}=4.22$ ,  $P<0.05$ ) in the combination treatment group, and pretreatment with TA was able to restore CAT activity ( $F_{(3-13)}=8.83$ ,  $P<0.05$ ). The activities of both SOD ( $F_{(3-15)}=1.51$ ,  $P>0.05$ ) and GST ( $F_{(3-15)}=1.23$ ,  $P>0.05$ ) were not altered in any of the groups when compared to the control (Fig. 4).

**Fig. 1** Preventive effects of tannic acid (TA) (30 mg/kg) on oxidative and nitrosative stress parameters in the cerebral cortex from young rats submitted to acute hypermethioninemia protocol (Mix). **a** Reactive oxygen species (ROS) expressed as  $\mu\text{mol DCF/mg}$  of protein; **b** nitrites was expressed as  $\mu\text{M nitrite/mg}$  of protein; **c** thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were reported as  $\text{nmol TBARS/mg}$  of protein; **d** total sulfhydryl content (SH) reported as  $\text{nmol TNB/mg}$  of protein; **e** superoxide dismutase (SOD), **f** catalase (CAT), **g** glutathione peroxidase (GPx) activities were expressed as units/mg of protein and **h** glutathione *S*-transferase (GST) activity reported as  $\mu\text{mol GS-DNB min/mg}$  of protein. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ , compared to control group and \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  compared to Mix group ( $n = 5$  animals per group)



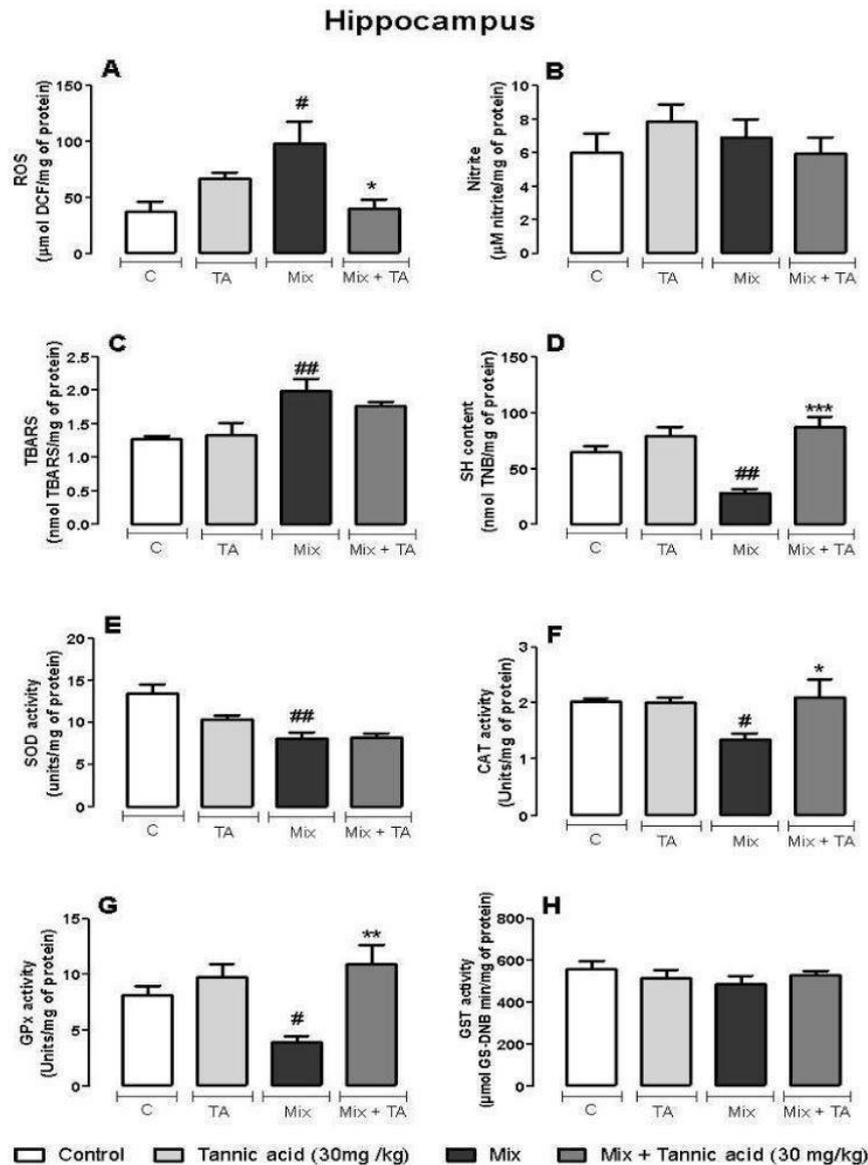
### Effect of TA on oxidative and nitrosative stress during acute hypermethioninemia in rat kidneys

The aforementioned parameters were also analyzed in rat kidneys, as shown in Fig. 5. In the combination treatment group, we observed an increase in ROS ( $F_{(3-13)} = 14.33$ ,  $P < 0.001$ ) and TBARS ( $F_{(3-13)} = 4.08$ ,  $P < 0.05$ ) levels, as well as a reduction in the SH content ( $F_{(3-12)} = 7.45$ ,

$P < 0.05$ ). However, pretreatment with TA prevented the increase in ROS levels ( $P < 0.01$ ), and at the same time resulted in a decrease in the SH content ( $P < 0.01$ ). Nitrite levels remained unchanged in all groups when compared to the control ( $F_{(3-16)} = 1.06$ ,  $P > 0.05$ ) (Fig. 5).

Concerning the antioxidant enzymes, the combination treatment group featured reductions in the activities of SOD ( $F_{(3-17)} = 6.09$ ,  $P < 0.01$ ), CAT ( $F_{(3-12)} = 6.84$ ,  $P < 0.05$ ),

**Fig. 2** Preventive effects of tannic acid (TA) (30 mg/kg) on oxidative and nitrosative stress parameters in the hippocampus from young rats submitted to acute hypermethioninemia protocol (Mix). **a** Reactive oxygen species (ROS) expressed as  $\mu\text{mol DCF/mg}$  of protein; **b** nitrites expressed as  $\mu\text{M nitrite/mg}$  of protein; **c** thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were reported as  $\text{nmol TBARS/mg}$  of protein; **d** total sulfhydryl content (SH) reported as  $\text{nmol TNB/mg}$  of protein; **e** superoxide dismutase (SOD), **f** catalase (CAT), **g** glutathione peroxidase (GPx) activities were expressed as units/mg of protein and **h** glutathione *S*-transferase (GST) activity reported as  $\mu\text{mol GS-DNB min/mg}$  of protein. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$  compared to control group and \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  compared to Mix group ( $n = 5$  animals per group)



GPx ( $F_{(3-13)} = 8.32$ ,  $P < 0.01$ ), and GST ( $F_{(3-14)} = 10.39$ ,  $P < 0.001$ ). However, treatment with TA was capable of preventing these reductions in the activities of SOD ( $P < 0.05$ ), CAT ( $P < 0.05$ ), GPx ( $P < 0.01$ ), and GST ( $P < 0.01$ ) (Fig. 5).

