

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

**LARISSA DELMONEGO**

**PAPEL PROTETOR DO RESVERATROL SOBRE O DANO OXIDATIVO CEREBRAL  
EM RATOS CAUSADO PELA CITRULINEMIA TIPO I**

JOINVILLE – SC

2018

LARISSA DELMONEGO

**PAPEL PROTETOR DO RESVERATROL SOBRE O DANO OXIDATIVO CEREBRAL  
EM RATOS CAUSADO PELA CITRULINEMIA TIPO I**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville-UNIVILLE.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Delwing de Lima.

JOINVILLE – SC

2018

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Delmonego, Larissa  
D359p Papel protetor do resveratrol sobre o dano oxidativo cerebral em ratos causado pela citrulinemia tipo I/ Larissa Delmonego; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima. – Joinville: UNIVILLE, 2018.

91 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Estresse oxidativo. 2. Antioxidantes. 3. Resveratrol. 4. Citrulinemia.  
I. Lima, Daniela Delwing (orient.). II. Título.

CDD 615.1

**Termo de Aprovação**

**“Papel Protetor do Resveratrol sobre o dano Oxidativo Cerebral em Ratos causado pela Citrulinemia Tipo I”**

por

Larissa Delmonego

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dra. Daniela Delwing de Lima  
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

**Banca Examinadora:**



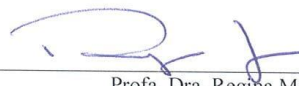
Prof. Dra. Daniela Delwing de Lima  
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Débora Delwing Dal Magro  
(FURB)



Prof. Dra. Samira Dal-Toé De Prá  
(UNISOCIESC)



Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern  
(UNIVILLE)

Joinville, 10 de dezembro de 2018

*Dedico esse trabalho primeiramente a minha família, meu namorado, meus colegas de trabalho e mestrado, minha orientadora e colegas de pesquisa pela constante ajuda, compreensão, incentivo e amor nessa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela oportunidade de alcançar mais uma realização na minha vida profissional, me ajudando a driblar as dificuldades com sabedoria e discernimento e me amparando nos momentos difíceis onde nada parecia dar certo.

Aos meus pais Marisa e Saul e meu irmão Vinícius, por sempre me incentivar, apoiar, e me instigar a seguir em frente em busca dos meus objetivos sem nunca medir esforços para que isso acontecesse. Muito obrigada! Serei eternamente grata a vocês.

Ao meu namorado Maykon, por me apoiar nessa jornada, sempre disposto a me ajudar e entender minhas ausências e cansaços. Muito obrigada pela compreensão, amor e carinho sempre dedicados a mim. Sem isso, esse trabalho não seria possível.

Também agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Daniela Delwing de Lima, pela dedicação, paciência, compreensão, apoio e incentivo nessa etapa. Você é um exemplo de profissional e me sinto lisonjeada pela oportunidade de ser sua orientanda. Irei levar comigo todos os ensinamentos aprendidos até aqui e espero um dia ser uma profissional tão boa quanto você. Muito obrigada!

Ao grupo de pesquisa da Univille: Karine, Thayná, Aline, Luana, Prof. Eduardo e demais colegas que participaram na realização desse trabalho, obrigada pelas noites a fio com o Shimadzu e por estarem sempre dispostos a ajudar. Vocês foram essenciais para a realização desse sonho!

A equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Dona Helena por compreender as minhas ausências, pelo apoio, e por contribuir para que esse sonho se tornasse realidade.

Aos meus colegas de mestrado pela troca de experiências, ensinamentos e noites divertidas de aula. Aprendi muito com vocês. Somos uma turma e tanto!

A todos os professores do mestrado pelos ensinamentos, e a todos aqueles que de alguma forma estiveram ao meu lado durante a execução deste trabalho.

Aos membros da banca, pelas contribuições.

À UNIVILLE.

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”*

Robert Collier

## RESUMO

A Citrulinemia Tipo I é um erro inato do metabolismo do Ciclo da Ureia, caracterizada pela deficiência na atividade da enzima arginino-succinato-sintetase, levando à depleção dos níveis séricos de arginina e ao acúmulo de citrulina e amônia no sangue e tecidos corpóreos. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da administração *in vitro* da citrulina e da amônia e a influência do antioxidante resveratrol sobre parâmetros de estresse oxidativo como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px) em córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos machos Wistar de 30 e 60 dias. Para os estudos *in vitro*, os ratos foram sacrificados por decapitação e a citrulina e a amônia foram adicionadas aos ensaios a fim de se obter as seguintes concentrações finais de citrulina (0,1, 2,5 e 5,0 mM) e de amônia (0,01, 0,1 e 1,0 mM), e para investigar a prevenção do estresse oxidativo, foram utilizadas concentrações de 0,01, 0,1 e 0,5 mM de resveratrol. Os resultados mostraram que nenhuma das concentrações de citrulina alterou o conteúdo total de sulfidrilas em cérebro de ratos de 30 e 60 dias, enquanto a amônia 0,1 e 1,0 mM reduziu o conteúdo total de sulfidrilas no córtex cerebral de ratos de 30 e 60 dias. A citrulina 2,5 e 5,0 mM aumentou TBA-RS em cerebelo de ratos de 30 dias e em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 60 dias, porém a amônia em nenhuma das concentrações alterou TBA-RS no cérebro de ratos de 30 e 60 dias. Os resultados mostraram também que a citrulina 5,0 mM aumentou a atividade da SOD e reduziu a atividade da GSH-Px em hipocampo de ratos de 30 dias, mas não alterou CAT, enquanto no cerebelo, aumentou GSH-Px, mas não alterou SOD e CAT. No córtex cerebral, citrulina 2,5 e 5,0 mM reduziram a atividade da GSH-Px. Em ratos de 60 dias, citrulina 2,5 e 5,0 mM aumentaram SOD em cerebelo, enquanto no córtex cerebral, aumentaram GSH-Px. Além disso, citrulina 5,0 mM reduziu CAT e aumentou SOD no córtex cerebral de ratos de 60 dias. A respeito da amônia, os resultados mostraram que nenhuma das concentrações utilizadas alterou a atividade da CAT, SOD e GSH-Px no hipocampo e córtex cerebral de ratos com 30 dias, enquanto no cerebelo, a concentração 1,0 mM aumentou SOD e reduziu GSH-Px. Amônia 1,0 mM também aumentou SOD em hipocampo e cerebelo de ratos de 60 dias, mas em nenhuma das concentrações utilizadas alterou a atividade das



enzimas antioxidantes no córtex cerebral de ratos de 60 dias. O resveratrol é um polifenol presente em muitas espécies vegetais, como nas uvas da espécie *Vitis vinifera*. Sua atividade antioxidante advém de sua capacidade de competição com a coenzima Q pelo sítio de formação de radicais livres, de neutralizar espécies reativas de oxigênio e em sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica. O resveratrol foi capaz de prevenir muitas das alterações causadas pela citrulina e pela amônia nos parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos, uma vez que preveniu muitas das alterações na atividade das enzimas antioxidantes, na lipoperoxidação e no conteúdo total de sulfidrilas. Por meio desse estudo, evidenciamos que a citrulina e a amônia levam a um quadro de estresse oxidativo e que o resveratrol possui capacidade antioxidante frente a essas substâncias.

**Palavras Chave:** Citrulinemia tipo I; Estresse oxidativo; Dano oxidativo; Antioxidantes; Resveratrol.

## ABSTRACT

Citrullinemia Type I is an inborn error of the Urea Cycle metabolism, characterized by deficiency in the activity of the arginine-succinate-synthetase enzyme, leading to depletion of serum arginine levels and accumulation of citrulline and ammonia in blood and body tissues. The objective of this study was to investigate the effects of the *in vitro* administration of citrulline and ammonia and the influence of the antioxidant resveratrol on oxidative stress parameters, such as thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content and the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30- and 60-day-old male Wistar rats. For *in vitro* studies, the animals were sacrificed by decapitation and citrulline and ammonia were added to the assays to obtain the final concentrations of citrulline (0.1, 2.5 and 5.0 mM) and ammonia (0.01, 0.1 and 1.0 mM), and to investigate the effects of resveratrol (0.01, 0.1 and 0.5 mM) on oxidative stress parameters altered by citrulline and ammonia. The results showed that none of the concentrations of citrulline altered the total sulfhydryl content in 30- and 60-day-old rats cerebrum, while ammonia 0.1 and 1.0 mM reduced the total sulfhydryl content in the cerebral cortex of 30- and 60-day-old rats. Citrulline 2.5 and 5.0 mM increased TBA-RS in the cerebellum of 30-day-old rats and in the cerebral cortex and cerebellum of 60-day-old rats, but ammonia at none of the concentrations altered TBA-RS in the cerebrum of 30- and 60-day-old rats. The results also showed that citrulline 5.0 mM increased SOD activity and reduced GSH-Px activity in the hippocampus of 30-day-old rats, but did not alter CAT, whereas in the cerebellum it increased GSH-Px, but did not alter SOD and CAT. In the cerebral cortex, citrulline 2.5 and 5.0 mM reduced GSH-Px activity. In 60-day-old rats, citrulline 2.5 and 5.0 mM increased SOD in the cerebellum, while in the cerebral cortex, increased GSH-Px. In addition, citrulline 5.0 mM reduced CAT and increased SOD in the cerebral cortex of 60-day-old rats. With regard to ammonia, results showed that none of the concentrations used altered the activities of CAT, SOD and GSH-Px in the hippocampus and cerebral cortex of 30-day-old rats, while in the cerebellum, 1.0 mM concentration increased SOD and reduced GSH-Px. Ammonia 1.0 mM also increased SOD in the hippocampus and cerebellum of 60-day-old rats, but none of the concentrations used altered the activities of antioxidant enzymes in the cerebral cortex

of 60-day-old rats. Resveratrol is a polyphenol present in many plant species, as in grapes of the species *Vitis vinifera*. Its antioxidant activity results from its ability to compete with coenzyme Q for the free radical formation site, to neutralize reactive oxygen species and its ability to inhibit lipid peroxidation. Resveratrol was able to prevent many of the changes caused by citrulline and ammonia in the oxidative stress parameters analysed in the rats cerebrum, since prevented many of the alterations on the antioxidant enzyme activities, lipoperoxidation and total sulfhydryl content. Through this study, we have shown that citrulline and ammonia lead to oxidative stress and that resveratrol has an antioxidant capacity against these substances.

**Keywords:** Citrullinemia type I; Oxidative stress; Oxidative damage; Antioxidants; Resveratrol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo da Ureia.....	24
Figura 2 – Formação de ERO .....	29
Figura 3 – Formação de OH· pela Reação de Fenton .....	30
Figura 4 – Formação de OH· pela Reação de Haber-Weiss .....	31
Figura 5 – Reações de Lipoperoxidação .....	33
Figura 6 – Reação de Ramificação .....	33
Figura 7 – Reação de Dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em $H_2O_2$ e $O_2$ .....	37
Figura 8 – Reação de decomposição do $H_2O_2$ em $H_2O$ e $O_2$ pela ação da CAT.....	38
Figura 9 – Catálise da dismutação do $H_2O_2$ em $H_2O$ e $O_2$ por meio da GSH-Px .....	39
Figura 10 – Divisão dos ensaios para realização dos experimentos <i>in vitro</i> com Citrulina e Amônia.....	44
Figura 11 – Divisão dos ensaios para realização dos experimentos <i>in vitro</i> de prevenção com Resveratrol.....	45

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Ações e mecanismos das principais substâncias antioxidantes.....	36
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASL: Arginino-succinase  
ASS: Arginino-succinato-sintetase  
CAT: Catalase  
CPS: Carbamoil-fosfato-sintetase I  
CTLN1: Citrulinemia Tipo I  
DCU: Distúrbios do metabolismo do Ciclo da Ureia  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico  
DTNB: Ácido Ditionitrobenzóico  
EIM: Erros Inatos do Metabolismo  
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio  
ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio  
GSH: Glutathiona  
GSH-Px: Glutathiona Peroxidase  
L·: Radical Lipídico  
LH: Ácido Graxo Poliinsaturado  
LOO·: Radical Peroxila  
LOOH: Hidroperóxidos  
MDA: Malondialdeído  
MIM: Mendelian Inheritance in Man  
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato  
NO·: Óxido Nítrico  
NOS: Óxido Nítrico Sintase  
O<sub>2</sub>: Oxigênio  
O<sub>2</sub> ·-: Radical Superóxido  
OH·: Radical Hidroxil  
ONOO·: Ânion Peroxinitrito  
OTC: Ornitina-transcarbamoilase  
RNA: Ácido Ribonucleico  
SOD: Superóxido Dismutase  
SOD-Cu-Zn: Superóxido Dismutase Cobre-Zinco

SOD-Mn: Superóxido Dismutase Manganês

TBA-RS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.2 OBJETIVO GERAL .....	21
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 REVISÃO</b> .....	<b>23</b>
3.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	23
3.2 CICLO DA UREIA .....	23
3.3 CITRULINEMIA TIPO I .....	25
3.4 RADICAIS LIVRES .....	27
3.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) .....	28
3.4.1.1 Radical Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	29
3.4.1.2 Radical Hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) .....	29
3.4.1.3 Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) .....	29
3.4.1.4 Radical Hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) .....	30
3.4.1.5 Oxigênio Singlet ( $^1O_2$ ) .....	31
3.4.2 Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) .....	31
3.5 ESTRESSE OXIDATIVO .....	32
3.6 MECANISMOS DE DANO ÀS MOLÉCULAS .....	32
3.6.1 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação .....	32
3.6.2 Danos às proteínas .....	34
3.6.3 Danos ao DNA .....	34
3.7 SISTEMAS DE DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	35
3.7.1 Sistema Enzimático .....	36
3.7.1.1 Superóxido Dismutase (SOD) .....	36
3.7.1.2 Catalase (CAT) .....	37
3.7.1.3 Glutationa Peroxidase (GSH-Px) e Glutationa (GSH) .....	38
3.7.2 Sistema Não-Enzimático .....	39
3.7.2.1 Ácido Ascórbico (Vitamina C) .....	39
3.7.2.2 Alfa Tocoferol (Vitamina E) .....	40



3.7.2.3 Retinol (Vitamina A) e carotenoides .....	40
3.7.2.4 Compostos Fenólicos e flavonoides .....	41
3.7.2.4.1 Resveratrol .....	41
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>43</b>
4.1 ANIMAIS.....	43
4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	43
4.2.1 Preparação do tecido .....	43
4.2.2 Experimentos <i>in vitro</i> com Citrulina e Amônia .....	44
4.2.3 Experimentos <i>in vitro</i> com Resveratrol .....	44
4.3 ESTUDOS BIOQUÍMICOS .....	45
4.3.1 Catalase (CAT).....	45
4.3.2 Superóxido Dismutase (SOD) .....	45
4.3.3 Glutationa Peroxidase (GSH-Px).....	46
4.3.4 Dosagem de Proteínas.....	46
4.3.5 Conteúdo Total de Sulfidrilas .....	47
4.3.6 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) .....	47
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>5 INTERDISCIPLINARIDADE.....</b>	<b>49</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>51</b>
6.1 ARTIGO: PROTECTIVE EFFECT OF RESVERATROL ON CITRULLINEMIA TYPE I-INDUCED BRAIN OXIDATIVE DAMAGE IN RATS .....	51
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Citrulinemia Tipo I (CTLN1) é uma doença de origem autossômica recessiva, classificada como um erro inato do metabolismo, que resulta na deficiência da atividade da enzima arginino-succinato-sintetase (ASS), responsável pela condensação da citrulina e aspartato em arginino-succinato (ARAÚJO, 2004; EL HUSNY; FERNANDES-CALDATO, 2006; KOSE *et al.*, 2017). Essa alteração na atividade da ASS leva à depleção dos níveis séricos de arginina e ao acúmulo de citrulina e amônia no sangue e tecidos corpóreos (HERRERA SANCHEZ *et al.*, 2017; PRESTES *et al.*, 2006; RAIMANN *et al.*, 1994). Recém-nascidos acometidos pela forma aguda apresentam hiperamonemia, letargia, vômitos, falta de apetite e sinais de aumento de pressão intracraniana, podendo progredir para aumento do tônus muscular, convulsões, coma e perda dos níveis de consciência, e conseqüentemente, morte (HERRERA SANCHEZ *et al.*, 2017; KOSE *et al.*, 2017; RUDER *et al.*, 2014).

