



PAPEL NEUROPROTETOR DO ÁCIDO TÂNICO EM HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE HIPERMETIONINEMIA CRÔNICA: EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO

BERNARDO DE MORAES MEINE¹; NATÁLIA PONTES BONA²; GABRIELA TOLFO GUERRA³; FERNANDO LOPEZ ALVEZ⁴; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – bemeine15@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – nataliabona@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – gabrielatguerra@hotmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – fernando.lopez.alvez@hotmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A hipermetioninemia é uma aminoacidopatia que ocorre quando há um aumento tecidual e plasmático do aminoácido metionina (Met) e de seus metabólitos como a metionina sulfóxido (MetO) (MUDD, 2011). Alguns pacientes com hipermetioninemia podem desenvolver algumas alterações neurológicas, como déficit cognitivo, desmielinização cerebral e edema cerebral (MUDD, 2011). Ademais, o tratamento disponibilizado atualmente para hipermetioninemia é bastante limitado, e se resume a uma restrição dietética de Met durante a vida toda em conjunto com suplementação de S-adenosilmetionina (FURUJO et al, 2012). Sendo assim, a busca por alternativas terapêuticas para essa patologia é de grande relevância.

Nos últimos anos, o nosso grupo de pesquisa têm demonstrado diversas alterações que podem estar envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos da hipermetioninemia. Dentre os principais achados destaca-se o estresse oxidativo e o processo inflamatório tanto nos tecidos periféricos quanto no sistema nervoso central (STEFANELLO et al, 2005; SOARES et al, 2018).

Frente ao exposto, compostos isolados de produtos naturais que possuem comprovada atividade antioxidante e anti-inflamatória são alvos terapêuticos promissores para o tratamento de pacientes hipermetioninêmicos. Nesse contexto, ressalta-se o ácido tânico (AT), um polifenol hidrolisado derivado da uva, chás e café, que possui sua atividade extensamente descrita na literatura, onde é possível evidenciar sua extensa atividade neuroprotetora (GERZSON et al., 2020; LUDUVICO et al., 2020), antioxidante (MEINE et al., 2020) e anti-inflamatória (WU et al., 2019).

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor do AT frente às alterações em marcadores de estresse oxidativo e inflamação em hipocampo de ratos jovens submetidos ao protocolo experimental de hipermetioninemia crônica.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar de 6 dias obtidos do Biotério Central da UFPel, os quais foram mantidos em ambiente com temperatura (20-24°C) e umidade (40-60%) controladas, água e alimento *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 h.

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 38255-2019).

2.2 Modelo experimental de hipermetioninemia e tratamento com ácido tânico

Os ratos receberam a associação de Met 0,4 g/Kg e MetO 0,1 g/Kg (Mix) ou salina duas vezes ao dia por via subcutânea do 6º ao 28º dia de vida. Após esse período, os animais foram divididos em 4 grupos: grupo 1 (controle), grupo 2 (salina + AT 30 mg/kg), grupo 3 (Met 0,4 g/Kg e MetO 0,1 g/Kg + água) e grupo 4 (Met 0,4 g/Kg e MetO 0,1 g/Kg + AT 30 mg/kg). Os animais dos grupos 2 e 4 receberam AT, por via intragástrica, aos 28 dias de idade durante 7 dias, e no dia seguinte foram submetidos a eutanásia onde o hipocampo foi dissecado para as análises bioquímicas subsequentes.

2.3 Análise de marcadores de estresse oxidativo e inflamação

O hipocampo foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 140 mM de KCl (pH 7,4) e centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para avaliar os seguintes parâmetros: níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ALI et al., 1992), níveis de nitritos (STUEHR & NATHAN, 1989), níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER E CHEESEMAN, 1990), atividade da superóxido dismutase (SOD) (MISRA & FRIDOVICH, 1972) e nível de interleucina-6 (IL-6) (kit ELISA obtido da Sigma-Aldrich-RAB0311).

2.4 Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 estão demonstrados os resultados dos níveis de EROS e TBARS em hipocampo. Como pode-se observar, a administração de Met+MetO foi capaz de aumentar os níveis de EROS ($P<0,001$) e de TBARS ($P<0,05$) de forma significativa, no entanto o tratamento com AT protegeu contra o aumento de EROS ($P<0,01$) quanto de TBARS ($P<0,05$).

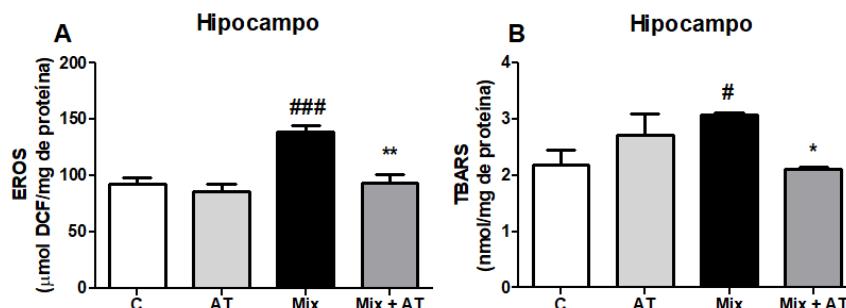


Figura 1: Efeito do tratamento com ácido tânico (AT) 30 mg/kg sobre os níveis de EROS (A) e TBARS (B) em hipocampo de ratos jovens submetidos ao modelo experimental de hipermetioninemia crônica. [#] $P<0,05$ diferente do grupo controle. ^{*} $P<0,05$; ^{**} $P<0,01$ diferente do grupo Mix (Met + MetO).