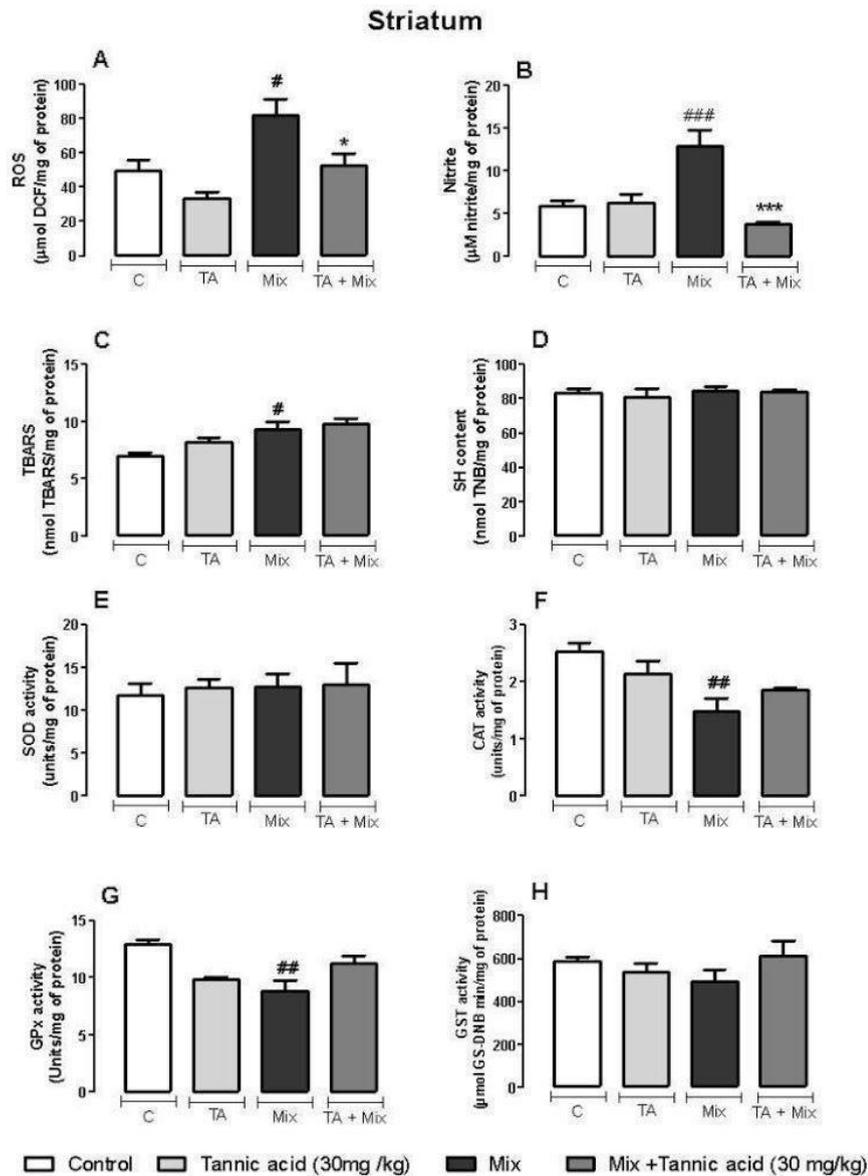
#### Effect of TA on oxidative and nitrosative stress during acute hypermethioninemia in rat serum

Finally, we investigated the preventive capacity of TA in the serum of rats, as shown in Fig. 6. It was observed that the combination treatment increased ROS levels ( $F_{(3-12)} = 5.27$ ,  $P < 0.05$ ), and pretreatment with TA could not prevent this increase ( $P > 0.05$ ). The levels of nitrite ( $F_{(3-16)} = 2.56$ ,

$P > 0.05$ ) and the SH content ( $F_{(3-16)} = 1.29$ ,  $P > 0.05$ ) were not changed in any of the groups when compared to the control.

The combination treatment decreased both SOD ( $F_{(3-15)} = 6.83$ ,  $P < 0.05$ ) and CAT ( $F_{(3-14)} = 10.66$ ,  $P < 0.001$ ) activities, and pretreatment with TA was able to prevent this decrease in SOD ( $P < 0.01$ ) and CAT ( $P < 0.05$ ) activities (Fig. 6).

**Fig. 3** Preventive effects of tannic acid (TA) (30 mg/kg) on oxidative and nitrosative stress parameters in the striatum from young rats submitted to acute hypermethioninemia protocol (Mix). **a** Reactive oxygen species (ROS) expressed as  $\mu\text{mol DCF/mg}$  of protein; **b** nitrites expressed as  $\mu\text{M nitrite/mg}$  protein; **c** thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were reported as  $\text{nmol TBARS/mg}$  of protein; **d** total sulfhydryl content (SH) reported as  $\text{nmol TNB/mg}$  of protein; **e** superoxide dismutase (SOD), **f** catalase (CAT), **g** glutathione peroxidase (GPx) activities were expressed as  $\text{units/mg}$  of protein and **h** glutathione *S*-transferase (GST) activity reported as  $\mu\text{mol GS-DNB min/mg}$  of protein. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ ; compared to control group and \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  compared to Mix group ( $n = 5$  animals per group)

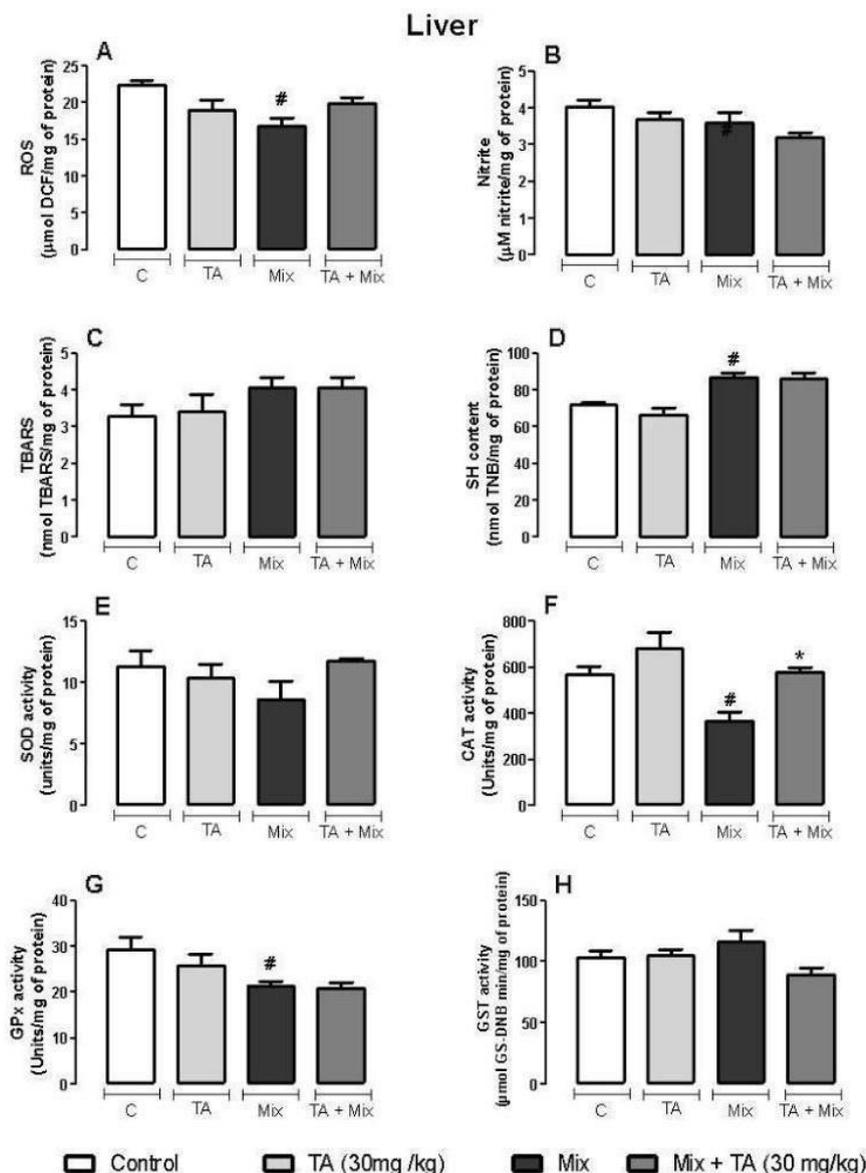


## Discussion

Hypermethioninemia can be of genetic and non-genetic origin, and the Met and MetO plasma levels can reach up to 2,500  $\mu\text{mol/L}$  and 460  $\mu\text{M}$ , respectively (Chamberlin et al. 1996). The worldwide incidence of this disorder has not yet been determined; however, some researchers have reported an estimated frequency of 1 in 27,000 live births in Portugal, and 1 in 28,000 in Galicia (Marcão et al. 2015). Although this is a rare condition, it can present with severe clinical signs and symptoms, which can be aggravated by the limited therapeutic arsenal.