Embora a fisiopatologia da CTLN1 ainda não seja bem esclarecida, acredita-se que ela esteja relacionada ao acúmulo de amônia no organismo, principalmente nas células cerebrais (PRESTES *et al.*, 2006). A relação entre toxicidade da amônia e a liberação de radicais livres ainda não está bem consolidada, mas alguns artigos já abordam esse tema. Em um estudo realizado por Kosenko e colaboradores (1997), verificou-se que a administração aguda de amônia em ratos adultos levou à redução na atividade de enzimas antioxidantes e em aumento na formação de radical superóxido no cérebro. Corroborando com o estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da citrulinemia, trabalhos indicam que esta também causa anormalidades metabólicas cerebrais, as quais incluem distúrbios no metabolismo cerebral energético, metabolismo de aminoácidos e no estado redox mitocondrial (CLANCY; CHUNG, 1991).

A produção de radicais livres é um processo fisiológico e constante que desempenha um importante papel metabólico, mas quando em desequilíbrio, seja pelo aumento na formação de radicais livres ou pela redução da atividade dos sistemas antioxidantes, é prejudicial ao organismo e leva a um quadro de estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011).

O estresse oxidativo provoca danos como peroxidação lipídica, danos oxidativos ao DNA e a proteínas, fazendo com que essas moléculas percam sua função biológica (BARBOSA *et al.*, 2010; SILVA; FERRARI, 2011). Este tem atraído à atenção da comunidade científica nas últimas décadas, uma vez que estudos indicam que este está envolvido no mecanismo de muitas doenças, incluindo câncer, aterosclerose, envelhecimento, diabetes tipo II e doenças neurodegenerativas, entre outras (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Além disso, o estresse oxidativo é comumente observado em alguns erros inatos do metabolismo intermediário, participando de sua fisiopatologia (COLOME; SIERRA; VILASECA, 2000; WAJNER *et al.*, 2001). Embora a causa do estresse oxidativo nestas doenças não esteja completamente compreendida, pode ocorrer devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos que levam à produção excessiva de radicais livres ou à depleção celular de defesas antioxidantes (ARTUCH *et al.*, 2004; VAN BACKEL *et al.*, 2000).

Os compostos fenólicos ou polifenóis são antioxidantes considerados interruptores de radicais livres, com papel importante na prevenção da peroxidação lipídica, por meio do sequestro e neutralização de radicais livres, da decomposição de peróxidos e quelação de metais (ACHKAR *et al.*, 2013; ANGELO; JORGE, 2007; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Um exemplo de antioxidante de origem fenólica é o resveratrol (ANGELO; JORGE, 2007). O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol presente em muitas espécies vegetais, principalmente na pele e nas sementes de uvas da espécie *Vitis vinifera* (BARROS *et al.*, 2017; GEDIK *et al.*, 2008; SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997; SU; HUNG; CHEN, 2006). Sua atividade antioxidante advém de sua capacidade de competição com a coenzima Q pelo sítio de formação de radicais livres, de neutralizar espécies reativas de oxigênio formadas nas mitocôndrias e em sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica resultante dos produtos da reação de Fenton (BARROS *et al.*, 2017).

De acordo com Su e colaboradores (2006), estudos têm reportado uma grande variedade de atividades farmacológicas e terapêuticas para o resveratrol. Além da capacidade antioxidante, o resveratrol demonstrou atividade antiplaquetária, estrogênica, vasodilatadora, antiinflamatória e anticancerígena (GEDIK *et al.*, 2008; SU; HUNG; CHEN, 2006).

Considerando que a citrulinemia é um erro inato do metabolismo causado por deficiência de uma enzima do Ciclo da Ureia, e que essa doença causa distúrbios neurológicos, que estudos sugerem que a citrulina e a amônia em excesso apresentam alguma associação com o estresse oxidativo e que o resveratrol possui potencial atividade antioxidante, esse estudo tem como objetivos verificar os efeitos *in vitro* da citrulina e da amônia e a influência do antioxidante resveratrol sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos de 30 e 60 dias de idade.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar os efeitos *in vitro* da citrulina e da amônia e a influência do antioxidante resveratrol sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos de 30 e 60 dias de idade.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 1) Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de citrulina (0,1, 2,5 e 5,0 mM) e de amônia (0,01, 0,1 e 1,0 mM) sobre a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e conteúdo total de sulfidrilas em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 e 60 dias de idade;
- 2) Avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de citrulina (0,1, 2,5 e 5,0 mM) e de amônia (0,01, 0,1 e 1,0 mM) sobre a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 e 60 dias de idade;
- 3) Investigar a influência do antioxidante resveratrol (0,01, 0,1 e 0,5 mM) sobre os efeitos *in vitro* da citrulina e da amônia sobre os níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 e 60 dias de idade.



## **3 REVISÃO**

### **3.1 Erros Inatos do Metabolismo**

De acordo com Scriver e colaboradores (2001), o termo Erros Inatos do Metabolismo (EIM) foi descrito pela primeira vez na literatura em 1908, quando o inglês Archibald Garrod publicou seu livro, no qual descrevia algumas doenças metabólicas e seus principais aspectos genéticos (EL HUSNY; FERNANDES-CALDATO, 2006). Os EIM são doenças caracterizadas por alterações genéticas, de origem autossômica recessiva, associadas geralmente a defeitos enzimáticos capazes de inibir, bloquear ou alterar rotas metabólicas (ARAÚJO, 2004; EL HUSNY; FERNANDES-CALDATO, 2006). Esse bloqueio enzimático pode levar a produção de substâncias tóxicas ou reduzir a disponibilidade de produtos essenciais para o bom funcionamento do organismo (AMÂNCIO; SCALCO; COELHO, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Foram identificados até agora apenas cerca de 500 EIM, os quais são doenças genéticas consideradas raras, mas quando computadas juntas, a incidência é de uma pessoa a cada 1 mil nascidos vivos (AMÂNCIO; SCALCO; COELHO, 2007; WAJNER *et al.*, 2001). Essas alterações genéticas podem ser classificadas em dois grandes grupos: 1) o grupo das moléculas pequenas, que abrangem as aminoacidopatias, acidemias orgânicas, intolerância à açúcares, entre outras; e 2) o grupo das moléculas grandes, no qual se encontram as doenças lisossômicas de depósito, peroxissomais, etc. (DIAMENT, 1974; WAJNER *et al.*, 2001).

Os EIM mais comumente descritos são as aminoacidopatias, sendo também um dos primeiros tipos de EIM descritos por Garrod em seus artigos (DIAMENT, 1974). Como exemplo de aminoacidopatia, pode-se citar os distúrbios do metabolismo do Ciclo da Ureia (DCU) (NADAI *et al.*, 2006).

### **3.2 Ciclo da Ureia**

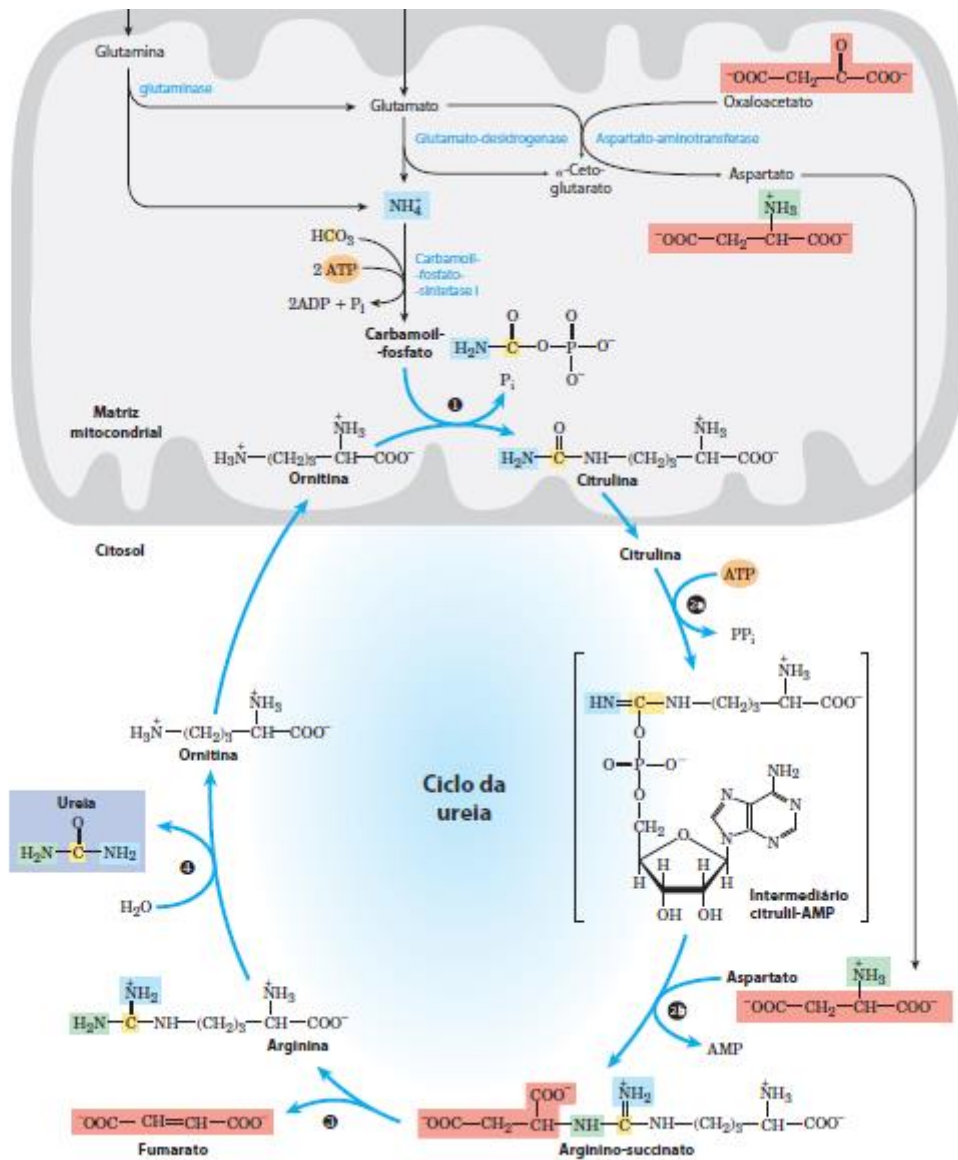
O Ciclo da Ureia é a única rota metabólica capaz de excretar o excesso de nitrogênio do organismo. Essa rota é de extrema importância, uma vez que ela converte o nitrogênio obtido pela ingestão de proteínas da dieta e produtos da



degradação das proteínas endógenas em ureia, um composto hidrossolúvel e facilmente secretado pelo organismo (MIAN; LEE, 2002).

A conversão de nitrogênio em ureia acontece no fígado, e para que o ciclo ocorra na sua totalidade, são necessárias 4 enzimas (Figura 1), as quais são: ornitina-transcarbamoilase (OTC), arginino-succinato-sintetase (ASS), arginino-succinase (ASL) e arginase (ROCHA *et al.*, 2009).

Figura 1 - Ciclo da Ureia



Legenda: 1) Reação catalisada pela ornitina-transcarbamoilase; 2a e 2b) Reação catalisada pela arginino-succinato-sintetase; 3) Reação catalisada pela arginino-succinase; 4) Reação catalisada pela arginase.

Fonte: Adaptado de NELSON; COX, 2013.

O déficit na atividade ou expressão de qualquer uma dessas enzimas leva à quadros clínicos chamados de Distúrbios do Metabolismo do Ciclo da Ureia (DCU) (MIAN; LEE, 2002; PARMEGGIANI; VARGAS, 2018; SCAGLIA *et al.*, 2004). Indivíduos acometidos por esses distúrbios apresentam como características clássicas os seguintes sintomas: hiperamonemia (devido à interrupção do Ciclo da Ureia), encefalopatia e alcalose respiratória (ROCHA *et al.*, 2009).

Dentre os distúrbios do metabolismo do Ciclo da Ureia, encontra-se a Citrulinemia Tipo I, a segunda doença mais comum do grupo, resultado da deficiência na atividade enzimática da ASS (CABRAL *et al.*, 2002).

### 3.3 Citrulinemia Tipo I

A Citrulinemia Tipo I (CTLN1; MIM 215700) é um EIM ocasionado pela deficiência na atividade da enzima arginino-succinato-sintetase (ASS; EC 6.3.4.5), atuante na segunda reação do Ciclo da Ureia e responsável pela condensação de citrulina e aspartato em arginino-succinato (HERRERA SANCHEZ *et al.*, 2017; KOSE *et al.*, 2017). É causada por mutações no gene da ASS no cromossomo 9q34.1, e essas mutações são encontradas em todos os tecidos e células que expressam ASS (CABRAL *et al.*, 2002; DIEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2016).

Descrita pela primeira vez em 1962, a CTLN1 leva a depleção dos níveis séricos de arginina e ao acúmulo de citrulina e amônia no sangue e nos tecidos corpóreos (HERRERA SANCHEZ *et al.*, 2017; PRESTES *et al.*, 2006; RAIMANN *et al.*, 1994). Por se tratar de uma doença de origem autossômica recessiva, possui uma incidência estimada de um indivíduo afetado a cada 57 mil nascidos vivos (RUDER *et al.*, 2014).

A CTLN1 se apresenta com um espectro clínico variado, sendo uma forma aguda que acomete recém-nascidos (forma clássica), uma forma tardia (forma não clássica) e uma terceira forma, na qual mulheres apresentam os sintomas durante a gravidez ou no período pós-parto (KOSE *et al.*, 2017; QUINONEZ; THOENE, 2004).

Recém-nascidos acometidos pela forma aguda parecem normais ao nascimento, mas aproximadamente 1 a 3 dias após, apresentam hiperamonemia, letargia, vômitos, falta de apetite, e sinais de aumento de pressão intracraniana, podendo progredir para aumento do tônus muscular, convulsões, coma e perda dos

níveis de consciência, e conseqüentemente, morte (HERRERA SANCHEZ *et al.*, 2017; KOSE *et al.*, 2017; RUDER *et al.*, 2014). Crianças diagnosticadas precocemente e tratadas de forma apropriada podem sobreviver por um tempo indeterminado, mas geralmente irão apresentar sequelas neurológicas importantes (QUINONEZ; THOENE, 2004).

O diagnóstico da CTLN1 pode ser feito por meio da dosagem dos níveis séricos de amônia (presentes em torno de 2000 a 3000  $\mu\text{mol/L}$ , sendo que valores normais são de 40-100  $\mu\text{mol/L}$ ) e citrulina (presentes em torno de 1000  $\mu\text{mol/L}$ , sendo que valores normais são  $<50 \mu\text{mol/L}$ ), ausência de ASS e aumento de lisina, glutamina e alanina (QUINONEZ; THOENE, 2004).