Na figura 2 estão demonstrados os resultados obtidos referentes à atividade da SOD e nível de IL-6 em hipocampo. A administração de Met+MetO diminuiu a

atividade da SOD ($P<0,05$) e aumentou os níveis de IL-6 ($P<0,01$), todavia o AT foi capaz de proteger contra o aumento dos níveis de IL-6 ($P<0,05$).

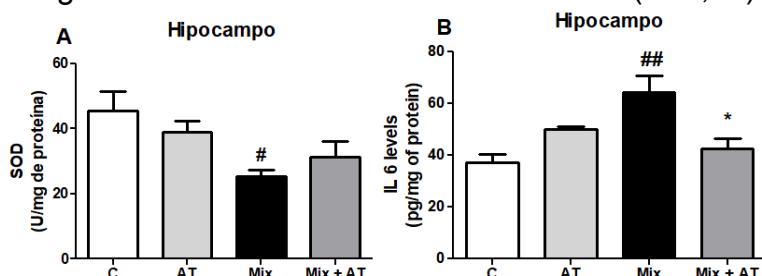


Figura 2: Efeito do tratamento com ácido tântico (AT) 30 mg/kg sobre a atividade da SOD (A) e níveis de IL-6 (B) em hipocampo de ratos jovens submetidos ao modelo experimental de hipermetioninemia crônica. # $P<0,05$ diferente do grupo controle. * $P<0,05$; ** $P<0,01$ diferente do grupo Mix (Met + MetO).

Experimentos previamente realizados pelo nosso grupo de pesquisa já demonstraram que a administração de Met e/ou MetO é capaz de induzir dano oxidativo em diversas estruturas cerebrais (SOARES et al., 2018,2020; STEFANELLO et al., 2005). Além disso, foram observadas alterações em marcadores de estresse oxidativo especificamente em hipocampo, tais como aumento de peroxidação lipídica, de EROS e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, o que pode ter levado a uma consequente perda de neurônios, alteração morfológica e na memória dos animais (STEFANELLO et al., 2005; SOARES et al., 2020).

Ademais, o AT já mostrou efeitos benéficos em um modelo de hipermetioninemia aguda, onde foi possível observar que o pré-tratamento com esse composto previnu alterações oxidativas em diversos órgãos dos ratos submetidos a esse protocolo (MEINE et al., 2020). Corroborando com nossos achados relacionados aos níveis de IL-6, uma citocina pró-inflamatória potente, Wu e colaboradores (2019) demonstraram que o AT foi capaz de exercer um efeito anti-neuroinflamatório em células microgliais BV2 induzidas com lipopolissacarídeo (WE et al., 2019). De maneira similar, SOYOCAK e colaboradores (2019) observaram um efeito anti-inflamatório do AT em modelos de edema de pata em ratos (SOYOCAK et al., 2019).

4. CONCLUSÕES

Com base no que foi apresentado, é possível concluir que o AT apresentou um efeito neuroprotetor frente às alterações de estresse oxidativo e pró-inflamatória induzidas em hipocampo pelo protocolo de hipermetioninemia. Dessa forma, o AT demonstrou ser um alvo promissor para o manejo clínico de pacientes hipermetioninêmicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S.F. et al. (1992). Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 13, 637-648.
- DE MORAES MEINE, B. et al (2020). Ameliorative effect of tannic acid on hypermethioninemia-induced oxidative and nitrosative damage in rats: biochemical-based evidences in liver, kidney, brain, and serum. *Amino Acids*, 52, 1545-1558.



- ESTERBAUER H, Cheeseman KH (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**. v. 186:407-421.
- FURUJO, M. et al. (2012). S-adenosylmethionine treatment in methionine adenosyltransferase deficiency, a case report. **Molecular Genetics and Metabolism**, 105, 516-518.
- GERZSON, M.F.B. et al. (2020). Tannic Acid Ameliorates STZ-Induced Alzheimer's Disease-Like Impairment of Memory, Neuroinflammation, Neuronal Death and Modulates Akt Expression. **Neurotoxicity Research**, 37, 1009-1017.
- LUDUVICO, K.P. et al. (2020). Antidepressant Effect and Modulation of the Redox System Mediated by Tannic Acid on Lipopolysaccharide-Induced Depressive and Inflammatory Changes in Mice. **Neurochemical Research**, 45, 2032-2043.
- MISRA HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, 247, 3170–3175.
- SOARES, M.S.P. et al. (2018). Acute administration of methionine and/or methionine sulfoxide impairs redox status and induces apoptosis in rat cerebral cortex. **Metabolic Brain Disease**, 32, 1693-1703.
- SOARES, M.S.P. et al. (2020). Hypermethioninemia induces memory deficits and morphological changes in hippocampus of young rats: implications on pathogenesis. **Amino Acids**, 52, 371-385.
- SOYOCAK, A. et al (2019). Tannic acid exhibits anti-inflammatory effects on formalin-induced paw edema model of inflammation in rats. **Human & Experimental Toxicology**, 38, 1296-1301.
- STEFANELLO, F.M. et al. (2005). Methionine alters Na^+,K^+ -ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 23, 651-656.
- STUEHR, D.J., NATHAN, C.F. (1989). Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cell. **Journal of Experimental Medicine**, 169, 1543-1555.
- WU, Y. et al. (2019) Anti-neuroinflammatory effects of tannic acid against lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells via inhibition of NF- κ B activation. **Drug Development Research**, 80, 262–268.