Previous studies by our research group highlighted that the administration of Met or MetO alters several important biological systems for maintaining cellular and tissue homeostasis, especially those associated with the redox status of the brain, liver, kidneys, serum, platelets, and astrocytes (Soares et al. 2017a, 2017b, 2018, 2019; Stefanello et al. 2005, 2011). Therefore, here we aimed to deepen our research by testing whether treatment with TA could prevent or reduce oxidative and nitrosative damage found in hypermethioninemic rats. We adopted a well-established model of acute hypermethioninemia (Stefanello et al. 2007b; Costa et al. 2013; Soares et al. 2019). Additionally, TA was used

**Fig. 4** Preventive effects of tannic acid (TA) (30 mg/kg) on oxidative and nitrosative stress parameters in the liver from young rats submitted to acute hypermethioninemia protocol (Mix). **a** Reactive oxygen species (ROS) expressed as  $\mu\text{mol DCF/mg}$  of protein; **b** nitrites expressed as  $\mu\text{M nitrite/mg}$  of protein; **c** thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were reported as  $\text{nmol TBARS/mg}$  of protein; **d** total sulfhydryl content (SH) reported as  $\text{nmol TNB/mg}$  of protein; **e** superoxide dismutase (SOD), **f** catalase (CAT), **g** glutathione peroxidase (GPx) activities were expressed as  $\text{units/mg}$  of protein and **h** glutathione *S*-transferase (GST) activity reported as  $\mu\text{mol GS-DNB min/mg}$  of protein. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. # $P < 0.05$  compared to control group and \* $P < 0.05$  compared to Mix group ( $n = 5$  animals per group)



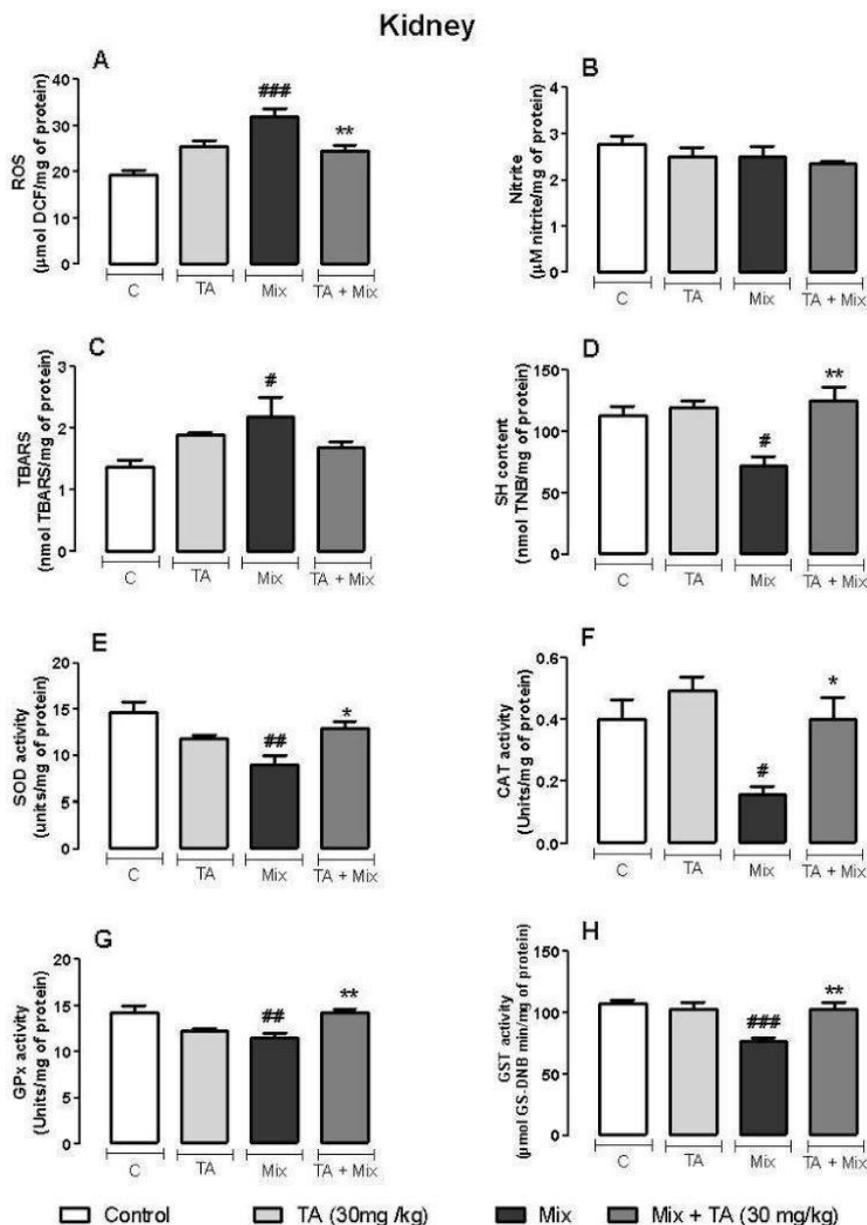
as a preventive agent, since it is a polyphenol with extensive antioxidant and neuroprotective capacities, as evidenced by published literature (Gerzson et al. 2019, 2020; Bona et al. 2020; Luduvico et al. 2020).

One of the primary ways of the body to defend itself against oxidative damage is through antioxidant enzyme activities, SOD in particular, which protects against superoxide anions, and CAT and GPx that degrade hydrogen peroxide, preventing the damage generated by the different types of reactive species (Lowe et al. 2014). However, previous studies showed a decrease in the levels of these two enzymes under experimental conditions of acute and

chronic hypermethioninemia (Stefanello et al. 2009; Soares et al. 2017b, 2018, 2020).

Herein, we investigated the effects of pretreatment with TA on the alteration of antioxidant enzyme activities induced by administration of Met + MetO as an alternative treatment strategy for reducing mediators of oxidative damage, such as ROS, nitrites, and TBARS, in three brain structures (cerebral cortex, hippocampus, and striatum). As demonstrated in this study, in the combination treatment group there was an increase in ROS and TBARS, followed by a decrease in CAT and GPx activities in all structures analyzed, besides a decrease in sulfhydryl content and SOD activity in the

**Fig. 5** Preventive effects of Tannic acid (TA) (30 mg/kg) on oxidative and nitrosative stress parameters in the kidney from young rats submitted to acute hypermethioninemia protocol (Mix). **a** Reactive oxygen species (ROS) expressed as  $\mu\text{mol DCF/mg}$  of protein; **b** nitrites expressed as  $\mu\text{M nitrite/mg}$  of protein; **c** thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were reported as  $\text{nmol TBARS/mg}$  of protein; **d** total sulfhydryl content (SH) reported as  $\text{nmol TNB/mg}$  of protein; **e** superoxide dismutase (SOD), **f** catalase (CAT), **g** glutathione peroxidase (GPx) activities were expressed as  $\text{units/mg}$  of protein and **h** glutathione *S*-transferase (GST) activity reported as  $\mu\text{mol GS-DNB min/mg}$  of protein. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$  compared to control group and \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  compared to Mix group ( $n = 5$  animals per group)

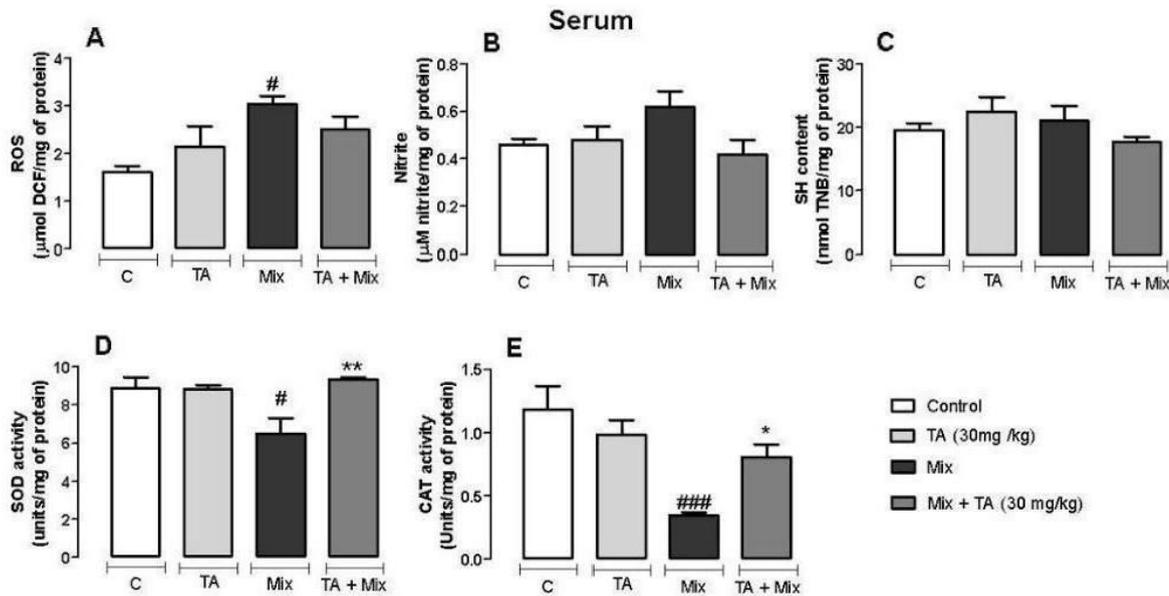


hippocampus. These results highlight the potential damage that Met and MetO could generate in the brain by decreasing antioxidant defenses and increasing harmful reactive species. Additionally, it was shown that these amino acid species could increase DNA damage and lipid peroxidation in the brain, and initiate apoptosis by activation of caspases 3 and 9 (Soares et al. 2017b).