Com relação ao tratamento, a citrulinemia exige uma vigilância a longo prazo com um importante manejo nutricional e farmacológico. O tratamento consiste em eliminar farmacologicamente o excesso de amônia, com medicamentos como benzoato de sódio e fenilacetato, suplementação com L-arginina, restrição proteica, e em casos mais graves, hemodiálise e transplante hepático (HERRERA SANCHEZ *et al.*, 2017; MAESTRI; CLISSOLD; BRUSILOW, 1995).

Uma vez diagnosticada a doença, as chances de sobrevivência em pacientes acometidos pela forma neonatal são pequenas, já aos 5 anos de idade os pacientes possuem uma chance de 87,5% de sobrevivência e aos 10 anos de idade, as taxas são reduzidas para 72%. Entretanto, muitos deles apresentam alterações psicomotoras, déficits neurológicos e atraso no crescimento (CABRAL *et al.*, 2002). Os desfechos a longo prazo de paciente com a CTLN1 são desconhecidos, uma vez que não são encontrados muitos relatos na literatura de pacientes portadores da doença que sobreviveram até a vida adulta (BRUNETTI-PIERRI *et al.*, 2012).

Embora a fisiopatologia da CTLN1 ainda não seja bem esclarecida, acredita-se que ela esteja relacionada ao acúmulo de amônia no organismo, principalmente em células cerebrais (PRESTES *et al.*, 2006). Estudos indicam que a amônia é convertida em glutamina nos astrócitos, processo esse que altera o metabolismo e a perfusão celular, através da criação de um gradiente osmótico que desvia água para dentro das células cerebrais, levando à quadros de encefalopatia, edema, aumento da pressão intracraniana e conseqüentemente, morte celular (CABRAL *et al.*, 2002; RUDER *et al.*, 2014).

Bosoi e colaboradores (2009) listam também como efeitos da hiperamonemia no cérebro: alterações no metabolismo energético, na sinalização do cálcio, nos sistemas neurotransmissores, no pH, no potencial elétrico das membranas celulares, na ativação dos neutrófilos, na síntese neuronal, na expressão proteica e de mRNA, e na liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), levando a quadros inflamatórios e de estresse oxidativo.

Embora a toxicidade da amônia e sua relação com a liberação de radicais livres ainda não esteja bem consolidada, alguns artigos já abordam esse tema. Em 2008, Görg e colaboradores demonstraram que a amônia induziu a oxidação de RNA em cultura de astrócitos de rato, em fatias de cérebro de rato e em cérebro de rato *in vivo* e concluíram que a oxidação do RNA pode afetar a expressão gênica e a síntese local de proteínas, promovendo assim uma ligação entre a hiperamonemia e a produção de ERO e ERN.

### **3.4 Radicais Livres**

Os radicais livres são moléculas altamente reativas e instáveis, que contêm elétrons não pareados em sua última camada eletrônica, o que os tornam capazes de reagir com outras moléculas, como proteínas, carboidratos, lipídeos e DNA, modificando suas estruturas moleculares ao se comportarem como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2010; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A geração de radicais livres é um processo fisiológico e de extrema importância para o correto funcionamento do organismo (BARBOSA *et al.*, 2010). Um exemplo de situação na qual se faz importante a geração de radicais livres é no processo de defesa contra infecções, quando os neutrófilos são estimulados a produzir radicais livres com o intuito de destruir um microrganismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Outras situações nas quais a produção de radicais livres se torna benéfica são: no processo fagocitário, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular, na geração de energia (ATP), na fertilização dos óvulos e na ativação genética (BARBOSA *et al.*, 2010; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011; RAHMAN, 2007). Desta forma, em níveis baixos ou moderados, as espécies reativas de oxigênio

e de nitrogênio exercem efeitos benéficos sobre as respostas celulares e a função imunológica.

Entretanto, quando em concentrações elevadas, os radicais livres encontram-se associados diretamente com o aparecimento de inúmeras doenças, como câncer e uma variedade de alterações degenerativas. Saeidnia e Abdollahi (2013) atribuem esse papel devido a capacidade dos radicais livres em iniciar processos de apoptose e necrose celular.

Em um estudo de 2014, Blake e Trounce relataram que um período de hiperglicemia prolongada levava à alteração de vias metabólicas e à superprodução de radicais livres pela mitocôndria, processo esse que pode estar relacionado ao desencadeamento de complicações do Diabetes Mellitus.

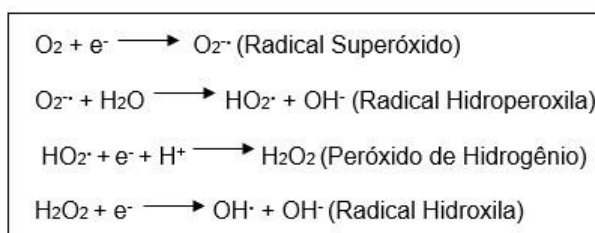
Agarwal e colaboradores (2012), por sua vez, relacionaram a superprodução de radicais livres pela mitocôndria com a alteração na geração de ATP, o qual é essencial para o desenvolvimento dos óocitos e embriões, e com o desencadeamento de uma série de doenças reprodutivas, como Síndrome do Ovário Policístico, endometriose e infertilidade.

Entre as principais espécies de radicais livres, encontram-se as Espécies Reativas de Oxigênio e as Espécies Reativas de Nitrogênio, nos quais os elétrons desemparelhados estão ligados aos átomos de oxigênio e nitrogênio, respectivamente (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

#### 3.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

As ERO são encontradas em todos os organismos vivos. Em condições normais, na cadeia de transporte de elétrons, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, ou seja, recebe 4 elétrons, formando duas moléculas de  $H_2O$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Ao decorrer desse processo, tem-se a formação de ERO, sendo as principais o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997), conforme Figura 2.

Figura 2 – Formação de ERO



Fonte: Adaptado de Koury e colaboradores (2003).

#### 3.4.1.1 Radical Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

O  $O_2^{\cdot-}$  é formado a partir da primeira redução do  $O_2$  com um elétron e produzido basicamente nas mitocôndrias, microsomas e peroxissomas e ocorre em quase todas as células aeróbicas (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Possui uma meia vida longa, e apesar de possuir pouca reatividade em meios aquosos, suas reações podem desencadear a formação de  $OH^{\cdot}$  e  $HO_2^{\cdot}$ , e quando em meio ácido,  $H_2O_2$  (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

#### 3.4.1.2 Radical Hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ )

O  $HO_2^{\cdot}$  é resultado da protonação do  $O_2^{\cdot-}$  com um próton do íon hidrogênio em meio aquoso (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Trata-se de uma ERO mais reativa que o superóxido, devido a sua alta capacidade de penetrar nas membranas lipídicas, gerando danos como lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

#### 3.4.1.3 Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )

O  $H_2O_2$  é gerado pela protonação do  $O_2^{\cdot-}$  em meio ácido (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005). Embora não seja considerado um radical livre, é altamente tóxico para as células. Essa toxicidade se deve a sua meia vida longa, ao fato de não possuir

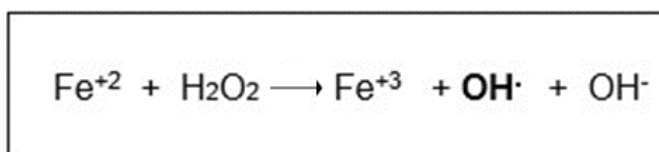
elétrons desemparelhados na última camada e a sua capacidade de atravessar membranas lipídicas, reagindo também com a membrana eritrocitária e proteínas ligadas ao ferro, produzindo então danos às moléculas através da geração de novas ERO, como o OH<sup>•</sup> (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

#### 3.4.1.4 Radical Hidroxila (OH<sup>•</sup>)

O OH<sup>•</sup> é a ERO mais reativa de todas, grande parte devido à sua meia vida curta e maior instabilidade eletrônica, características essas que lhe conferem maior rapidez e capacidade de retirar elétrons de outras moléculas, como ácidos orgânicos, fosfolipídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e aminoácidos (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A geração do OH<sup>•</sup> pode acontecer principalmente por duas vias de reação química. A primeira reação é denominada Reação de Fenton, observada pela primeira vez em 1894, e baseia-se na reação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o sal de Ferro, conforme pode ser analisado na Figura 3 (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

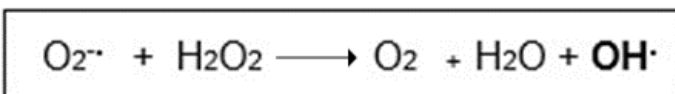
Figura 3 – Formação de OH<sup>•</sup> pela Reação de Fenton



Fonte: Adaptado de ANDRADE JÚNIOR *et al.* (2005).

Outra via com papel importante na formação do OH<sup>•</sup> é a reação de Haber-Weiss, na qual ocorre a interação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, conforme descrito na Figura 4 (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005).

Figura 4 - Formação de OH· pela Reação de Haber-Weiss



Fonte: Adaptado de ANDRADE JÚNIOR *et al.* (2005).

#### 3.4.1.5 Oxigênio Singlet ( $^1\text{O}_2$ )

O  $^1\text{O}_2$  é uma ERO que não possui elétrons desemparelhados em sua última camada e consiste na forma excitada do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O  $^1\text{O}_2$  possui importância fundamental nos processos químicos e biológicos, grande parte devido à sua alta reatividade e envolvimento na geração de processos fisiológicos e patológicos (DI MASCIO *et al.*, 2016).

Estudos têm demonstrado que essa ERO pode ser gerada por sistemas biológicos, como em reações catalisadas por peroxidases, lactoperoxidases e mieloperoxidases, reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com hipoclorito ou peroxinitrito, pela reação de ozônio com biomoléculas ou através da fagocitose (DI MASCIO *et al.*, 2016; RONSEIN *et al.*, 2006).

Há evidências de que o  $^1\text{O}_2$  é responsável pela oxidação de lipídeos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, ocasionando doenças como cataratas e porfirias (DI MASCIO *et al.*, 2016; RONSEIN *et al.*, 2006).

#### 3.4.2 Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN)

Dentre os principais radicais livres derivados da geração de ERN encontram-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O  $\text{NO}^{\cdot}$  é constituído por sete elétrons de nitrogênio e oito elétrons de oxigênio, possuindo um elétron desemparelhado na sua última camada (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). É produzido pelo organismo por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase e também pela estimulação dos fagócitos humanos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



A formação ou metabolização de uma ERN pode desencadear a geração de outras ERN. O nitrato, por sua vez, pode se transformar em  $\text{NO}_2^-$ , que ao entrar em contato com os ácidos gástricos, leva a formação do  $\text{HNO}_2$ , radical livre esse que promove a retirada dos grupos amino das bases do DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Para que o  $\text{NO}^\cdot$  seja capaz de atacar diretamente o DNA, é necessário que o mesmo reaja com o  $\text{O}_2^-$ , formando  $\text{ONOO}^-$ , uma ERN produtora de agentes capazes de introduzir grupamentos amino em aminoácidos aromáticos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

### **3.5 Estresse Oxidativo**

O quadro de estresse oxidativo instala-se quando existe um desequilíbrio no processo de geração dos radicais livres, seja pelo aumento na formação desses compostos ou pela redução da atividade dos sistemas antioxidantes (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011). O estresse oxidativo provoca alterações em diversas biomoléculas, as quais podem perder suas funções biológicas ao sofrer danos como peroxidação lipídica, danos oxidativos ao DNA e a proteínas (BARBOSA *et al.*, 2010; SILVA; FERRARI, 2011).

Caso o processo descompensatório entre a geração de radicais livres e sua eliminação aconteça por um período prolongado, podem ser desencadeadas várias patologias, entre elas: aterosclerose, artrite, choque hemorrágico, distúrbios cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidade, câncer e transtornos neurodegenerativos (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

### **3.6 Mecanismo de Danos às Moléculas**

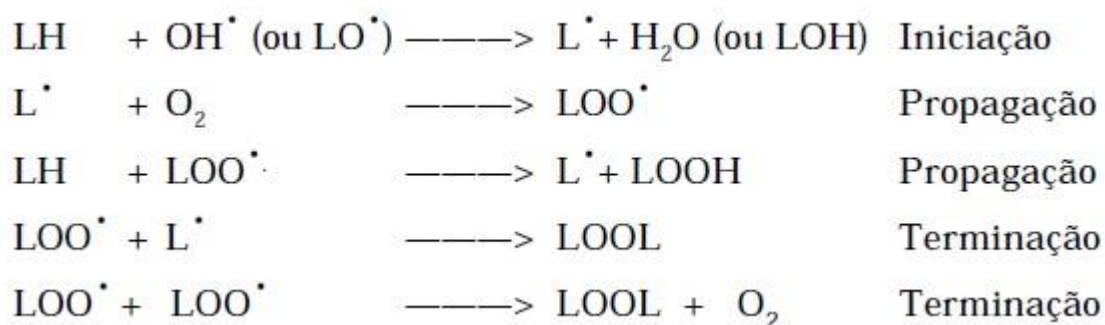
#### **3.6.1 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação**

As membranas plasmáticas são as estruturas celulares mais susceptíveis aos efeitos deletérios dos radicais livres, uma vez que a peroxidação lipídica altera sua estrutura, reduzindo a seletividade no transporte iônico e a sinalização transmembrana, prejudicando sua permeabilidade e conseqüentemente, o transporte

celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SILVA; FERRARI, 2011). Essas alterações podem resultar em morte celular, uma vez que há a liberação de enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O processo de peroxidação lipídica envolve três etapas: iniciação, propagação e terminação, as quais estão descritas na Figura 5.

Figura 5 – Reações de Lipoperoxidação, onde L representa o lipídeo.

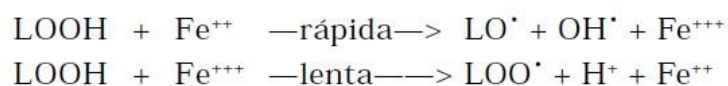


Fonte: FERREIRA *et al.* (1997).

Na etapa de iniciação, o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) ou radical alcóxila ( $LO^{\bullet}$ ) sequestra o hidrogênio do ácido graxo polinsaturado ( $LH$ ), levando a formação do radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ). Na primeira reação de propagação, o radical  $L^{\bullet}$  reage com o  $O_2$ , gerando um radical peróxila ( $LOO^{\bullet}$ ), que por sua vez sequestra novo hidrogênio do  $LH$ , e na segunda reação de propagação, forma mais um radical  $L^{\bullet}$ . O processo de peroxidação lipídica se encerra quando os radicais  $L^{\bullet}$  e  $LOO^{\bullet}$  se propagam até a autodestruição (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os íons ferro também participam do processo de lipoperoxidação por meio do desencadeamento de reações de iniciação. Esses íons atuam como catalisadores da conversão de  $LOOH$  em radicais altamente reativos como  $LO^{\bullet}$ ,  $OH^{\bullet}$  e  $LOO^{\bullet}$ , dando início a uma nova cadeia de reações, que recebe o nome de ramificação (Figura 6) (BARBOSA *et al.*, 2010; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Figura 6 – Reação de ramificação



Fonte: FERREIRA *et al.* (1997).

### 3.6.2 Danos às proteínas

As proteínas são essenciais para o correto funcionamento do organismo e desempenham inúmeras funções biológicas como regeneração dos tecidos, catalisação de reações enzimáticas, hormonais e imunológicas. São compostas por cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (NELSON; COX, 2014).

O processo oxidativo induzido pelas ERO gera mudanças físicas nas proteínas, aumentando sua fragmentação, agregação e suscetibilidade à degradação por proteossomos (proteases multicatalíticas) (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; SILVA; FERRARI, 2011). Além disso, as ERO inibem a atividade enzimática responsável por editar e corrigir o RNA transportador, levando a síntese anômala de proteínas (NELSON; COX, 2014; SILVA; FERRARI, 2011).