This increase in reactive species may be partially related to the production of homocysteine, as it is part of the Met metabolism, and further capable of undergoing self-oxidation catalyzed by transition metal ions, promoting the

generation of hydrogen peroxide and superoxide (Hogg et al. 1999). Another explanation may be the fact that MetO is free in blood plasma, and the enzyme methionine sulfoxide reductase has a much lower specificity for free MetO than protein-bound MetO, making it more difficult to reduce it to Met, thus possibly increasing the generation of reactive species (Boschi-Muller et al. 2005; Lee et al. 2009).

On the other hand, pretreatment with TA was effective against oxidative damage in brain structures caused by the administration of Met + MetO. When analyzing the oxidative parameters in the TA + combination treatment group, it



**Fig. 6** Preventive effects of tannic acid (TA) (30 mg/kg) on oxidative and nitrosative stress parameters in the serum from young rats submitted to acute hypermethioninemia protocol (Mix). **a** Reactive oxygen species (ROS) expressed as  $\mu\text{mol DCF/mg}$  of protein; **b** nitrites expressed as  $\mu\text{M nitrite/mg}$  of protein; **c** total sulfhydryl content (SH)

reported as nmol TNB/mg of protein; **d** superoxide dismutase (SOD) and **e** catalase (CAT) activities were expressed were units/mg of protein. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; <sup>###</sup> $P < 0.001$  compared to control group and <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  compared to Mix group ( $n = 5$  animals per group)

was possible to verify that TA prevented both the increase in ROS and nitrites, as well as the decrease in SOD, CAT, and GPx activities. It is important to recognize that TA is able to prevent the Fenton reaction by conjugation with metal ions (for instance,  $\text{Fe}^{3+}$ ), hence preventing them from reacting with hydrogen peroxide. This in turn prevents the generation of hydroxyl radicals, which are extremely harmful to the cell membrane and other biomolecules (Basu et al. 2018). Another interesting fact about TA is that it can be metabolized into bioactive molecules of much lower molecular weight, i.e., absorbable tannins, such as gallic acid, that can cross the blood–brain barrier, exerting their biological activities in the brain (Mori et al. 2012). Also, a variety of studies have shown the beneficial effects of TA towards the brain. In this context, TA elicits antitumor activity and inhibits the growth of tumor cells in a preclinical model of glioblastoma multiforme (Bona et al. 2020). Another study carried out by Gerzson and colleagues (2019) demonstrated that TA can prevent learning and memory impairment in a model of streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease. Furthermore, TA was shown to minimize the neurotoxicity of aluminum and lead, and to prevent the inhibition of NMDA receptors in the brains of Wistar rats (Tuzmen et al. 2015). More recently, Luduvico and colleagues (2020) demonstrated the antidepressant effect of TA in an animal model of depressive-like behavior induced by lipopolysaccharide (Luduvico et al. 2020).

We also analyzed the effect of Met + MetO on the liver and kidney tissue. Previous studies from our laboratory showed that after administration of Met and/or MetO the liver and the kidney underwent oxidative and morphological changes (Costa et al. 2013; Soares et al. 2017a; Stefanello et al. 2009).

In the liver, administration of Met + MetO decreased ROS levels in the combination treatment group, which also corroborates with the reduction in CAT and GPx activities. In addition, there was an increase in total SH levels in the combination treatment group, which could have contributed to the reduction in ROS levels observed for that group, since SH groups have important antioxidant capacity. It should be noted that these results are in accordance with the study by Costa et al. (2013), which also analyzed the oxidative effects of exposure to Met and/or MetO both in vitro and in vivo (acute protocol, Costa et al. 2013). It is important to emphasize that methionine metabolism occurs primarily in the liver, and this tissue is known to have a high concentration of antioxidant compounds and enzymes, which explains, at least in part, the results for ROS and SH levels found in the liver (Mato et al. 2008).

On the other hand, it has been shown that long-term administration of Met and/or MetO alters the morphology of liver cells in addition to causing oxidative damage in the liver of young rats (Stefanello et al. 2009; Soares et al. 2017a, b). In addition, an important factor to be considered

is that Met is metabolized in the liver, where MAT converts Met to SAM. Conclusively, high concentrations of this amino acid can cause liver damage, especially through toxic metabolites, such as MetO and homocysteic acid (Martinov et al. 2010).

Regarding the pretreatment with TA, only CAT activity could be restored. However, some studies have already demonstrated its beneficial effects on the liver, protecting it against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis (Chu et al. 2016), preventing it from non-alcoholic cirrhosis in *in vivo* and *in vitro* models (Chung et al. 2019), and showing increased expression of liver genes linked to better iron absorption, and decreased expression of genes linked to increased liver cholesterol in animal models (Ye et al. 2016), together pointing towards possible benefits of ingesting this polyphenol.

In the kidney, we observed an increase in the levels of ROS and TBARS, followed by a decrease in total sulfhydryl content, SOD, CAT, and GST activities. Both the increase in TBARS levels and the decrease in total sulfhydryl content could be associated with increased levels of ROS, since changes related to TBARS can lead to the peroxidation of the lipid membranes of renal cells, and the changes in total sulfhydryl content might be related to oxidation of the SH groups, which can cause an impairment in protein activity (Davies et al. 2005; Yin et al. 2011). Concomitantly, there was a reduction in SOD, CAT, and GST activities. SOD has the ability to convert the superoxide radical to hydrogen peroxide and oxygen, CAT transforms hydrogen peroxide into oxygen and water, and GST has the ability to neutralize xenobiotic agents through nucleophilic attacks (Veal et al. 2018). These alterations might lead to a rise in ROS production, such as radical superoxide and hydroxyl radicals, resulting in a diversity of disorders, such as endothelial dysfunction and atherosclerosis, which are consequences of severe oxidative stress in the kidney (Daenen et al. 2019). Therefore, the group that were administered TA + Met and MetO was protected from most of the changes caused by the amino acids by preventing the increase in ROS levels, the reduction of total sulfhydryl content, and the decrease in SOD, CAT, and GST activities. Thus, it can be assumed that this effect was related to the hydrogen-donating and metal-chelating capacities of TA (Gulçin et al. 2010). It is also possible to relate this effect in the kidney to a study carried out by Akomolafe et al. (2014), showing that TA protected the kidneys from nephrotoxicity and histological damage induced by cisplatin, a potent anticarcinogenic drug, the adverse effects of which are primarily caused by oxidative stress (Akomolafe et al. 2014).

Results obtained for the serum demonstrated that administration of the amino acids Met/MetO led to an increase in ROS levels without modifying the nitrite levels or the sulfhydryl content, and were further able to decrease CAT

and SOD activities. These changes in serum oxidative status can lead to platelet dysfunction and thromboregulatory alterations (Soares et al. 2018). Additionally, other studies have reported the following observations in response to administration of Met and/or MetO: purinergic and inflammatory alterations in lymphocytes from Wistar rats (Soares et al. 2018); changes in the purinergic system, inflammatory and oxidative profile of macrophages *in vitro* (dos Santos et al. 2017); and modification of the phenotypic, purinergic, and redox profiles of macrophages from Swiss mice (Franceschi et al. 2020). Pretreatment with TA did not prevent the increase in ROS, but it was effective in preventing the decrease in both SOD and CAT activities. Besides, TA has been portrayed in the literature as a potent anti-inflammatory agent, especially by regulating the exacerbated activity of macrophages by blocking the transcription factor NF- $\kappa$ B (Song et al. 2018; Wu et al. 2019).

It is important to emphasize that this is the first study to assess the potential protective effect of TA, a polyphenol compound, against oxidative and nitrosative damage caused by hypermethioninemia. Based on the results obtained, it can be concluded that TA has become a promising therapeutic alternative for treatment of hypermethioninemia, since it could prevent important changes characteristic of this pathological condition in several organs of the organism tested. In addition, with data from already published literature pointing towards anti-inflammatory effects of TA, combined with the fact that inflammation is involved in the pathophysiology of hypermethioninemia, our results support future studies aimed at investigating the mechanisms involved in the protective effects of TA against hypermethioninemia.

**Acknowledgments** This research was supported by the CNPq (454262/2014-0) and FAPERGS. This study was financed in part by CAPES—Finance code 001.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Ethical approval** The use of the animals was in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA), National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil under protocol number: CEEA 38255-2019.

## References

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Akomolafe SF, Akinyemi AJ, Anadozie SO (2014) Phenolic acids (gallic and tannic acids) modulate antioxidant status and cisplatin

- hyperhomocysteinemia. *Thromb Res* 126:e379–e382. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.08.013>
- Malinowska J, Olas B (2011) Response of blood platelets to resveratrol during a model of hyperhomocysteinemia. *Platelets* 22:277–283. <https://doi.org/10.3109/09537104.2010.550349>
- Malinowska J, Oleszek W, Stochmal A, Olas B (2013) The polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds impair changes in the platelet adhesion and aggregation induced by a model of hyperhomocysteinemia. *Eur J Nutr* 52:1049–1057. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0411-8>
- Marcão A, Couce ML, Nogueira C, Fonseca H, Ferreira F, Fraga JM, Bóveda MD, Vilarinho L (2015) Newborn screening for homocystinuria revealed a high frequency of MAT I/III deficiency in Iberian Peninsula. *JIMD Rep* 20:113–120. [https://doi.org/10.1007/8904\\_2014\\_400](https://doi.org/10.1007/8904_2014_400)
- Martínez Y, Li X, Liu G, Bin P, Yan W, Más D, Valdiviév M, Hu CA, Ren W, Yin Y (2017) The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids* 49:2091–2098. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2494-2>
- Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataullakhanov FI (2010) The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim Biophys Acta* 1804:89–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.004>
- Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC (2008) Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr* 28:273–293
- 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
- Mori T, Rezai-Zadeh K, Koyama N, Arendash GW, Yamaguchi H, Kakuda N, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town T (2012) Tannic acid is a natural  $\beta$ -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. *J Biol Chem* 287:6912–6927. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294025>
- Mudd SH (2011) Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: a review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157:3–32. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30293>
- Noll C, Dairou J, Ripoll C (2011) Effect of red wine polyphenol dietary supplementation on two phase II enzymes in liver of hyperhomocysteinemic mice. *Food Chem* 49:1764–1769. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.024>
- Schweinberger BM, Wyse ATS (2016) Mechanistic basis of hypermethioninemia. *Amino Acids* 48:2479–2489. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2302-4>
- 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase expression/ content in brain of rat offspring. *Mol Neurobiol* 55:980–988. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0383-z>
- Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F (2009) Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res* 53:S310–S329. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900039>
- Soares MSP, Oliveira PS, Debom GN, Mattos BS, Polachini CR, Baldissareli J, Morsch VM, Schetinger MRC, Tavares RG, Stefanello FM, Spanevello RM (2017) 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. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2340-y>
- Soares MSP, Viau CM, Saffi J, Costa MZ, Silva TM, Oliveira PS, Azambuja JH, Barschak AG, Braganhol E, Wyse ATS, Spanevello RM, Stefanello FM (2017) Acute administration of methionine and/or methionine sulfoxide impairs redox status and induces apoptosis in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 32:1693–1703. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0054-9>
- Soares MSP, Costa MZ, da Silva TM, Gazal M, do Couto CAT, Debom GN, Rodrigues R, Azambuja JH, Cásali 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. <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0815-4>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jcb.27554>
- Soares MSP, Mattos BS, Souza AA, Spohr L, Tavares RG, Siebert C, Moreira DS, Wyse ATS, Carvalho FB, Rahmeir F, Fernandes MC, Stefanello FM, Spanevello RM (2020) Hypermethioninemia induces memory deficits and morphological changes in hippocampus of young rats: implications on pathogenesis. *Amino Acids* 52:371–385. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02814-2>
- Song D, Zhao J, Deng W, Liao Y, Hong X, Hou J (2018) Tannic acid inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production via blocking NF- $\kappa$ B signaling in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 503:3078–3085. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.096>
- Stefanello FM, Chiarani F, Kurek AG, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT (2005) Methionine alters Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 23:651–656. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2005.06.003>
- Stefanello FM, Monteiro SC, Matté C, Scherer EB, Netto CA, Wyse AT (2007) Hypermethioninemia increases cerebral acetylcholinesterase activity and impairs memory in rats. *Neurochem Res* 32:1868–1874. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9464-0>
- Stefanello FM, Matté C, Scherer EB, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse ATS (2007) Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. *Neurosci Methods* 160:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.029>
- Stefanello FM, Matté C, Pederzoli CD, Kolling J, Mescka CP, Lamers ML, de Assis AM, Perry ML, Santos MF, Dutra-Filho CS, Wyse ATS (2009) Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. *Biochimie* 91:961–968. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.04.018>
- Stefanello FM, Ferreira AG, Pereira TC, Cunha MJ, Bonan CD, Bogo MR, Wyse ATS (2011) Acute and chronic hypermethioninemia alter Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. *Int J Dev Neurosci* 29:483–488. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.02.001>
- 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. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1543>
- Tüzmen MN, Yücel NC, Kalburcu T, Demiryas N (2015) Effects of curcumin and tannic acid on the aluminum- and lead-induced oxidative neurotoxicity and alterations in NMDA receptors. *Toxicol Mech Methods* 25:120–127. <https://doi.org/10.3109/15376516.2014.997947>
- Veal E, Jackson T, Latimer H (2018) Role/s of ‘antioxidant’ enzymes in ageing. *Subcell Biochem* 90:425–450. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0_14)
- Wu Y, Zhong L, Yu Z, Qi J (2019) Anti-neuroinflammatory effects of tannic acid against lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells via inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *Drug Dev Res* 80:262–268. <https://doi.org/10.1002/ddr.21490>
- Ye MH, Nan YL, Ding MM, Hu J, Liu Q, Wei W, Yang S (2016) Effects of dietary tannic acid on the growth, hepatic gene expression, and antioxidant enzyme activity in Brandt’s voles (*Microtus brandti*).

## 5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que a administração de Met e/ou MetO altera vários sistemas biológicos importantes para a manutenção da homeostase celular e tecidual, especialmente associados ao estado redox no cérebro, fígado, rim, soro, plaquetas e astrócitos (STEFANELLO et al., 2005, 2011; SOARES et al., 2016, 2017a, 2017b, 2018, 2019;). Dessa

forma, no presente estudo avaliou-se o efeito do tratamento com AT na proteção contra o dano oxidativo e nitrosativo em animais submetidos ao modelo agudo de hipermetioninemia descrito previamente (STEFANELLO et al., 2007b; COSTA et al., 2013; SOARES et al., 2019). O AT foi utilizado como agente preventivo por ser um polifenol com extensa capacidade antioxidante e neuroprotetora evidenciada na literatura (GERZSON et al., 2019, 2020; BONA et al., 2019; LUDUVICO et al., 2020).

Nossos resultados demonstraram que no grupo que recebeu a associação de Met + MetO, houve um aumento nos níveis de EROS, TBARS e nitrito, além da diminuição nas atividades das enzimas CAT e GPx em todas as estruturas cerebrais testadas (córtex cerebral, hipocampo e estriado), bem como diminuição no conteúdo de sulfidril e na atividade da SOD em hipocampo. Esses achados confirmam o dano potencial que a Met e a MetO pode ocasionar no cérebro, diminuindo as defesas antioxidantes e aumentando as espécies reativas, caracterizando um quadro de estresse oxidativo. Ademais, Soares e colaboradores demonstraram previamente que esses aminoácidos causam dano ao DNA, peroxidação lipídica no cérebro e iniciam a apoptose pela ativação das caspases 3 e 9 (SOARES et al., 2017b). Uma explicação para o estresse oxidativo na hipermetioninemia se deve ao fato de que a MetO se encontra livre no plasma sanguíneo, e a enzima metionina sulfóxido redutase tem uma especificidade muito menor para MetO livre em comparação à MetO ligada à proteína, o que tornaria mais difícil sua redução a Met, possivelmente aumentando a formação de espécies reativas (LEE et al., 2009). Por outro lado, o pré-tratamento com AT foi eficaz na proteção contra o dano oxidativo nas estruturas cerebrais causado pela administração de Met + MetO. Ao analisar os parâmetros oxidativos no grupo AT + Met+MetO, foi possível verificar que o AT evitou o aumento de EROS e nitritos, bem como a diminuição da atividade da

SOD, CAT e GPx. É importante mencionar que o AT é capaz de impedir a reação de Fenton, conjugando-se com íons metálicos e evitando que esses reajam com o peróxido de hidrogênio, interrompendo a geração do radical hidroxila que é extremamente prejudicial à membrana celular e outras biomoléculas (BASU et al, 2018).