Segundo Andrade Júnior *et al.* (2005), proteínas como albumina e colágeno, são fragmentadas em prolina (pelo radical OH $\cdot$ ) e em aminoácidos como histidina e arginina, que se associam com metais de transição. A agregação proteica acontece principalmente pela atividade oxidativa do radical OH $\cdot$ , capaz de formar ligações cruzadas entre as proteínas e a degradação ocorre devido a formação de proteínas anômalas favorecendo sua remoção pelos proteossomos (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005).

### 3.6.3 Danos ao DNA

O DNA é composto de uma sequência de nucleotídeos e bases nitrogenadas, presente em cromossomos e plasmídeos, e é responsável por armazenar todas as informações genéticas e hereditárias de um ser vivo, além de produzir e codificar corretamente todas as proteínas presentes no organismo (LEWIN *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2006).

Os danos oxidativos ao DNA são ocasionados principalmente pela ação do radical OH $\cdot$ , por meio de uma série de reações que consistem na formação de ligações cruzadas de DNA e suas proteínas, oxidação da desoxirribose e quebra das dupla hélices (NELSON; COX, 2014; SILVA; FERRARI, 2011). Uma das estruturas celulares mais susceptíveis aos danos oxidativos ao nível de DNA é a mitocôndria, por se tratar

de uma das fontes mais importantes de produção de ERO no organismo (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005). A lesão mitocondrial consiste em alterações de bases e quebras moleculares, onde as bases nitrogenadas mais acometidas pelo estresse oxidativo são a timina e citosina (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005).

A ação dos radicais livres sobre o DNA, principalmente do radical OH<sup>·</sup>, leva a alterações na expressão gênica do mesmo, propiciando o desenvolvimento de inúmeros processos patológicos crônicos, como câncer e doenças neurodegenerativas (MARTINEZ *et al.*, 2006; SILVA; FERRARI, 2011).

### **3.7 Sistemas de Defesas Antioxidantes**

Os sistemas antioxidantes são sistemas criados pelo organismo para inibir e/ou reduzir os efeitos tóxicos do excesso de radicais livres às células (BARBOSA *et al.*, 2010; KOURY; DONANGELO, 2003). Para que essa proteção ocorra por completo, diferentes mecanismos de ação podem ser usados, dentre eles: sistemas de prevenção, os quais impedem a formação de radicais livres; sistemas varredores, que impedem a ação dos radicais livres; e/ou por meio de sistemas de reparo, os quais são responsáveis por acelerar o reparo e a reconstituição das células e estruturas biológicas danificadas (BARBOSA *et al.*, 2010; KOURY; DONANGELO, 2003).

Os sistemas antioxidantes podem ser divididos em dois grupos: o sistema enzimático e não-enzimático, sendo o último sistema composto por inúmeras substâncias antioxidantes que podem ser de origem endógena ou adquiridas pela dieta, como vitaminas, polifenóis e minerais (Tabela 1) (BARBOSA *et al.*, 2008, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

**Tabela 1.** Ações e mecanismos das principais substâncias antioxidantes.

<b>Antioxidantes</b>	<b>Ação</b>	<b>Referências</b>
<b><u>Não enzimáticos (de origem dietética)</u></b>		
Vitamina A (Betacaroteno)	Proteção contra oxidação de lipídeos e DNA.	Rodrigo <i>et al.</i> , 2007.
Vitamina C (Ácido Ascórbico)	Inibição das ERO (Agente redutor), regeneração de alfa-tocoferol.	Rodrigo <i>et al.</i> , 2007.
Vitamina E (Alfa-tocoferol)	Proteção contra a peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana celular.	Rodrigo <i>et al.</i> , 2007.
Cu, Zn, Mn, Se	Cofatores das enzimas antioxidantes SOD-Cu/Zn, SOD-Mn e GSH-Px.	Vincent <i>et al.</i> , 2007.
Outros carotenoides (licopeno)	Proteção contra a oxidação de lipídeos, LDL, proteínas e DNA.	Visioli <i>et al.</i> , 2003.
Fitoquímicos (Resveratrol, catequinas, quercetinas, ácidos fenólicos e outros)	Proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA.	Fito <i>et al.</i> , 2007.
<b><u>Enzimáticos</u></b>		
Superóxido Dismutase (SOD)	SOD-Cu/Zn (citoplasma), SOD-Mn (mitocôndria). Catalisa a conversão do radical $O_2^{\cdot-}$ em $H_2O_2$ .	Vincent <i>et al.</i> , 2007.
Catalase (CAT)	Catalisa a conversão de $H_2O_2$ em $O_2$ e $H_2O$ .	Vincent <i>et al.</i> , 2007.
Glutationa Peroxidase (GSH-Px)	Catalisa a redução de $H_2O_2$ em $H_2O$ .	Vincent <i>et al.</i> , 2007.

Fonte: Adaptado de BARBOSA *et al.* (2010).

### 3.7.1 Sistema Enzimático

O Sistema Enzimático é um grupo de defesa antioxidante composto por três importantes enzimas presentes no citosol e mitocôndrias das células: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutationa Peroxidase (GSH-Px) (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2010).

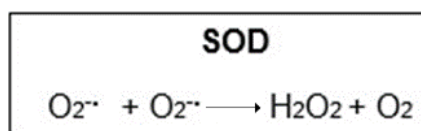
#### 3.7.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD corresponde a um grupo de enzimas presente nos sistemas eucariontes com diferentes composições estruturais, como SOD-Cobre-Zinco (SOD-Cu-Zn) e SOD-Manganês (SOD-Mn) (ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A forma SOD-Cobre-Zinco está presente principalmente no citosol, e como o próprio nome sugere, possui Cobre e Zinco em seu centro redox (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A segunda forma de SOD está presente nas mitocôndrias celulares e tem como centro redox o Manganês (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A SOD-Manganês tem sua atividade exacerbada pelo processo de dano oxidativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O sistema de defesa composto pela SOD possui um importante papel antioxidante, responsável por catalisar a dismutação do radical  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Figura 7), prevenindo assim o acúmulo desse radical livre e exercendo ação protetora contra lesões ao DNA (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011).

Figura 7 – Reação de Dismutação do radical  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ .



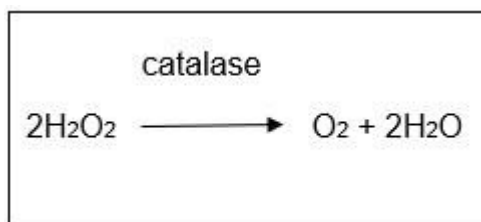
Fonte: Adaptado de ANDRADE JÚNIOR *et al.* (2005).

### 3.7.1.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma enzima composta por um grupo prostético heme que pode ser encontrada em mitocôndrias e matrizes peroxissomais (ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011).

Desempenha sua função antioxidante por meio da catálise da decomposição de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (Figura 8), atuando em conjunto e dividindo essa função com a GSH-Px (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Figura 8 – Reação de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> pela ação da CAT.



Fonte: Adaptado de BARREIROS *et al.* (2006).

Quando em baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este é preferencialmente eliminado do organismo pela ação da GSH-Px, mas quando em altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este composto é eliminado predominantemente pela atividade antioxidante da CAT (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005).

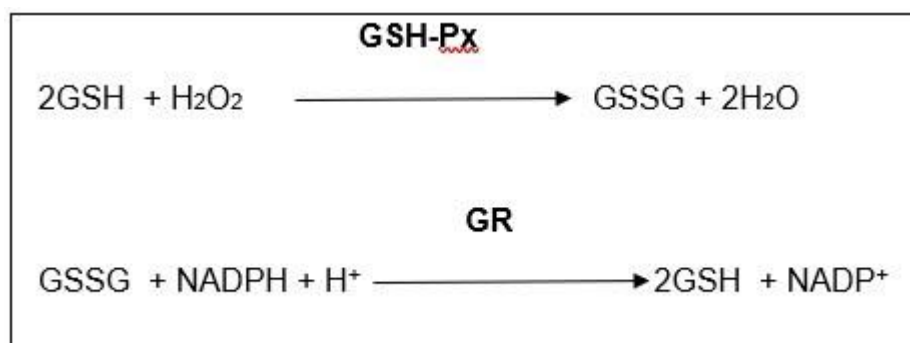
As atividades antioxidantes da CAT e da GSH-Px na decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O são de extrema importância, uma vez que esse composto na presença de cobre e ferro leva a geração de radical OH· através das reações de Fenton e Haber-Weiss, ERO altamente reativa e instável, contra a qual não existe sistema antioxidante enzimático especializado (BARBOSA *et al.*, 2010).

### 3.7.1.3 Glutationa Peroxidase (GSH-Px) e Glutationa (GSH)

O terceiro sistema antioxidante enzimático é formado pela GSH em conjunto com as enzimas GSH-Px e glutaciona redutase (GR) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A GSH-Px está presente no citoplasma e nas mitocôndrias celulares em duas formas, a forma dependente e independente de selênio (BARBOSA *et al.*, 2010).

Assim como a CAT, esse sistema atua catalisando a dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O. Esse processo consiste na redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela GSH na presença de GSH-Px, formando uma ponte dissulfeto e um composto chamado glutaciona oxidada (GSSG) (Figura 9) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Posteriormente, a GSSG é reduzida sob ação da enzima GR, utilizando elétrons provenientes da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que é formada na via das pentoses fosfato sob ação da enzima glicose-6-fostato-desidrogenase (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Figura 9 – Catálise da dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> por meio da GSH-Px.



Fonte: Adaptado de BARREIROS *et al.* (2006).

### 3.7.2 Sistema Não-Enzimático

O segundo sistema de defesa antioxidante é denominado sistema não-enzimático, no qual se incluem o ácido ascórbico, alfa tocoferol, compostos fenólicos e flavonoides, retinol e carotenoides, que também podem ser chamados de antioxidantes exógenos, uma vez que grande parte deles é adquirido por meio da ingestão alimentar (BARBOSA *et al.*, 2010; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011).

#### 3.7.2.1 Ácido Ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico é considerado um potencial antioxidante devido a sua atividade redutora, característica essa que o torna capaz de reduzir metais em transição (como Fe<sup>3+</sup> e Cu<sup>2+</sup>) e de se oxidar pelas ERO e ERN presentes no meio aquoso, formando um composto pouco reativo e inofensivo ao organismo (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

De encontro a seu potencial antioxidante, essa característica redutora de metais em transição pode transformar o ácido ascórbico em uma substância com propriedades pró-oxidantes, uma vez que esses metais favorecem a formação do radical OH·, através das reações de Fenton e Haber-Weiss (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Ainda assim suas propriedades antioxidantes superam as pró-oxidantes, uma vez que o ferro encontra-se preferencialmente armazenado ou conjugado à proteínas de transporte (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



O ácido ascórbico age principalmente na inibição da peroxidação lipídica e reduz o dano ao DNA, o que auxilia no entendimento de sua capacidade de prevenir doenças cardiovasculares (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Além disso, possui papel importante na regeneração do radical alfa-tocoferil, o qual é formado quando o alfa-tocoferol transfere elétrons para o radical LOO·, formado na peroxidação lipídica (BARBOSA *et al.*, 2010).

### 3.7.2.2 Alfa tocoferol (Vitamina E)

O alfa tocoferol, componente com maior atividade biológica do grupo da vitamina E, é um importante antioxidante lipossolúvel, responsável por proteger as membranas lipídicas, uma vez que reage com o O<sub>2</sub> e outros radicais livres, impedindo sua oxidação e peroxidação (LIMA; DIMENSTEIN; RIBEIRO, 2014; MELO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017). Sua atividade antioxidante é atribuída principalmente à sua capacidade de reagir com o radical LOO·, interrompendo assim a reação em cadeia de peroxidação lipídica (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; VANNUCCHI *et al.*, 1998). O alfa tocoferol sequestra os radicais LOO· nas etapas de propagação e terminação, levando a formação do radical tocoferila (alfa-TH), o qual é relativamente menos tóxico às membranas celulares (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

De acordo com Silva e colaboradores (2017), esse antioxidante é de extrema importância no desenvolvimento fetal e no período de lactação, uma vez que protege o recém-nascido de doenças como anemia hemolítica, disfunções neurológicas e displasia broncopulmonar.

O alfa tocoferol também vem sendo associado à diminuição dos casos de aterosclerose, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que essa vitamina é capaz de prevenir a peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais promovem o transporte dos ácidos graxos e do colesterol do fígado para os tecidos periféricos (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

### 3.7.2.3 Retinol (Vitamina A) e Carotenoides

O retinol é uma vitamina lipossolúvel atuante na síntese de ácido ribonucleico (RNA), na fisiologia do sistema visual, no metabolismo intermediário, no sistema imunológico e na integridade das células epiteliais (GOMES; SAUNDERS; ACCIOLY, 2005; GURGEL *et al.*, 2016).

A vitamina A juntamente com os carotenoides de atividade biológica do transretinol vem sendo bastante estudada quanto a sua ação antioxidante. Dentre os carotenoides, aproximadamente 20 são precursores da vitamina A, sendo os mais importantes o alfacaroteno, o betacaroteno e o betacriptoxantina (GOMES; SAUNDERS; ACCIOLY, 2005). Esse conjunto de redutores biológicos age desativando o  $^1O_2$  e no sequestro dos radicais  $LOO\cdot$ , reduzindo os danos oxidativos ao DNA e aos lipídeos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

#### 3.7.2.4 Compostos fenólicos e flavonoides

Os compostos fenólicos ou polifenóis são antioxidantes considerados interruptores de radicais livres, com papel importante na prevenção da peroxidação lipídica, por meio do sequestro e neutralização de radicais livres, da decomposição de peróxidos e quelação de metais (ACHKAR *et al.*, 2013; ANGELO; JORGE, 2007; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Estão presentes em extratos de plantas e vegetais, sendo as principais fontes de compostos fenólicos o café, a cebola, maçã, uva, entre outros (SILVA *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos podem ser categorizados em dois grandes grupos: os flavonoides e os não flavonoides (ANGELO; JORGE, 2007; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). O grupo dos flavonoides inclui as catequinas, as flavonas, flavanonas, isoflavonas, os flavonóis e antocianinas; enquanto o grupo dos não-flavonoides é composto pelos ácidos fenólicos (ABE *et al.*, 2007; ANGELO; JORGE, 2007).

Outro grupo importante de compostos fenólicos é o grupo dos estibenos, no qual se encontra o resveratrol (ANGELO; JORGE, 2007).

##### 3.7.2.4.1 Resveratrol

O resveratrol (3,5,4' trihidroxiestilbeno) é um polifenol presente em muitas espécies vegetais, principalmente na pele e nas sementes de uvas da espécie *Vitis vinifera* (BARROS *et al.*, 2017; GEDIK *et al.*, 2008; SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997; SU; HUNG; CHEN, 2006). É encontrado na natureza em duas isoformas, *cis* e *trans*, sendo a forma *trans* com maior atividade biológica (BARROS *et al.*, 2017; GEDIK *et al.*, 2008). Sua atividade antioxidante advém de sua capacidade de competição com a coenzima Q pelo sítio de formação de radicais livres, de neutralizar ERO formadas nas mitocôndrias e em sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica resultante dos produtos da reação de Fenton (BARROS *et al.*, 2017).

De acordo com Su e colaboradores (2006), estudos têm reportado uma grande variedade de atividades farmacológicas e terapêuticas para o resveratrol. Além da capacidade antioxidante, o resveratrol demonstrou atividade antiplaquetária, estrogênica, vasodilatadora, antiinflamatória e anticancerígena (GEDIK *et al.*, 2008; SU; HUNG; CHEN, 2006).

Em 2007, Mokni e colaboradores estudaram o efeito do resveratrol sobre a atividade das enzimas antioxidantes no cérebro de ratos saudáveis. O experimento foi realizado por meio da administração intraperitoneal de resveratrol, o qual se mostrou capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e de reduzir os níveis cerebrais de malonaldeído, principal produto da lipoperoxidação. Além disso, o resveratrol foi capaz de aumentar a atividade antioxidante da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). Por meio desses resultados, os autores concluíram que o resveratrol exerce ação antioxidante cerebral e possui propriedades neuroprotetivas ao regular inúmeras enzimas antioxidantes (MOKNI *et al.*, 2007).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos machos Wistar de 30 e 60 dias de idade provenientes da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Antes do processo de experimentação, os animais foram acomodados e aclimatados por 7 dias, para adaptação em um novo ambiente. Os animais foram mantidos em salas com ciclo de 12h claro/escuro com temperatura mantida entre 20-22 °C com livre acesso à comida (ração) e água. Os animais foram mantidos em número máximo de quatro por gaiola contendo maravalha. A frequência de troca de caixas foi realizada a cada 2 dias. Os cuidados com os animais seguiram o disposto na Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (BRASIL, 2008; MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA).

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo "Guide For The Care and Use of Laboratory Animals, 2011".

### **4.2 Protocolos Experimentais**

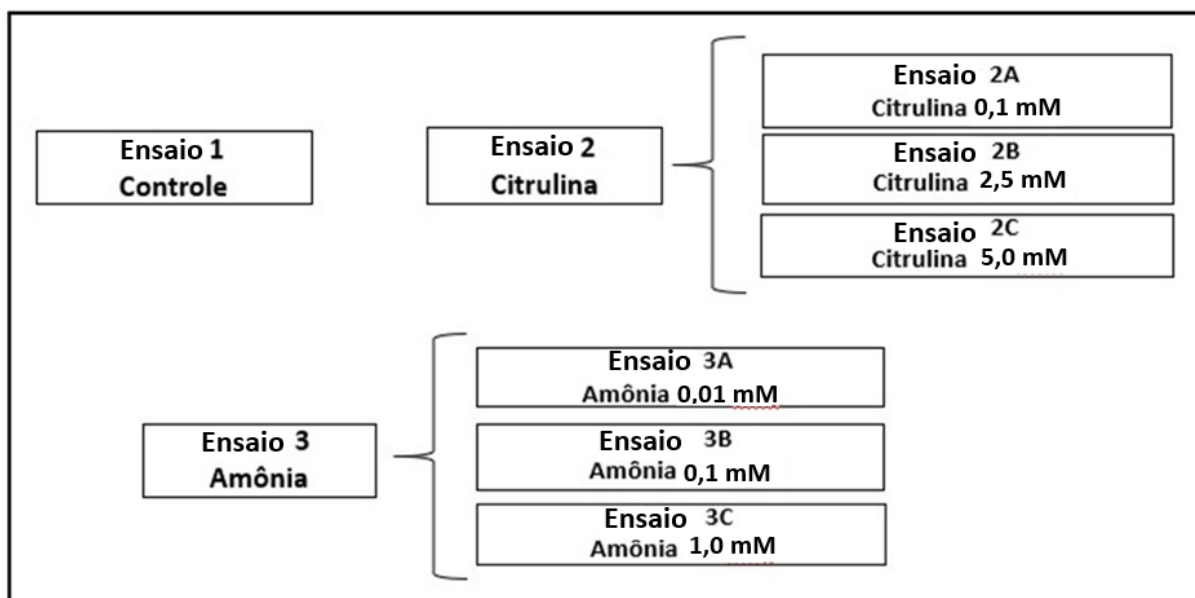
#### **4.2.1 Preparação do tecido**

Os animais foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, e as estruturas cerebrais (hipocampo, córtex cerebral e cerebelo) foram dissecadas e homogeneizadas em tampão adequado de acordo com a técnica utilizada. O homogeneizado foi centrifugado a x 3.000 g, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px), conteúdo total de sulfidrilas e dano a lipídeos por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).

#### 4.2.2 Experimentos *in vitro* com Citrulina e Amônia

Foram utilizados hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos, obtidos conforme descrito no item 4.2.1. A citrulina e a amônia foram adicionadas aos tecidos a fim de se obter as diferentes concentrações finais de citrulina (0,1, 2,5 e 5,0 mM) e de amônia (0,01, 0,1 e 1,0 mM), de acordo com o protocolo experimental de Prestes e colaboradores (2006) (Figura 10). O ensaio controle foi realizado sem a adição da citrulina e da amônia. As concentrações de L-citrulina utilizadas no presente estudo abrangeram valores semelhantes aos observados em pacientes citrulinêmicos (BRUSILOW; HORWICH, 2001).

Figura 10 - Divisão dos ensaios para realização dos experimentos *in vitro* com Citrulina e Amônia.



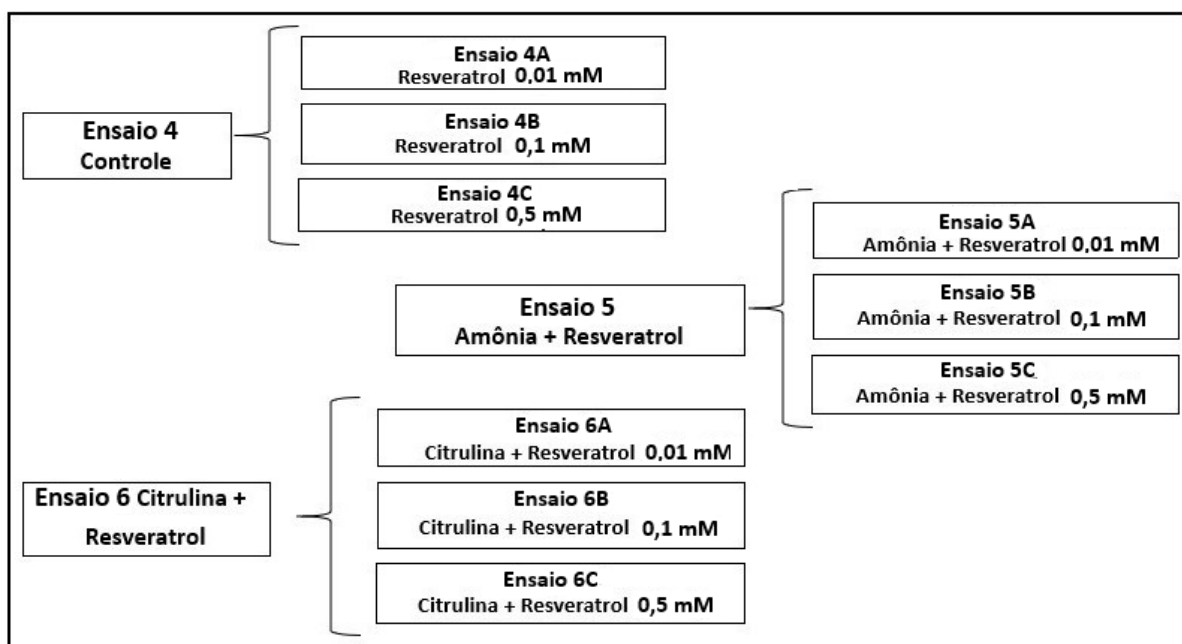
Fonte: O autor.

#### 4.2.3 Experimentos *in vitro* com Resveratrol

Para os experimentos *in vitro*, os ensaios foram divididos em três grupos: ensaio 4 (controle + resveratrol 0,01, 0,1, e 0,5 mM), ensaio 5 (amônia + resveratrol 0,01, 0,1, e 0,5 mM) e ensaio 6 (citrulina + resveratrol 0,01, 0,1, e 0,5 mM) (Figura 11). Após a adição dos compostos descritos acima, os tubos de ensaio foram incubados por 1 hora a temperatura de 37 °C. Os experimentos *in vitro* foram realizados com a

utilização de hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos. As concentrações de resveratrol seguiram o protocolo descrito por Dos Santos e colaboradores (2006).

Figura 11 - Divisão dos ensaios para realização dos experimentos *in vitro* de prevenção com Resveratrol.



Fonte: O autor.

### 4.3 Estudos bioquímicos

#### 4.3.1 Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi ensaiada pelo método de Aebi (1984), usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de  $H_2O_2$  à 240 nm num meio de reação contendo 20 mM de  $H_2O_2$ , 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0. Uma unidade de CAT é definida como 1  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

#### 4.3.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que é um substrato para a SOD. Primeiramente, 15  $\mu$ l de cada amostra foi adicionado à 215  $\mu$ l de uma mistura contendo 50  $\mu$ M de tampão Tris, 1  $\mu$ M de EDTA, pH 8,2, e 30  $\mu$ M de Catalase. Subsequentemente, foram adicionados 20  $\mu$ L de pirogalol e a absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos à 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatada como unidades de SOD/mg de proteína.

#### 4.3.3 Glutationa Peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tert-butil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro à 340 nm por 4 minutos usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O meio continha 2 mM de GSH, 0,15 U/mL de GSH redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de tert-butil-hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1  $\mu$ mol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px/mg de proteína.

#### 4.3.4 Dosagem de Proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão, o qual se baseia na complexação do cobre em meio alcalino, gerando um derivado de cor azul, que é mensurado espectrofotometricamente em 650 nm. O meio continha NaOH 0,10 M,  $Na_2CO_3$  2%,  $CuSO_4$  1%, Tartarato de  $Na^+$  e  $K^+$  2%. Resumidamente, 10  $\mu$ L de homogeneizado foi adicionado a 1 mL do meio e 190  $\mu$ L de água destilada. A reação foi iniciada pela adição de 100  $\mu$ L de Reagente de Folin 1 N e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em

nmol TNB/mg de proteína. Após o procedimento, os fatores de calibração parcial foram calculados.

#### 4.3.5 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markersbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412 nm. Primeiramente, 50 µL de homogeneizado foi adicionado a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 30 µL de DTNB 10 mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

#### 4.3.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

TBA-RS foi determinada de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). A metodologia para análise do TBA-RS mensura o malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais OH $\cdot$ . Para os experimentos *in vitro*, as estruturas cerebrais foram misturadas com ácido tricloroacético a 10% e 0,67% de ácido tiobarbitúrico e aquecidas num banho de água fervente durante 25 min. TBA-RS foi determinada pela absorbância à 535 nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

### 4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan, quando o teste F foi significativo. Todas as análises foram realizadas com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) com computador compatível. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP para sete experimentos independentes (animais)



realizados em duplicata. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ , em comparação com o grupo de controle (*Duncan's multiple range test*).

## 5 INTERDISCIPLINARIDADE

A Citrulinemia Tipo I é uma doença autossômica recessiva que acomete cerca de 1 indivíduo a cada 57 mil nascidos vivos (RUDER *et al.*, 2014). Embora considerada rara, traz consequências muito graves aos indivíduos acometidos, uma vez que os principais sintomas são hiperamonemia, edema cerebral, atonia muscular, espasmos, convulsões, coma e possível progressão para óbito (HERRERA SANCHEZ *et al.*, 2017; KOSE *et al.*, 2017). Trata-se de um erro inato do metabolismo com poucas opções terapêuticas farmacológicas e que exige demanda alta de recursos hospitalares. Existem poucas informações sobre sua fisiopatologia, o que dificulta seu diagnóstico precoce e intervenção imediata (PRESTES *et al.*, 2006).

Caracteriza-se por ser uma doença de tratamento em âmbito hospitalar, e o estudo do dano oxidativo causado pela citrulina em excesso possuir papel potencial esclarecedor na fisiopatologia da doença, e uma vez essa condição sendo melhor esclarecida, há a possibilidade de tratamento mais efetivo, resultando na redução de custos, seja pela redução no tempo de internação, na redução da geração de resíduos hospitalares e laboratoriais, e de forma geral, otimizando os gastos hospitalares e ambientais.

Além das vantagens de se estudar o papel oxidativo da citrulina, estudar o papel antioxidante do resveratrol pode trazer uma série de benefícios. Primeiramente, o benefício seria a disponibilidade de uma nova forma de tratamento terapêutico para a Citrulinemia Tipo I. Por se tratar de um polifenol de origem natural, derivado da pele e sementes da *Vitis vinifera*, seu uso com função terapêutica e antioxidante em grande escala, desencadearia em aumento na economia agrícola e farmacêutica (BARROS *et al.*, 2017; GEDIK *et al.*, 2008; SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997).

Dessa forma, o estudo do dano oxidativo da Citrulina e do papel protetor antioxidante do Resveratrol traz benefícios em nível de conhecimento científico, podendo gerar possíveis ganhos na economia agrícola e de indústrias farmacêuticas, e por final, ainda reduzir despesas hospitalares, como diminuição no tempo de internação, redução da produção de lixo hospitalar, entre outros, produzindo assim uma interface entre a saúde e o meio ambiente.



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Artigo:

#### PROTECTIVE EFFECT OF RESVERATROL ON CITRULLINEMIA TYPE I- INDUCED BRAIN OXIDATIVE DAMAGE IN RATS

Larissa Delmonego<sup>1</sup>, Thayná Patachini Maia<sup>2</sup>, Débora Delwing-Dal Magro<sup>4</sup>, Karine Louize Vincenzi<sup>1</sup>, Aline Barbosa Lima<sup>1</sup>, Luana Carla Pscheidt<sup>3</sup>, Letícia Eger<sup>3</sup>, Daniela Delwing-de Lima<sup>1-2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10-Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

\*Address for correspondence: Dr. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

## ABSTRACT

We evaluated the *in vitro* effects of citrulline (0.1, 2.5 and 5.0 mM), ammonia (0.01, 0.1 and 1.0 mM) and the influence of resveratrol (0.01, 0.1 and 0.5 mM) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content, and on the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30- and 60-day-old male Wistar rats. Results showed that 2.5 and 5.0 mM citrulline increased TBA-RS in the cerebellum of 30-day-old rats and in the cerebral cortex and cerebellum of 60-day-old rats. Citrulline (5.0 mM) increased SOD and reduced GSH-Px activities in the hippocampus of 30-day-old rats, whereas in the cerebellum it increased GSH-Px. In the cerebral cortex, 2.5 and 5.0 mM citrulline reduced GSH-Px activity. In 60-day-old rats, 2.5 and 5.0 mM citrulline increased SOD in the cerebellum, while in the cerebral cortex, citrulline increased GSH-Px. In addition, 5.0 mM citrulline reduced CAT and increased SOD in the cerebral cortex of 60-day-old rats. Ammonia (0.1 and 1.0 mM) reduced the sulfhydryl content in the cerebral cortex of 30- and 60-day-old rats, while 1.0 mM ammonia increased SOD and reduced GSH-Px in the cerebellum of 30-day-old rats and increased SOD in the hippocampus and cerebellum of 60-day-old rats. Importantly, resveratrol was able to prevent the majority of these alterations, caused by citrulline and ammonia, in oxidative stress parameters in the rat cerebrum. Thus, citrulline and ammonia induce oxidative stress in the brain of Wistar rats; however, resveratrol was able to exert antioxidant effects against these substances.

**Keywords:** Citrullinemia Type I; Oxidative stress; Antioxidants; Resveratrol.

## 1 INTRODUCTION

Citrullinemia Type I (CTLN1) is an autosomal recessive disease, classified as an inborn error of metabolism, which results in deficiency of the activity of the argininosuccinate synthetase enzyme (ASS), which is responsible for the second reaction of the Urea Cycle [1–3]. This change in ASS activity leads to depletion of serum arginine levels and to the accumulation of citrulline and ammonia in blood and body tissues [4–6]. Newborns affected by the acute form of CTLN1 present hyperammonemia, lethargy, vomiting, lack of appetite and signs of increased intracranial pressure, progressing to increased muscle tone, convulsion, coma and loss of consciousness levels, and consequently death [3,4,7]. Although the pathophysiology of CTLN1 is not well understood, it is believed to be related to the accumulation of ammonia in the body, especially in brain cells [5].