Outro ponto interessante de ser comentado é o fato do AT ser metabolizado em taninos absorvíveis de peso molecular muito inferior, como o ácido gálico, os quais podem atravessar a barreira hematoencefálica, exercendo sua atividade biológica no cérebro (MORI et al., 2012). Além disso, vários estudos mostraram os efeitos benéficos do AT nesse órgão. Já foi demonstrado que o AT apresenta atividade antitumoral e inibi o crescimento de células tumorais em um modelo pré-clínico de glioblastoma multiforme (BONA et al, 2019). Outra pesquisa realizada por GERZSON et al. (2019) demonstrou que o AT preveniu o estresse oxidativo cerebral e também o comprometimento da memória em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer induzida por estreptozotocina. Mais recentemente, LUDUVICO et al. (2020) demonstraram que o AT exerceu efeito tipo-antidepressivo em um modelo animal de depressão induzido por lipopolissacarídeo (LUDUVICO et al, 2020).

Também analisamos o efeito de Met + MetO no fígado e rim. Estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que após a administração de Met e/ou MetO ocorrem alterações oxidativas e morfológicas nesses órgãos (STEFANELLO et al., 2009; COSTA et al., 2013; SOARES et al., 2016;). Quanto aos resultados observados no fígado, a administração concomitante de Met + MetO diminuiu os níveis de EROS, o que pode estar associado com a redução da atividade da CAT e GPx. Além disso, houve um aumento nos níveis totais de tióis no grupo Met+MetO, contribuindo, possivelmente, para uma redução nos níveis de EROS observados nesse mesmo grupo, uma vez que os grupamentos tióis possuem uma importante capacidade antioxidante, e ainda a diminuição desses grupos está relacionada com a alteração da estrutura tridimensional de proteínas (AGAN et al., 2019).

Ressalta-se que esses resultados estão de acordo com o estudo de COSTA et al. (2013), no qual foram analisados os efeitos oxidativos, *in vitro* e *in vivo*, da exposição de Met e/ou MetO em um protocolo de hipermetioninemia aguda (COSTA et al., 2013). Por outro lado, a administração crônica de Met e/ou

MetO alterou a morfologia das células hepáticas, além de induzir dano oxidativo no fígado de ratos jovens (STEFANELLO et al., 2009; SOARES et al., 2016).

Em relação ao pré-tratamento do AT, esse composto foi capaz de prevenir apenas a redução da atividade da CAT. No entanto, alguns estudos já demonstraram seus efeitos benéficos no fígado, protegendo esse órgão contra a fibrose induzida por tetracloreto de carbono (CHU et al., 2016), protegendo da cirrose não alcoólica em modelos *in vivo* e *in vitro* (CHUNG et al., 2019) e também aumentando a expressão de genes hepáticos ligados a melhor absorção de ferro e diminuindo a expressão de genes ligados ao aumento do colesterol em modelo animal (YE et al., 2016).

No rim observou-se um aumento dos níveis de EROS e TBARS, acompanhado da redução do conteúdo total de sulfidrilas após a administração de Met e MetO. O aumento de EROS pode estar relacionado com a peroxidação lipídica, além de haver a possibilidade de danos aos tecidos renais. Já a redução do conteúdo de sulfidrilas pode ser associada com a oxidação de grupamentos -SH, resultando na alteração conformacional de proteínas de membrana (DAVIES, 2005; YIN et al., 2011). Concomitantemente a isso, houve redução na atividade das enzimas SOD, CAT e GST. A SOD tem a capacidade de converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, a CAT transforma o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água e, finalmente a GST tem a capacidade de neutralizar agentes xenobióticos por meio de ataques nucleofílicos (VEAL et al., 2018). As modificações descritas acima podem levar a um aumento na produção de EROS, como o radical superóxido e o radical hidroxila, causando uma diversidade de distúrbios, como disfunção endotelial e aterosclerose, além de doença crônica renal, que são consequências de estresse oxidativo severo nos rins (OKAMURA et al., 2015). No entanto, o grupo que recebeu a administração de AT + Met + MetO ficou protegido da maioria das alterações causadas pelos aminoácidos, evitando o aumento dos níveis de EROS, a redução do teor de sulfidrilas total e a diminuição da SOD, CAT e GST. Assim, é possível inferir que esse efeito esteja relacionado à capacidade doador de hidrogênio e quelante de metais do AT (GULÇIN et al., 2010).

Os resultados relacionados ao soro demonstraram que a administração dos aminoácidos aumentou os níveis de EROS, sem modificar os níveis de nitrito

ou o conteúdo de sulfidrina, e foram capazes de diminuir as atividades da CAT e SOD. Essas mudanças no estado oxidativo sérico podem levar à disfunção plaquetária e alterações tromborregulatórias (SOARES et al., 2018). Além disso, outros estudos relataram que após a administração de Met e/ou MetO os seguintes efeitos foram observados: alterações purinérgicas e inflamatórias em linfócitos de ratos *Wistar* (SOARES et al., 2017a); alterações no sistema purinérgico, perfil inflamatório e oxidativo de macrófagos *in vitro* (DOS SANTOS et al., 2016); e modificação *in vivo* do perfil fenotípico, purinérgico e redox de macrófagos de camundongos *Swiss* (FRANCESCHI et al., 2020). Mesmo que o pré-tratamento com AT não tenha sido capaz de prevenir o aumento de EROS, foi eficaz em prevenir a diminuição da atividade tanto da SOD quanto da CAT.

Além disso, o AT tem sido relatado na literatura como um potente agente anti-inflamatório, regulando especialmente a atividade exacerbada de macrófagos por meio do bloqueio do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (SONG et al., 2018; WU et al., 2019).

## 6. PERSPECTIVAS

Nosso grupo tem como objetivo realizar estudos visando a utilização de um modelo animal de hipermetioninemia crônica, onde os animais serão previamente tratados com Met + MetO por 21 dias, e após esse período receberão AT. Subsequentemente, serão quantificados os níveis de Met e homocisteína, avaliados parâmetros comportamentais, analisados os sistemas purinérgico e colinérgico, e assim, espera-se ter uma visão mais ampla dos efeitos desse polifenol na hipermetioninemia.

## 7. CONCLUSÃO

Através do presente estudo foi possível observar as alterações no *status* redox em animais após a administração aguda de Met e MetO. Por outro lado, o pré-tratamento com AT foi capaz de prevenir a maior parte dessas alterações.

É importante enfatizar que este é o primeiro estudo que avaliou o potencial efeito protetor do AT contra danos oxidativos e nitrosativos causados pela hipermetioninemia. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o AT pode ser uma promissora alternativa terapêutica para o manejo clínico de pacientes hipermetioninêmicos, uma vez que foi capaz de prevenir alterações características dessa condição patológica em vários órgãos.

Além disso, com dados da literatura já publicados apontando para os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do AT, combinado ao fato de que a inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos na fisiopatologia de hipermetioninemia, nossos resultados servem de suporte para que sejam realizados futuros estudos com o objetivo de investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores do AT na hipermetioninemia.

## 8. REFERÊNCIAS

AGAN, V. et al. An Investigation of Oxidative Stress and Thiol/Disulphide Homeostasis in Graves' Disease. **Medicina (Kaunas)**, v. 55, n. 6, p. 275, 2019.

ATKINSON, H.J. BABBITT P.C. Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11108-16, 2009.

BANNICK, A. et al. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: Long-term follow-up and treatment of 3 adult siblings. **European Journal of Medical Genetics**, v. 63, n. 12, p. 104076, 2020.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASU, T. et al. A natural antioxidant, tannic acid mitigates iron-overload induced hepatotoxicity in Swiss albino mice through ROS regulation. **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 603-618, 2018.

BERRÍO VALENCIA, M. I. et al. Anesthetic complications in patients with inborn errors of metabolism undergoing non-cardiac surgery. **Colombian Journal of Anesthesiology**, v. 41, n. 4, p. 257–260, 2013.

BONA, N.P. et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Metabolic Brain Diseases**, v. 35, n. 2, p. 283-293, 2019.

CAMPBELL, K. et al. Methionine metabolism alters oxidative stress resistance via the pentose phosphate pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 24, n. 0, p. 543–547, 2016.

CHAE, H.Z. et al. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 45, p. 101–112, 1999.

CHANDRASEKHAR, Y et al. Antidepressant like effects of hydrolysable tannins of Terminalia catappa leaf extract via modulation of hippocampal plasticity and regulation of monoamine neurotransmitters subjected to chronic mild stress (CMS). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 414-425, 2017.

CHATURVEDI, S. et al. Exploiting methionine restriction for cancer treatment. **Biochemical Pharmacology**, v. 154, p. 170-173, 2018.