Although the relationship between ammonia toxicity and the release of free radicals is not well established, Kosenko *et al.* (1997) found that the acute administration of ammonia to adult rats led to alterations in the activity of antioxidant enzymes and to an increase in superoxide radical formation in the brain [8]. Furthermore, studies indicate that citrullinemia also causes cerebral metabolic abnormalities, which include disturbances in energetic brain metabolism, amino acid metabolism and in the mitochondrial redox state [9].

Phenolic compounds or polyphenols are antioxidants that are considered to be free radical breakers, with an important role in the prevention of lipid peroxidation, through the sequestration and neutralization of free radicals, decomposition of peroxides and metal chelation [10–12]. An example of a phenolic antioxidant is resveratrol [10]. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a polyphenol present in numerous plant species, especially on the skin and in the seeds of grapes of the species *Vitis vinifera* [13–16]. Its antioxidant activity arises from its ability to compete with coenzyme Q for the free radical formation site, neutralizing reactive oxygen species formed in the mitochondria, and its ability to inhibit the lipid peroxidation resulting from the products of the Fenton reaction [13]. According to Su *et al.* (2006), a wide variety of pharmacological and therapeutic activities have been reported for resveratrol [16]. In addition to its antioxidant capacity, resveratrol demonstrates antiplatelet, estrogenic, vasodilator, anti-inflammatory and anticancer activities [14,16].

Considering that citrullinemia is caused by the deficiency of an enzyme of the Urea Cycle, leading to the accumulation of citrulline and ammonia in tissues, causing neurological disorders and oxidative stress, this study aimed to verify the *in vitro* effects of citrulline and ammonia and the potential antioxidant activity of resveratrol on some parameters of oxidative stress in the brains of 30- and 60-day-old Wistar rats.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animals and Reagents**

Thirty- and 60-day-old male Wistar rats from the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, were used in the experiments. Before the experiments, animals were accommodated and acclimatized for 7 days to adapt to their new environment. Animals were kept in rooms with a 12h light/dark cycle with the temperature maintained between 20-22°C and free access to food and water. The animals were kept in cages with a maximum number of four per cage; box exchange was performed every 2 days. Animal care was carried out in accordance with Law N°. 11794 (October 8, 2008), and other regulations applicable to the use of animals in teaching and/or research, especially the Normative Resolutions of the National Council for the Control of Animal Experimentation – CONCEA [17,18].

Room lighting, accommodation and nutrition used followed the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [19]. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Joinville Region, Joinville, Brazil, under the protocol number 010/2016 – PRPPG/CEP. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

### **2.2 Experimental Protocols**

#### **2.2.1 Tissue preparation**

Animals were sacrificed by decapitation, without anesthesia, and the brain structures (hippocampus, cerebral cortex and cerebellum) were dissected and homogenized in suitable buffer, according to the technique used. The homogenate was centrifuged at x 3,000 g at 4°C for 15 min to remove cellular debris and the supernatant was stored in aliquots at -80°C for determination of the activity of the antioxidant

enzymes (CAT, SOD and GSH- Px), total sulfhydryl content and lipid damage through dosage of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS).

### 2.2.2 *In vitro* studies with citrulline and ammonia

The cerebral structures (cerebral cortex, cerebellum and hippocampus) were pre-incubated for 1 h at 37°C in the presence of citrulline or ammonia. A control group was performed without the addition of these compounds. Citrulline and ammonia were added to the assays to obtain the following final concentrations: 0.1, 2.5 and 5.0 mM and 0.01, 0.1 and 1.0 mM, respectively, according to the experimental protocol of Prestes *et al.* (2006). The concentrations of L-citrulline used in the present study included values similar to those observed in citrullinemic patients [20].

### 2.2.3 *In vitro* studies with Resveratrol

The assays were divided into three groups: **Control+resveratrol**, in which resveratrol was added to the tissues homogenates (hippocampus, cerebral cortex and cerebellum) in concentration of 0.01, 0.1 or 0.5 mM; **Citrulline+resveratrol**, in which citrulline was added in concentrations of 0.1, 2.5 or 5.0 mM along with resveratrol 0.01, 0.1 or 0.5 mM; and **Ammonia+resveratrol**, in which ammonia was added in concentrations of 0.01, 0.1 or 1.0 mM and resveratrol 0.01, 0.1 or 0.5 mM.

After addition of the compounds described above, the reaction mixture was incubated for 1 hour at 37°C. *In vitro* experiments were performed using the hippocampus, cerebral cortex and cerebellum of rats. Concentrations of resveratrol followed the protocol described by Dos Santos *et al.* [21].

## 2.3 Biochemical studies

### 2.3.1 Catalase Assay (CAT)

CAT activity was determined by the method of Aebi [22], using a UV-vis Shimadzu spectrophotometer. The method used is based on the disappearance of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. One CAT unit is defined as 1 µmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.



### 2.3.2 Superoxide Dismutase Assay (SOD)

The activity of SOD was assayed by the method described by Marklund [23], using a process highly dependent on superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), which is a substrate for SOD. Sample (15  $\mu$ L) was added to 215  $\mu$ L of a mixture containing 50  $\mu$ M Tris buffer, 1  $\mu$ M EDTA, pH 8.2, and 30  $\mu$ M CAT. Subsequently, 20  $\mu$ L of pyrogallol were added and the absorbance was measured every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a UV-vis Shimadzu spectrophotometer. Inhibition of the auto-oxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, the activity of which can be tested indirectly spectrophotometrically. One unit of SOD is defined as the amount of SOD required to inhibit 50% of the auto-oxidation of pyrogallol and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

### 2.3.3 Glutathione peroxidase assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel [24] using *tert*-butylhydroperoxide as substrate. The decomposition of NADPH was monitored in a spectrophotometer at 340 nm for 4 minutes using a UV-vis Shimadzu spectrophotometer. The medium contained 2.0 mM GSH, 0.15 U/mL GSH reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*-butylhydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is reported as GSH-Px units/mg of protein.

### 2.3.4 Total Sulfhydryl Content

The total sulfhydryl content was determined, according to the method described by Aksenov and Markersbery [25], which is based on the reduction of dithionitrobenzoic acid (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) that is measured spectrophotometrically at 412 nm. For the assay, 50  $\mu$ L of homogenate were added to 1 ml of PBS buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA. The reaction was started by the addition of 30  $\mu$ L of 10 mM DTNB and incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. A blank (DTNB absorbance) was also included in the assay. The results were expressed as nmol TNB/mg protein.

### 2.3.5 Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa *et al.* [26]. The TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, generated mainly by OH<sup>·</sup> radicals. For *in vitro* experiments, brain structures were mixed with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 25 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the precursor of MDA and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. The results are expressed in nmol of MDA/mg protein.

## 2.4 Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov normality test was performed to confirm a parametric distribution; data were then analyzed by ANOVA, followed by Duncan's *post-hoc* test, when the F-test was significant. All analyses were performed using the IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0 using a PC compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Values of  $p < 0.05$  were considered significant. Results are expressed as means  $\pm$  SD for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ , compared to the Duncan's multiple range test.

## 3 RESULTS

### 3.1 *In vitro* effects of citrulline on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrum of rats

We initially verified the *in vitro* effects of different concentrations of citrulline (0.1, 2.5 and 5.0 mM) on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of 30- and 60-day-old rats. Table 1 shows that citrulline at a concentration of 5.0 mM significantly enhanced TBA-RS in the cerebellum [ $F(3,24)=6.520$ ;  $p < 0.01$ ], but did not alter this parameter in the cerebral cortex [ $F(3,24)=2.088$ ;  $p > 0.05$ ] and hippocampus [ $F(3,20)=2.820$ ;  $p > 0.05$ ] of 30-day-old rats. Also, Table 1 shows that citrulline (2.5 and 5.0 mM) increased TBA-RS in the cerebral cortex [ $F(3,24)=19.940$ ;  $p < 0.001$ ] and cerebellum [ $F(3,24)=14.810$ ;  $p < 0.001$ ], but did not alter this biomarker in the hippocampus [ $F(3,24)=1.291$ ;  $p > 0.05$ ] of 60-day-old rats. Table 1 shows that citrulline did not alter total sulfhydryl content in

the cerebral cortex [ $F(3,24)=0.954$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,24)=0.428$ ;  $p>0.05$ ], hippocampus [ $F(3,24)=0.366$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,24)=1,676$ ;  $p>0,05$ ], and cerebellum [ $F(3,24)=0.778$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,24)=0.185$ ;  $p>0.05$ ] of 30- and 60-day-old rats, respectively. With regard to antioxidant enzymes (Table 2), in the hippocampus (30-day-old rats), citrulline 5.0 mM increased SOD [ $F(3,24)=4.206$ ;  $p<0.05$ ] and decreased GSH-Px [ $F(3,24)=6.575$ ;  $p<0.01$ ] activities, but didn't alter CAT activity [ $F(3,24)=0.709$ ;  $p>0.05$ ]. On the other hand, citrulline, in none of the evaluated concentrations, altered the activity of SOD [ $F(3,24)=0.774$ ;  $p>0.05$ ], CAT [ $F(3,24)= 0.909$ ;  $p>0.05$ ] and GSH-Px [ $F(3,24)=0.481$ ;  $p>0.05$ ] in the hippocampus of 60-day-old rats (Table 2). In the cerebellum, citrulline 5.0 mM increased GSH-Px activity [ $F(3,24)=6.853$ ;  $p<0.01$ ] in 30-day-old rats and citrulline 2.5 and 5.0 mM increased SOD activity [ $F(3,20)=8.208$ ;  $p<0.01$ ] in 60-day-old rats. Conversely, did not alter CAT [ $F(3,24)=0.197$ ;  $p>0.05$ ] and SOD [ $F(3,24)=0.202$ ;  $p>0.05$ ] activities in 30-day-old rats, and CAT [ $F(3,20)=0.160$ ;  $p>0.05$ ] and GSH-Px [ $F(3,24)=2.365$ ;  $p>0.05$ ] activities in 60-day-old rats. In the cerebral cortex, citrulline 2.5 and 5.0 mM decreased GSH-Px activity [ $F(3,24)=4.859$ ;  $p<0.01$ ], but did not alter CAT [ $F(3,24)=0.756$ ;  $p>0.05$ ] and SOD [ $F(3,24)=2.,284$ ;  $p>0.05$ ] activities in 30-day-old rats. On the other hand, citrulline 5.0 mM decreased CAT [ $F(3,24)=5.673$ ;  $p<0.01$ ] and increased SOD [ $F(3,24)=5.747$ ;  $p<0.01$ ]; and at concentrations of 2.5 and 5.0 mM increased GSH-Px [ $F(3,24)=7.159$ ;  $p<0.01$ ] in the cerebral cortex of 60-day-old rats.

### **3.2 *In vitro* effects of ammonia on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrum of rats**

Subsequently, the *in vitro* effects of different concentrations of ammonia (0.01, 0.1 and 1.0 mM) on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of 30- and 60-day-old rats were also analyzed. Table 3 shows that ammonia did not alter TBA-RS in the cerebral cortex ([ $F(3,20)=0.150$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,20)=0.211$ ;  $p>0.05$ ], hippocampus [ $F(3,20)=2.798$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,20)=2.118$ ;  $p>0.05$ ], or cerebellum [ $F(3,20)=0.495$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,20)=0.974$ ;  $p>0.05$ ] in 30- and 60-day-old rats, respectively. However, 0.1 and 1.0 mM ammonia [ $F(3,20)=17.721$ ;  $p<0.001$ ] and 1.0 mM ammonia [ $F(3,20)=4.643$ ;  $p<0.05$ ] reduced total sulfhydryl content (Table 3) in the cerebral cortex

of 30- and 60-day-old rats, respectively, but did not alter this parameter in the hippocampus [ $F(3,20)=2.398$ ;  $p>0.05$ ] and  $F(3,20)=0.332$ ;  $p>0.05$ ] or cerebellum [ $F(3,20)=1.158$ ;  $p>0.05$ ] and  $F(3,20)=0.319$ ;  $p>0.05$ ] of 30- and 60-day-old rats, respectively. With regard to antioxidant enzymes (Table 4), ammonia did not alter CAT activity [ $F(3,20)=0.266$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,20)=1.921$ ;  $p>0.05$ ] in the cerebral cortex, [ $F(3,20)=1.343$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,20)=1.790$ ;  $p>0.05$ ] in the hippocampus or [ $F(3,20)=0.904$ ;  $p>0.05$ ] and [ $F(3,20)=1.762$ ;  $p>0.05$ ] in the cerebellum of 30- and 60-day-old rats, respectively. Ammonia (1.0 mM) increased SOD activity [ $F(3,20)=73.907$ ;  $p<0.001$ ] in the cerebellum, but did not alter this enzyme's activity in the cerebral cortex [ $F(3,20)=0.547$ ;  $p>0.05$ ] or hippocampus [ $F(3,20)=1.604$ ;  $p>0.05$ ] of 30-day-old rats. In contrast, 1.0 mM ammonia increased SOD activity in the cerebellum [ $F(3,20)=8.045$ ;  $p<0.01$ ] and hippocampus [ $F(3,20)=5.669$ ;  $p<0.01$ ], but did not alter its activity in the cerebral cortex [ $F(3,20)=1.238$ ;  $p>0.05$ ] of 60-day-old rats. Ammonia (1.0 mM) decreased GSH-Px activity in the cerebellum [ $F(3,20)=7.954$ ;  $p<0.01$ ], but did not alter GSH-Px activity in the cerebral cortex [ $F(3,20)=0.716$ ;  $p>0.05$ ] or hippocampus [ $F(3,20)=0.443$ ;  $p>0.05$ ] of 30-day-old rats, or in the cerebral cortex [ $F(3,20)=2.563$ ;  $p>0.05$ ], hippocampus [ $F(3,20)=1.095$ ;  $p>0.05$ ] or cerebellum [ $F(3,20)=0.051$ ;  $p>0.05$ ] of 60-day-old rats.

### **3.3 Influence of resveratrol on the effects elicited by citrulline and ammonia in the cerebrum of rats**

Finally, this study evaluated whether the alterations, caused by citrulline and ammonia (*in vitro*), in TBA-RS, total sulfhydryl content and in the activities of antioxidant enzymes in the cerebrum of rats were mediated by the generation of free radicals. To this end, we examined the effect of the antioxidant, resveratrol (0.01, 0.1 and 0.5 mM), on the alterations in these parameters that were induced by citrulline and ammonia. As can be seen in Fig. 1A, in 30-day-old rats, 0.1 and 0.5 mM resveratrol reduced TBA-RS and 0.01, 0.1 and 0.5 mM resveratrol prevented the increase in TBA-RS levels caused by 5.0 mM citrulline in the cerebellum [ $F(7,40)=58.128$ ;  $p<0.001$ ] of rats. In addition, resveratrol partially prevented, and 0.5 mM resveratrol totally prevented, the increase in SOD activity caused by 5.0 mM citrulline (Fig. 1B) [ $F(7,40)=8.855$ ;  $p<0.001$ ] in the hippocampus. With regard to GSH-Px activity, 0.1 and 0.5 mM resveratrol prevented the reduction caused by 2.5 and 5.0 mM citrulline in the

cerebral cortex (Fig. 1C) [F(11,60)= 6.610; p<0.001], the reduction caused by 5.0 mM citrulline in the hippocampus (Fig. 1D) [F(7,40)=10,158; p<0,001] and resveratrol (0.01, 0.1 and 0.5 mM) prevented the increase caused by 5.0 mM citrulline in the cerebellum (Fig. 1E) [F(7,40)=3.349; p<0.01] of rats. In 60-day-old rats, resveratrol, at all concentrations used, reduced TBA-RS and prevented the increase in TBA-RS levels caused by 2.5 and 5.0 mM citrulline in the cerebral cortex (Fig. 1F) [F(11,60)=41.211; p<0.001] and cerebellum (Fig. 1G) [F(11,60)=40.386; p<0.001]. For SOD activity, 0.1 and 0.5 mM resveratrol prevented the increase caused by 2.5 and 5.0 mM citrulline in the cerebellum (Fig. 1H) [F(11,60)=18.248; p<0.001] and 0.01 mM resveratrol partially prevented and 0.1 and 5.0 mM resveratrol totally prevented the increase in SOD activity caused by 5.0 mM citrulline in the rat cerebral cortex (Fig. 1I) [F(7,40)=6.199; p<0.001]. Furthermore, 0.1 and 0.5 mM resveratrol prevented the increase caused by 2.5 and 5.0 mM citrulline in GSH-Px activity (Fig. 1J) [F(11,48)=6.589; p<0.001] and the reduction in CAT activity (Fig. 1K) [F(7,40)=6.768; p<0.001] caused by 5.0 mM citrulline. With regard to ammonia, 0.1 and 0.5 mM prevented the reduction caused by 0.1 and 1.0 mM ammonia in total sulfhydryl content in the cerebral cortex (Fig. 2A) [F(11,60)=17.098; p<0.001] and the increase caused by 1.0 mM ammonia in the activity of SOD in the cerebellum (Fig. 2B) [F(7,40)=6.322; p<0.001]. In addition, resveratrol (0.01, 0.1 and 0.5 mM) prevented the decrease in GSH-Px activity caused by 1.0 mM ammonia in the cerebellum (Fig. 2C) [F(7,40)=14.011; p<0.001] of 30-day-old rats. With regard to 60-day-old rats, resveratrol (0.01, 0.1 and 0.5 mM) prevented the decrease caused by 1.0 mM ammonia in total sulfhydryl content in the cerebral cortex (Fig. 2D) [F(7,40)=9.216; p<0.001], 0.1 and 0.5 mM resveratrol prevented the increase induced by 1.0 mM ammonia in SOD activity in the cerebellum (Fig. 2E) [F(7,40)=13.163; p<0.001]. Additionally, 0.01 mM resveratrol partially prevented, while 0.1 and 0.5 mM resveratrol totally prevented, the increase in SOD activity in the hippocampus of 60-day-old rats (Fig. 2F) [F(7,40)=11.686; p<0.001].

#### 4 DISCUSSION

Considering that the pathophysiology of CTLN1 is not very well established, the objective of the present study was to investigate the *in vitro* effects of citrulline and ammonia, as well as the influence of the antioxidant, resveratrol, on oxidative stress

biomarkers in the cerebrum of 30- and 60 day-old rats. To our knowledge, these parameters have not been investigated, thus far, in the cerebrum in this disorder and there is a lack of studies in this area. According to the literature, the pathophysiology of CTLN1 is believed to be related, in part, to the accumulation of ammonia and citrulline, especially in brain cells, and to the release of free radicals and depletion of antioxidant defenses [5,8].

The citrulline and ammonia concentrations tested in this study were 0.1, 2.5, 5.0 mM and 0.01, 0.1 and 1.0 mM, respectively, according to the experimental protocol of Prestes *et al.* [5]. The range of citrulline concentrations used covers values similar to those observed in citrullinemic patients [20]. Initially, we investigated the *in vitro* effects of different concentrations of citrulline (0.1, 2.5 and 5.0 mM) and ammonia (0.01, 0.1 and 1.0 mM) on different parameters of oxidative stress, such as TBA-RS, total sulfhydryl content, as well the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30- and 60-day-old rats. With regard to citrulline, results showed that none of the concentrations altered the total sulfhydryl content in the cerebrum of 30- and 60-day-old rats.

In contrast, ammonia (0.1 and 1.0mM, and 1.0 mM) significantly reduced total sulfhydryl content in the cerebral cortex of 30- and 60-day-old rats, respectively. In addition, 5.0 mM citrulline significantly enhanced TBA-RS in the cerebellum of 30-day-old rats, and 2.5 and 5.0 mM citrulline increased TBA-RS in the cerebral cortex and cerebellum of 60-day-old rats. However, our results showed that none of the concentrations of ammonia used altered TBA-RS in the cerebrum of rats. TBA-RS are an important parameter of lipoperoxidation and are indicative of damage to membrane lipids. Since lipoperoxidation can induce changes in the membrane's lipid structure, reducing its selectivity for ionic transport and signaling, and impairing its permeability and cellular transport, these alterations in excess can result in cell death due to the release of hydrolytic enzymes and the formation of cytotoxic products, such as malondialdehyde [27–29]. Total sulfhydryl content, on the other hand, is a very important indicator of damage to protein. Alterations in protein structures lead to an increase of its fragmentation, aggregation, and susceptibility to degradation by proteasomes [28,29]. These data suggest that both 30- and 60-day-old rats are more susceptible to lipoperoxidation caused by citrulline, *in vitro*, while ammonia is more

likely to cause damage to proteins in rats of both ages. Thus, damage to lipid membranes and to proteins occurs in this disorder.

Our findings also indicate that citrulline (at 5.0 mM), in the hippocampus, enhanced SOD and decreased GSH-Px activities in 30-day-old rats, but did not alter CAT activity; while in the cerebellum, 5.0 mM citrulline increased the activity of GSH-Px, but did not alter CAT and SOD activities. With regard to the cerebral cortex, 2.5 mM and 5.0 mM citrulline decreased GSH-Px activity, but did not alter the activities of CAT and SOD. In the hippocampus of 60-day-old rats, citrulline did not alter any of the enzymes' activities at any of the concentrations used. On the other hand, in the cerebellum, citrulline (2.5 and 5.0 mM) increased the activity of SOD, but did not alter the activities of CAT and GSH-Px. In the cerebral cortex, citrulline (2.5 and 5.0 mM) elevated the activity of GSH-Px, but did not alter the activities of CAT and SOD, while at the concentration of 5.0 mM, it decreased the activity of CAT and enhanced the activity of SOD.

With regard to ammonia, results showed that none of the concentrations used altered the activities of the antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the hippocampus or cerebral cortex of 30-day-old rats. However, in the cerebellum, ammonia at a concentration of 1.0 mM, enhanced the activity of the SOD enzyme and decreased GSH-Px activity, but did not alter CAT activity. In addition, 1.0 mM ammonia increased the activity of the SOD enzyme in the hippocampus and the cerebellum of 60-day-old rats, but did not alter the activities of CAT and GSH-Px. Our results also showed that none of the concentrations of ammonia studied altered the enzymes' activities in the cerebral cortex of 60-day-old rats.

Consistent with our data, Kosenko *et al.* (1997) demonstrated that *in vivo* exposure of the adult rat brain to acute ammonia intoxication increased superoxide radical levels, which may partly explain the increase in SOD activity [8]. According to Travacio and Llesuy (1996), increased activity of antioxidant enzymes may occur in response to oxidative stress, in order to reduce the damage caused by free radicals [30]. As such, it may be assumed that citrulline and ammonia alter antioxidant defenses in some cerebral structures, *in vitro*, since they increased SOD activity, decreased CAT activity and increased/decreased GSH-Px activity under certain conditions. Data from this study also suggest that the alterations in the enzymes' activities are due to an increase in superoxide anion levels and, consequently hydrogen peroxide production.

These reactive oxygen species may cross lipid membranes, reacting with iron-bound proteins, and damage molecules via the generation of new oxygen reactive species, such as the hydroxyl radical (OH $\cdot$ ) [27,29,31].

Studies carried out by Barbosa *et al.* (2010) [32] have shown that, when oxidative stress is installed (either due to an increase in the formation of free radicals or due to alterations in the activities of antioxidant systems), several biomolecules may lose their functions due to lipoperoxidation, oxidative damage or DNA and protein damage [31–33]. As such, we have demonstrated that citrulline and ammonia induce oxidative stress, generating lipoperoxidation, damage to protein and alterations in the activities of antioxidant defenses. Our study also suggests that, in 30 day-old rats, the cerebellum is more susceptible to the *in vitro* oxidative stress caused by citrulline and ammonia, when compared to the other structures studied, and that the cerebral cortex of 60-day-old rats is more susceptible to the oxidative stress caused by citrulline *in vitro*. In addition, 60-day-old rats were more susceptible to oxidative damage, suggesting that susceptibility of tissue to damage increases with advancing age.

To prevent the negative effects of oxidative stress on lipoperoxidation, protein and DNA damage, the use of antioxidants may be necessary in some disease conditions. This study also evaluated whether the alterations in TBA-RS, total sulfhydryl content and antioxidant enzyme activities, caused by citrulline and ammonia (*in vitro*), in the cerebrum of rats were mediated by the generation of free radicals. For this, we examined the influence of the antioxidant, resveratrol (0.01, 0.1 and 0.5 mM), on the effects of citrulline and ammonia on these parameters. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a component of the polyphenols present in many plant species, such as grapes and red wine. This compound was originally identified as the active ingredient of an Oriental herb (Kojoka) that was used for the treatment of a wide variety of diseases, including dermatitis, gonorrhea, fever, hyperlipidemia, arteriosclerosis and inflammation [34]. Several studies have demonstrated the antioxidant effects of resveratrol [35]; these properties result from the molecule's chemical structure, which imparts the ability to transfer hydrogen atoms or electrons to free radicals, inhibiting peroxidation and protecting lipids, protein and cellular DNA from possible oxidative damage [36]. In addition, resveratrol's antioxidant activity derives from its ability to compete with coenzyme Q for the free radical formation site, neutralizing the reactive oxygen species formed in the mitochondria, and its inhibition of the lipoperoxidation



resulting from the products of the Fenton reaction [13–16]. This amphipathic molecule is capable of scavenging lipid hydroperoxyl free radicals, as well as hydroxyl and superoxide anion radicals [37].

According to Cavallaro *et al.* (2003), increasing the concentration of resveratrol may increase its antioxidant properties. In addition, inhibition of superoxide anion generation was demonstrated at low and high concentrations of resveratrol [38]. Accordingly, Meherzia Mokni *et al.* (2007) reported that resveratrol exhibited decreased brain lipoperoxidation, while simultaneously upregulating SOD and CAT [39]. With regard to the influence of resveratrol on the effects elicited by citrulline and ammonia, our analyses showed that this antioxidant alters the parameters analyzed in almost all concentrations used (0.01, 0.1 and 0.5 mM). Resveratrol was able to decrease (at 0.1 and 0.5 mM) and to prevent the increase (at 0.01, 0.1 and 0.5 mM) in TBA-RS caused by 5.0 mM citrulline in the cerebellum of 30-day-old rats. In the cerebral cortex and cerebellum of 60-day-old rats, resveratrol (at all concentrations used) was able to decrease and to prevent the increase in TBA-RS caused by 2.5 and 5.0 mM citrulline. Studies carried out by Lucie Frémont *et al.* (1998) [40] have shown that resveratrol inhibits the oxidation of phospholipid liposomes at various concentrations. With regard to ammonia toxicity, resveratrol (0.1 and 0.5 mM) prevented the reduction in the total sulfhydryl content caused by 0.1 and 1.0 mM ammonia in the cerebral cortex of 30-day-old rats. Furthermore, in 60-day-old rats, all concentrations of resveratrol were able to prevent the reduction of total sulfhydryl content caused by 1.0 mM ammonia in the cerebral cortex.

With regard to the activities of the antioxidant enzymes, in 30-day-old rats, resveratrol (0.1 mM and 0.5 mM) partially and totally prevented, respectively, the increase in SOD activity in the hippocampus that was caused by 5.0 mM citrulline. In 60-day-old rats, resveratrol (0.1 and 0.5 mM) also prevented the increase in SOD activity induced by citrulline (2.5 and 5.0 mM) in the cerebellum, and at concentrations of 0.01, 0.1 and 0.5 mM, was able to partially and totally prevent this alteration in the cerebral cortex (caused by 5.0 mM citrulline). Resveratrol (0.1 and 0.5 mM) also prevented the increase in SOD activity, caused by 1.0 mM ammonia, in the cerebellum of 30- and 60-day-old rats, while resveratrol (0.1 and 0.5 mM) prevented the decrease in GSH-Px activity, caused by citrulline (2.5 and 5.0 mM), in the cerebral cortex and hippocampus of 30-day-old rats. This antioxidant, at all concentrations, was also able

to prevent the increase and reduction in GSH-Px activity caused by 5.0 mM citrulline and 1.0 mM ammonia in the cerebellum of 30-day-old rats. In 60-day-old rats, 0.1 and 0.5 mM resveratrol prevented the increase in GSH-Px activity and the decrease in CAT activity caused by 5.0 mM citrulline in the cerebral cortex, respectively. Furthermore, resveratrol partially prevented (0.01 mM resveratrol) and totally prevented (0.1 and 0.5 mM) the increase in SOD activity in the hippocampus of 60-day-old rats, caused by 1.0 mM ammonia.

In summary, our findings show that citrulline and ammonia, at high concentrations, alter antioxidant defenses in 30- and 60-day-old rats, where citrulline induces lipoperoxidation and ammonia causes oxidative damage to proteins. In addition, we demonstrated that the alterations in these parameters of oxidative stress are probably caused by the increase in the production of free radicals, such as superoxide anion and hydrogen peroxide, since resveratrol, an important antioxidant, prevented most of the effects caused by citrulline and ammonia in the cerebrum of rats. These data suggest that, in addition to the traditional therapeutic approaches used in CTLN1 treatment, supplementation with antioxidants, such as resveratrol, a polyphenol compound, could be used as a therapeutic adjuvant to reduce the oxidative damage caused by the toxic substances that accumulate in CTLN1.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE).