CHEN, Z. et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 271-81, 2014.

CHIANG, P.K. et al. S-Adenosylmethionine and methylation. **The FASEB Journal**, v. 10, p. 471–480, 1996.

CHIEN, Y.H. et al. Spectrum of hypermethioninemia in neonatal screening. **Early Human Development**, v. 81, n. 6, p. 529-33, 2004.

CHU, X. et al. Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in vivo and in vitro. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 130, p. 15–23, 2016.

CHUNG, K.T. et al. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CHUNG, M.Y. et al. Tannic acid, a novel histone acetyltransferase inhibitor, prevents non-alcoholic fatty liver disease both in vivo and in vitro model. **Molecular Metabolism**, v. 19, p. 34–48, 2019.

COSTA, M.Z. et al. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 384, p. 21–28, 2013.

COUCE, M.L. et al. Clinical and metabolic findings in patients with methionine adenosyltransferase I/III deficiency detected by newborn screening. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 110, n. 3, p. 218-221, 2013.

DAI, D.F. et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. **Circulation**, v. 119, p. 2789 –2797, 2009.

DAMASCENO, D.C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabetes. **Diabetes Clínica**, v.5, n.5, p.355-361, 2002.

DARVIN, P. et al. Tannic acid inhibits EGFR/STAT1/3 and enhances p38/STAT1 signalling axis in breast cancer cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 4. p. 720-734, 2017.

DAVIES, M.J. The oxidative environment and protein damage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1703, p. 93–109, 2005.

DONG, G et al. Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, v. 32, n. 18, p. 2225-2228, 2018.

EL-HATTAB, A.W. et al. Inborn Errors of Metabolism. **Clinical Perinatology**, v. 42, n. 2, p. 413-439, 2015.

FRANCESCHI, T.S. et al. Characterization of macrophage phenotype, redox, and purinergic response upon chronic treatment with methionine and methionine sulfoxide in mice. **Amino Acids**, v. 52, p. 629–638, 2020.

FERREIRA, A.L.A. et al. 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 C.R. et al. Inborn errors of metabolism. **The Handbook of Clinical Neurology**, v. 162, p. 449-481, 2019.

GAHL, W.A. et al.. Hepatic methionine adenosyltransferase deficiency in a 31-year-old man. **American Journal of Human Genetics**, v. 40, n. 1, p. 39-49, 1987.

GARLICK, P.J. et al. Toxicity of methionine in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1722S-1725S, 2006.

GERZSON, M.F.B. et al. Effects of tannic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's Disease: insights into memory, redox status, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and acetylcholinesterase activity. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 9, p. 1-8, 2019.

GERZSON, M.F.B. et al. Tannic acid ameliorates STZ-induced Alzheimer's disease-like impairment of memory, neuroinflammation, neuronal death and modulates Akt expression. **Neurotoxicology Research**, v. 37, p. 1009–1017, 2020.

GIUGLIANI, R.; VAIRO, F. P.; RIEGEL, M. Rare disease landscape in Brazil: Report of a successful experience in inborn errors of metabolism. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2016.

GONÇALVES, R. et al. Mechanisms of tannin-induced trypsin inhibition: a molecular approach. **Langmuir**, v. 27, n. 21, p. 13122-9, 2011.

GONÇALVES, R. et al. Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by condensed tannins. **Food Chemistry**, v. 125, p. 665-672, 2011.

GRANDISON, R.C.; PIPER M.D.; PARTRIDGE L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. **Nature**, v. 462, p. 7276, p. 1061-4, 2009.

GÜLÇİN, I. et al. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, p. 1, p. 43-53, 2010.

HANCOCK, V. et al. Dietary plant components ellagic acid and tannic acid inhibit *Escherichia coli* biofilm formation. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 496-498, 2010.

SIES, H. (Ed.), Oxidative Stress, **Academic Press**, London, pp. 1–507, 1985.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 9, p. 509-15, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-50, 2007.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, v. 401, n.1, p. 1–11, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-65, 2012.

HWANG, O. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Experimental Neurobiology**, v. 22, n. 1, p. 11, 2013.

JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, S. et al. Oxidative stress and antioxidant parameters in patients with major depressive disorder compared to healthy controls before and after antidepressant treatment: results from a meta-analysis. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 76, n. 12, p. 1658-67, 2015.

KATOOR, A.J. et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 11, p. 42, 2017.

KING, A. et al. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association** v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KOLODNY, E.H; CABLE W.J. Inborn errors of metabolism. **Annals of Neurology**, v. 3, p. 221-232, 1982.

KUMAR, A. et al. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. **Nutrition and Metabolism**, v. 74, p. 14, 2017.

KUMARI & JAIN. Tannin: An Antinutrient with Positive Effect to Manage Diabetes. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. 12, p. 1-8, 2012.

LEE, B.C.; KAYA A.; GLADYSHEV V.N. et al. Methionine restriction and life-span control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1363, p. 116-24, 2016.

LEI, X.G. et al. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 307-64, 2016.

LIM J.M.; KIM G.; LEVINE R.L. et al. Methionine in Proteins: It's Not Just for Protein Initiation Anymore. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 1, p. 247-257, 2019.

LILA, M. A. et al. From beans to berries and beyond: Teamwork between plant chemicals for protection of optimal human health. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1114, p. 372–380, 2007.

LIU, J. et al. Reactive Oxygen Species Modulation of Na/K-ATPase Regulates Fibrosis and Renal Proximal Tubular Sodium Handling, **International Journal of Nephrology**, v. 2012, p. 381320, 2012.

LOWE, F. et al. Biomarkers of oxidative stress. In: Laher I (ed) Systems biology of free radicals and antioxidants. **Springer**, v. 2, n. 3, p. 65–87, 2014.

LU, J.; HOLMGREN A. et al. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75– 87, 2014.

LU, Z. et al. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v. 48, n. 4, p. 263-74, 2006.

LUC, K. et al. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 70, p. 6, 2020.

LUDUVICO, K.P. et al. Antidepressant effect and modulation of the redox system mediated by tannic acid on lipopolysaccharide-induced depressive and inflammatory changes in mice, **Neurochemical Research**, v. 45, p. 2032–2043, 2020.

MANSOORI, B. et al. The effect of tannic acid and polyethylene glycol on the absorption capacity of chicken intestine for d-xylose and  $\beta$ -carotene. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 1, p. 47-51, 2012.

MARKHAM, G.D. et al. Structure-function relationships in methionine adenosyltransferases. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 66, n. 4, p. 636-648, 2009.

MARTINS, E. et al. 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.

MATÉS, J.M. et al. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MATO, J.M. et al. S-adenosylmethionine metabolism and liver disease. **Annals in Hepatology**, v. 12, n. 3, p. 183-189, 2013.

MONTEIRO, J.M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MEDIC-SARIC, M. et al. From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. **Nutrition Journal**, v. 8, p. 33, 2009.

MORI, T. et al. Tannic acid is a natural  $\beta$ -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 612–692, 2012.

MUCCILLI, V. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition and antioxidant activity of an oenological commercial tannin. Extraction, fractionation and analysis by HPLC/ESI-MS/MS and (1)H NMR. **Food Chemistry**, v. 215, p. 50-60, 2017.

MUDD, S. H. et al. Isolated persistent hypermethioninemia. **American Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 882–892, 1995.

MUDD, S.H. et al. Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. **Metabolism**, v. 49, n. 12, p. 1542-7, 2000.

MUDD, S.H. et al. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: a review. **American Journal of Medical Genetics**, v. 157, n. 1, p. 3-32, 2011.

MUKANGANYAMA, S. et al. The evaluation of novel natural products as inhibitors of human glutathione transferase P1-1, **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, n.4, p. 460-7, 2011.

NASHABAT, M. et al. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: beyond the central nervous system manifestations. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v. 2, n. 14, p. 225-229, 2018.

NAUS, P.J. et al. Tannic acid synergizes the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human cholangiocarcinoma by modulating drug efflux pathways. **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 222-229, 2007.

OKOMURA, D.M.; PENNATHUR, S. The balance of powers: Redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. **Redox Biology**, v. 6, p. 495-504, 2015.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2191–2217, 2011.

OLEJAR, K.J. et al. Enhanced antioxidant activity of polyolefin films integrated with grape tannins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 8, p. 2825-31, 2016.

ONO, N.N. et al. Two UGT84 Family Glycosyltransferases Catalyze a Critical Reaction of Hydrolyzable Tannin Biosynthesis in Pomegranate (*Punica granatum*). **PLoS One**, v. 11, p. 5, 2016.

PHIWCHAI, I. et al. Tannic acid (TA): A molecular tool for chelating and imaging labile iron. **European Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 64-73, 2018.

PLAZA, M. et al.. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: a pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185–197, 2016.

QA'DAN, F. et al. Proanthocyanidins from *Ginkgo biloba* leaf extract and their radical scavenging activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 5, p. 471-6, 2011.

RAUF, A. et al. Proanthocyanidins: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, p. 108999, 2019.

SARWAR GILANI G. et al. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. **British Journal of Nutrition**. v. 108, n. 2, p. S315-32, 2012.

SAUDUBRAY, J. M., & GARCIA-CAZORLA, À. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. **Pediatric Clinics of North America**, v. 65, n. 2, p. 179–208, 2018.

SCATURRO, G. et al. Newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: past, present and future. **Medical and Surgical Pediatrics**, v. 35, n. 3, p. 105–109, 2013.

SCHWEINBERGER BM, WYSE AT. Mechanistic basis of hypermethioninemia. **Amino Acids**, v. 48, n. 11, p. 2479-2489, 2016.

SCRIVER, C. R. et al. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 8ed, 2001.

SELHUB, J et al. Homocysteine metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, p. 217-246, 1999.

SERRANO, J. ET AL. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 2, p. S310-29, 2019.

SIENIAWSKA, E.; & BAJ, T. Tannins. **Pharmacognosy**, 199–232, 2017.

SILVA, A.A.G.; CALDERON, R. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.

SOARES M.S.P. et al. 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, p. 129–138 2016

SOARES M.S.P. et al. 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, 2017.

SOARES, M.S.P. et al. 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.

SOARES, M.S.P. et al. 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**, v. 14, 2018.

SOARES M.S.P. et al. Methionine and methionine sulfoxide induces neurochemical and morphological changes in cultured astrocytes: Involvement

of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, oxidative status, and cholinergic and purinergic signaling. **Neurotoxicology**, v. 77, p. 60-70, 2019.

SOARES M.S.P. et al. Hypermethioninemia induces memory deficits and morphological changes in hippocampus of young rats: implications on pathogenesis. **Amino Acids**. v. 52, n. 3, p. 371-385, 2020.

SONG, D. et al. Tannic acid inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production via blocking NF- $\kappa$ B signaling in macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, p. 3078–3085, 2018.

SOSA TORRES, M.E. et al. The magic of dioxygen. **Metal Ions in Life Sciences**, v. 15, p. 1-12, 2015.

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. et al. Methionine alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 651-656, 2005.

STEFANELLO, F.M. et al. Hypermethioninemia increases cerebral acetylcholinesterase activity and impairs memory in rats. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 11, p. 1868-1874, 2007.

STEFANELLO, F.M. et al. 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, 2007.

STEFANELLO, F.M. et al. Effect of hypermethioninemia on some parameters on oxidative stress and on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus of rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 22, n. 2, p. 172-182, 2007.

STEFANELLO F.M. et al. Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. **Biochimie**. v. 91, n. 8, p. 961-8, 2009.

STEFANELLO F.M. et al. Acute and chronic hypermethioninemia alter Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 4, p. 483-8, 2011.

SURTEES, R. et al. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. **Lancet** **338**, p. 1550–1554, 1991.

TAMOKOU, J. D. D. et al. 2017. Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**, p. 207–237, 2017.

TEJADA, S. et al. Neuroprotective Effects of Ellagitannins: A Brief Review. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, 655n. 13, p.1518-1528, 2017.

TIAN, Y. et al. High molecular weight persimmon tannin is a potent antioxidant both. **Food Research International**, v. 45, p. 26–30, 2012.

TÜRKAN, F. et al. Tannic acid as a natural antioxidant compound: Discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer's disease. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 33, n.8, p. 2234, 2019.

VEAL, E. et al. Role/s of 'antioxidant' enzymes in ageing. **Subcellular Biochemistry**, v. 90, p. 425–450, 2018.

WANG, T. et al. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry in Suzhou, China: Disease Spectrum, Prevalence, Genetic Characteristics in a Chinese Population. **Frontiers in Genetics**, v. 29, n. 10, p. 1052, 2019.

WASIM, M. et al. Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. **Biochemical Genetics**, v. 56, n. 1–2, p. 7–21, 2018.

WATERS, D. et al. Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: A systematic analysis of the evidence. **Journal of Global Health**, v. 8, p. 2, 2018.

WU, Y. et al. Anti-neuroinflammatory effects of tannic acid against lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells via inhibition of NF- $\kappa$ B activation. **Drug Development Research**, v. 80, p. 262–268, 2019.

XU, Y. et al. Tannic acid attenuated irradiation-induced apoptosis in megakaryocytes. **Experimental Cell Research** v. 370, n. 2, p. 409-416, 2018.

YE, M. et al. Effects of dietary tannic acid on the growth, hepatic gene expression, and antioxidant enzyme activity in Brandt's voles (*Microtus brandti*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 196-197, p. 19–26, 2016.

YIN, H. et al. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5944–5972, 2011.

YIN, J. et al. Metabolic Regulation of Methionine Restriction in Diabetes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 10, p. 1700951, 2018.

ZHAO, S. et al. Antioxidant potential of polyphenols and tannins from burs of *Castanea mollissima* Blume. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8590-600, 2011.

ZHU, Y.; Xie, D.Y. Docking Characterization and in vitro Inhibitory Activity of Flavan-3-ols and Dimeric Proanthocyanidins Against the Main Protease Activity of SARS-Cov-2. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–14, 2020.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas

08/10/2019

SEI/UFPel - 0733076 - Parecer



**PARECER N°**  
**PROCESSO N°**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
**130/2019/CEEA/REITORIA**  
23110.038255/2019-11

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Papel protetor de compostos fenólicos sobre alterações bioquímicas observadas na hipermetioninemia: estudos *in vivo***”, registrada com o n° 23110.038255/2019-11, sob a responsabilidade de **Francieli Moro 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 n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 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 **07 de outubro de 2019**.

| Finalidade              | ( x ) Pesquisa      ( ) Ensino   |
|-------------------------|----------------------------------|
| Vigência da autorização | 01/11/2019 a 20/12/2021          |
| Espécie/linhagem/raça   | <i>Rattus norvegicus</i> /Wistar |
| N° de animais           | 288                              |
| Idade                   | 144 com 29 dias e 144 com 6 dias |
| Sexo                    | Machos e Fêmeas                  |
| Origem                  | Biotério Central - UFPel         |

Código para cadastro n° CEEA **38255-2019**

**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**

*Presidente da CEEA*

08/10/2019

SEI/UFPeI - 0733076 - Parecer



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 08/10/2019, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0733076** e o código CRC **2452FE44**.

Referência: Processo nº 23110.038255/2019-11

SEI nº 0733076

Anexo 2: Termo de consentimento da Revista *Amino Acids*.SPRINGER NATURE LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Mar 30, 2021

---

This Agreement between Universidade Federal de Pelotas -- Bernardo Meine ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

|                              |   |
|------------------------------|---|
| License Number               | 5038800621039   |
| License date                 | Mar 30, 2021  |
| Licensed Content Publisher   | Springer Nature   |
| Licensed Content Publication | Amino Acids   |
| Licensed Content Title       | Ameliorative effect of tannic acid on hypermethioninemia-induced oxidative and nitrosative damage in rats: biochemical-based evidences in liver, kidney, brain, and serum |
| Licensed Content Author      | Bernardo de Moraes Meine et al  |
| Licensed Content Date        | Nov 13, 2020  |
| Type of Use                  | Thesis/Dissertation   |
| Requestor type               | academic/university or research institute   |
| Format                       | print and electronic  |

|  |   |
|--|---|
| Portion                                | full article/chapter  |
| Will you be translating?               | yes, including original language  |
| Number of languages                    | 1   |
| Circulation/distribution               | 1 - 29  |
| Author of this Springer Nature content | yes   |
| Title                                  | Papel protetor do ácido tânico sobre alterações oxidativas observadas na hipermetioninemia aguda em ratos   |
| Institution name                       | Universidade Federal de Pelotas   |
| Expected presentation date             | Mar 2021  |
| Specific Languages                     | English, Portuguese   |
| Requestor Location                     | Universidade Federal de Pelotas<br>Rua Anchieta 45<br>4563<br>Casa 6<br>Pelotas, Rio Grande do Sul 96015-420<br>Brazil<br>Attn: Universidade Federal de Pelotas |
| Total                                  | 0.00 USD  |