### **5 REFERENCES**

1. Araújo AP de QC. Doenças metabólicas com manifestações psiquiátricas. Rev Psiquiatr Clínica [Internet]. 2004;31(6):285–9. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-60832004000600003&lng=pt&nrm=iso&tlng=em](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-60832004000600003&lng=pt&nrm=iso&tlng=em)
2. El Husny AS, Fernandes-Caldato MC. Erros Inatos do Metabolismo: Revisão de

- Literatura. Rev Para Med. 2006;20(2):41–5.
3. Kose E, Unal O, Bulbul S, Gunduz M, Häberle J, Arslan N. Identification of three novel mutations in fourteen patients with citrullinemia type 1. Clin Biochem [Internet]. 2017;50(12):686–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.01.011>
  4. Herrera Sanchez MB, Previdi S, Bruno S, Fonsato V, Deregibus MC, Kholia S, et al. Extracellular vesicles from human liver stem cells restore argininosuccinate synthase deficiency. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):1–15.
  5. Prestes CC, Sgaravatti AM, Pederzoli CD, Sgarbi MB, Zorzi GK, Wannmacher CMD, et al. Citrulline and ammonia accumulating in citrullinemia reduces antioxidant capacity of rat brain in vitro. Metab Brain Dis. 2006;21(1):63–74.
  6. Raimann E, Cornejo V, Mellibosky D, Lopez ME, Godoy X, Colombo M. Citrulinemia - Casos Clínicos. Rev Chil Pediatr. 1994;65(4):215–8.
  7. Ruder J, Legacy J, Russo G, Davis R. Neonatal citrullinemia: Novel, reversible neuroimaging findings correlated with ammonia level changes. Pediatr Neurol [Internet]. 2014;51(4):553–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.07.010>
  8. Kosenko E, Kaminski Y, Kaminski A, Valencia M, Lee L, Hermegildo C, et al. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. Free Radic Res. 1997;27:637–44.
  9. Clancy R, Chung H. EEG changes during recovery from acute severe neonatal citrullinemia. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1991;78:222–227.
  10. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Rev Inst Adolfo Lutz. 2007;66(1):1–9.
  11. Degáspari CH, Waszczyński N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. Visão Acadêmica. 2004;5(1):33–40.
  12. Achkar MT, Novaes GM, Silva MJD, Vilegas W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: Importância na dieta e na conservação dos alimentos. Rev da Univ Val do Rio Verde [Internet]. 2013;11(2):398–406. Available from: <http://www.revistas.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/1151>
  13. Barros PP, Goncalves GMS, Silva GH da, Bastos MCVD, Ramos LN, Fernandes MM. Lycopene and resveratrol pretreatment did not interfere with the liver of hepatectomized rats. Acta Cirúrgica Bras. 2017;32(3):194–202.
  14. Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H, Buyukbayram H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. World J Gastroenterol. 2008;14(46):7101–6.
  15. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: A molecule whose time

- has come? And gone? Clin Biochem. 1997;30(2):91–113.
16. Su H-C, Hung L-M, Chen J-K. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. Am J Physiol Metab [Internet]. 2006;290:E1339–46. Available from: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00487.2005>
  17. BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulam o inciso VII do § 1o do art 225 da Constituição Fed estabelecendo procedimentos para o uso científico animais; revoga a Lei no 6638, 8 maio 1979; e dá outras Provid. 2008;
  18. Ministério da Ciência, Tecnologia I e C. Legislações do CONCEA. [Internet]. Available from: <http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>
  19. Guide For The Care and Use of Laboratory Animals. 8ª. Washington, DC: The Nacional Academies Press; 2011.
  20. Brusilow SW, Horwich A. Urea cycle enzymes. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8ª. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1909–63.
  21. Dos Santos AQ, Nardim P, Funchal C, De Almeida LM., Jacques-Silva MC, Wofchuk ST, et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. Arch Biochem Biophys. 2006;453:161–7.
  22. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121–6.
  23. Marklund S. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. 3ª. GREENWALD RA, editor. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1985. 243-247 p.
  24. Wendel A. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1981;77:325–33.
  25. Aksenov M, Markersbery W. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2001;302:141–5.
  26. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95(2):351–8.
  27. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Assoc Med Bras [Internet]. 1997;43(1):61–8. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
  28. Silva WJM, Ferrari CKB. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. Rev Bras Geriatr e Gerontol. 2011;14(3):441–51.
  29. Andrade Júnior DR de, Souza RB de, Santos SA dos, Andrade DR de. Os

radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol* [Internet]. 2005;31(1):60–8. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-37132005000100011&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132005000100011&lng=pt&tlng=pt)

30. Travacio M, Llesuy S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Free Radic Res Lati Am*. 1996;48:9–13.
31. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*. 2006;29(1):113–23.
32. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RDCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*. 2010;23(4):629–43.
33. Engers VK, Behling CS, Frizzo MN. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. *Rev Context e Saúde*. 2011;10(20):93–102.
34. Arichi H., Kimura Y., Okuda H., Baba K., Kozawa K., Arichi S. Effects of stilbene components of roots of polygonum Euspidatum Sieb et Zuce on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull*. 1982;30:1766–1779.
35. Rice-Evans CA., Miller NJ., Bolwell PG., Bramley PM., Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*. 1995;22:375–83.
36. Hussein MA. A convenient mechanism for the free radical scavenging activity of resveratrol. *Int J Phytomedicine*. 2011;3(4):459–69.
37. Kahl R. Protective and adverse biological action of phenolic antioxidants. In: Sies H, editor. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. San Diego, CA: Academic Press; 1991. p. 245–73.
38. Cavallaro A, Ainis T, Bottari C, Fimiani V. Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. *Physiol Res*. 2003;52(5):555–62.
39. Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M, Aouani E. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochem Res*. 2007;32(6):981–7.
40. Belguendouz L, Frémont L, Gozzelino MT. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol*. 1998;55(6):811–6.

**Table 1 - *In vitro* effects of citrulline on TBA-RS and Total Sulphydryl Content in the cerebrum of 30- and 60-day-old-rats**

TBA-RS (nmol TBA-RS/ min.mg protein) 30 days	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	1.94 ± 0.45	1.98 ± 0.43	2.19 ± 0.41	3.01 ± 0.72**
	<i>Cerebral Cortex</i>	2.25 ± 0.30	2.50 ± 0.31	2.59 ± 0.45	2.86 ± 0.66
	<i>Hippocampus</i>	2.22 ± 0.43	2.05 ± 0.38	2.35 ± 0.38	2.77 ± 0.58

TBA-RS (nmol TBA-RS/ min.mg protein) 60 days	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	2.07 ± 0.39	1.79 ± 0.36	2.95 ± 0.45***	3.11 ± 0.57***
	<i>Cerebral Cortex</i>	2.09 ± 0.26	1.88 ± 0.16	2.60 ± 0.31***	2.76 ± 0.24***
	<i>Hippocampus</i>	2.71 ± 0.23	2.76 ± 0.17	2.61 ± 0.31	2.84 ± 0.15

Total Sulphydryl Content (nmol TNB/mg protein) 30 days	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	56.05 ± 6.71	59.42 ± 7.12	54.36 ± 7.72	53.99 ± 8.07
	<i>Cerebral Cortex</i>	60.48 ± 4.35	60.34 ± 3.97	60.76 ± 4.87	57.09 ± 5.64
	<i>Hippocampus</i>	46.04 ± 5.26	44.89 ± 4.76	43.30 ± 7.56	43.42 ± 4.79

Total Sulphydryl Content (nmol TNB/mg protein) 60 days	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	54.99 ± 5.14	54.06 ± 8.12	53.20 ± 5.50	52.47 ± 7.43
	<i>Cerebral Cortex</i>	53.15 ± 7.98	57.30 ± 6.79	53.89 ± 7.02	55.00 ± 7.50
	<i>Hippocampus</i>	55.82 ± 7.54	56.67 ± 5.78	57.59 ± 2.30	50.94 ± 7.17

Data are mean ± S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\* p<0.001, compared to control group (Duncan's multiple range test).

**Table 2 - *In vitro* effects of citrulline on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrum of 30- and 60-day-old-rats**

CAT Activity (units/mg protein)	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
<b>30 days</b>	<i>Cerebellum</i>	5.42 ± 0.74	5.51 ± 0.79	5.32 ± 0.93	5.16 ± 1.12
	<i>Cerebral Cortex</i>	3.79 ± 0.43	3.79 ± 0.65	3.56 ± 0.33	3.49 ± 0.33
	<i>Hippocampus</i>	4.04 ± 0.57	3.98 ± 0.84	3.70 ± 0.56	3.66 ± 0.35
CAT Activity (units/mg protein)	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
<b>60 days</b>	<i>Cerebellum</i>	4.2 ± 0.54	4.09 ± 0.57	4.22 ± 0.57	4.32 ± 0.58
	<i>Cerebral Cortex</i>	4.26 ± 0.79	3.79 ± 0.28	4.02 ± 0.37	3.16 ± 0.50**
	<i>Hippocampus</i>	5.09 ± 0.82	4.96 ± 0.63	5.70 ± 0.92	5.54 ± 1.41
SOD Activity (units/mg protein)	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
<b>30 days</b>	<i>Cerebellum</i>	5.46 ± 1.01	5.30 ± 0.74	5.47 ± 0.91	5.14 ± 0.96
	<i>Cerebral Cortex</i>	5.54 ± 0.45	5.54 ± 0.52	6.03 ± 0.25	5.91 ± 0.50
	<i>Hippocampus</i>	6.87 ± 1.18	7.00 ± 1.45	7.27 ± 1.23	9.19 ± 1.67*
SOD Activity (units/mg protein)	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
<b>60 days</b>	<i>Cerebellum</i>	4.85 ± 0.76	5.15 ± 0.57	6.82 ± 0.73**	6.87 ± 1.39**
	<i>Cerebral Cortex</i>	3.99 ± 0.70	4.19 ± 0.77	4.43 ± 0.64	5.46 ± 0.77**
	<i>Hippocampus</i>	5.02 ± 0.50	4.79 ± 0.55	4.61 ± 0.76	4.49 ± 0.89
GSH-Px Activity (units/mg protein)	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
<b>30 days</b>	<i>Cerebellum</i>	14.29 ± 1.14	15.30 ± 1.34	15.76 ± 1.42	17.91 ± 2.11**
	<i>Cerebral Cortex</i>	16.44 ± 0.46	16.32 ± 1.11	15.20 ± 0.90**	14.94 ± 1.04**
	<i>Hippocampus</i>	15.69 ± 1.30	15.43 ± 2.03	13.90 ± 1.07	12.34 ± 1.80**
GSH-Px Activity (units/mg protein)	Citrulline concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.1 mM	2.5 mM	5.0 mM
<b>60 days</b>	<i>Cerebellum</i>	16.86 ± 1.77	15.80 ± 2.48	14.33 ± 2.21	14.50 ± 1.60
	<i>Cerebral Cortex</i>	15.60 ± 0.79	15.61 ± 1.13	18.86 ± 2.65**	19.27 ± 2.60**
	<i>Hippocampus</i>	22.03 ± 2.37	20.30 ± 2.62	21.51 ± 3.36	20.87 ± 2.79

Data are mean ± S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\* p<0.001, compared to control group (Duncan's multiple range test).

**Table 3 - *In vitro* effects of ammonia on TBA-RS and Total Sulphydryl Content in the cerebrum of 30- and 60-day-old-rats**

TBA-RS (nmol TBA-RS/min.mg protein) 30 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	2.39 ± 0.30	2.04 ± 0.41	2.17 ± 0.44	2.78 ± 0.66
	<i>Cerebral Cortex</i>	2.47 ± 0.63	2.50 ± 0.30	2.56 ± 0.48	2.66 ± 0.61
	<i>Hippocampus</i>	2.62 ± 0.39	2.35 ± 0.57	2.47 ± 0.55	2.66 ± 0.44

TBA-RS (nmol TBA-RS/min.mg protein) 60 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	1.93 ± 0.20	2.05 ± 0.33	1.80 ± 0.16	1.88 ± 0.30
	<i>Cerebral Cortex</i>	2.24 ± 0.23	2.38 ± 0.50	2.25 ± 0.19	2.35 ± 0.50
	<i>Hippocampus</i>	2.70 ± 0.23	2.70 ± 0.24	2.66 ± 0.20	2.95 ± 0.22

Total Sulphydryl Content (nmol TNB/mg protein) 30 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	48.28 ± 6.78	45.74 ± 4.33	42.58 ± 5.98	44.70 ± 3.99
	<i>Cerebral Cortex</i>	41.45 ± 5.11	37.76 ± 3.93	31.88 ± 3.02***	25.38 ± 4.04***
	<i>Hippocampus</i>	53.69 ± 2.26	50.85 ± 3.02	50.34 ± 5.76	47.08 ± 5.11

Total Sulphydryl Content (nmol TNB/mg protein) 60 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	39.21 ± 5.19	39.18 ± 6.79	41.19 ± 5.16	38.03 ± 5.45
	<i>Cerebral Cortex</i>	50.95 ± 4.06	49.52 ± 4.03	47.28 ± 6.07	39.96 ± 7.34*
	<i>Hippocampus</i>	44.12 ± 4.08	44.56 ± 5.36	42.14 ± 6.56	42.52 ± 3.64

Data are mean ± S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\* p<0.001, compared to control group (Duncan's multiple range test).



**Table 4 - *In vitro* effects of ammonia on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrum of 30- and 60-day-old-rats**

CAT Activity (units/mg protein) 30 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	4.30 ± 0.36	4.19 ± 0.48	3.98 ± 0.49	4.42 ± 0.56
	<i>Cerebral Cortex</i>	3.96 ± 0.38	4.05 ± 0.29	3.93 ± 0.22	4.05 ± 0.22
	<i>Hippocampus</i>	4.22 ± 0.37	4.46 ± 0.47	4.51 ± 0.59	4.79 ± 0.52

CAT Activity (units/mg protein) 60 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	3.41 ± 0.59	3.95 ± 0.60	3.45 ± 0.45	3.92 ± 0.50
	<i>Cerebral Cortex</i>	3.93 ± 0.42	3.67 ± 0.29	3.47 ± 0.35	3.32 ± 0.70
	<i>Hippocampus</i>	3.47 ± 0.75	3.35 ± 0.24	4.02 ± 0.56	3.80 ± 0.56

SOD Activity (units/mg protein) 30 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	5.04 ± 0.41	5.43 ± 0.50	5.50 ± 0.30	8.05 ± 0.33***
	<i>Cerebral Cortex</i>	5.46 ± 0.62	5.12 ± 0.56	5.56 ± 0.64	5.30 ± 0.73
	<i>Hippocampus</i>	5.16 ± 0.64	4.89 ± 0.24	4.53 ± 0.56	5.05 ± 0.59

SOD Activity (units/mg protein) 60 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	6.05 ± 0.27	6.28 ± 0.47	6.50 ± 0.73	7.60 ± 0.76**
	<i>Cerebral Cortex</i>	6.62 ± 0.76	6.70 ± 0.82	5.71 ± 1.31	6.68 ± 1.22
	<i>Hippocampus</i>	5.65 ± 0.25	5.90 ± 0.25	6.25 ± 0.62	6.88 ± 0.83**

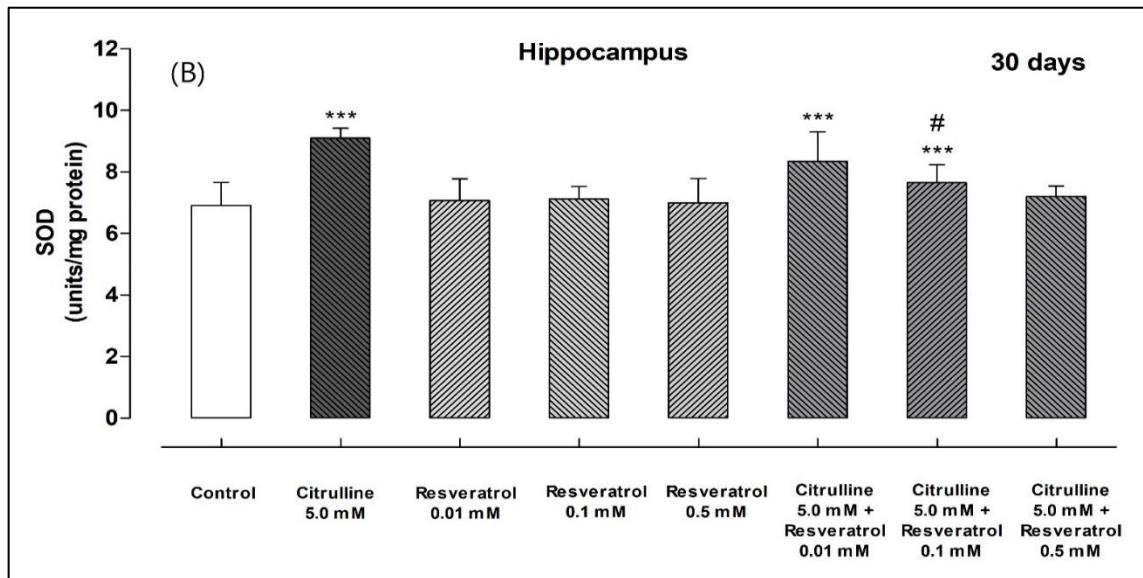
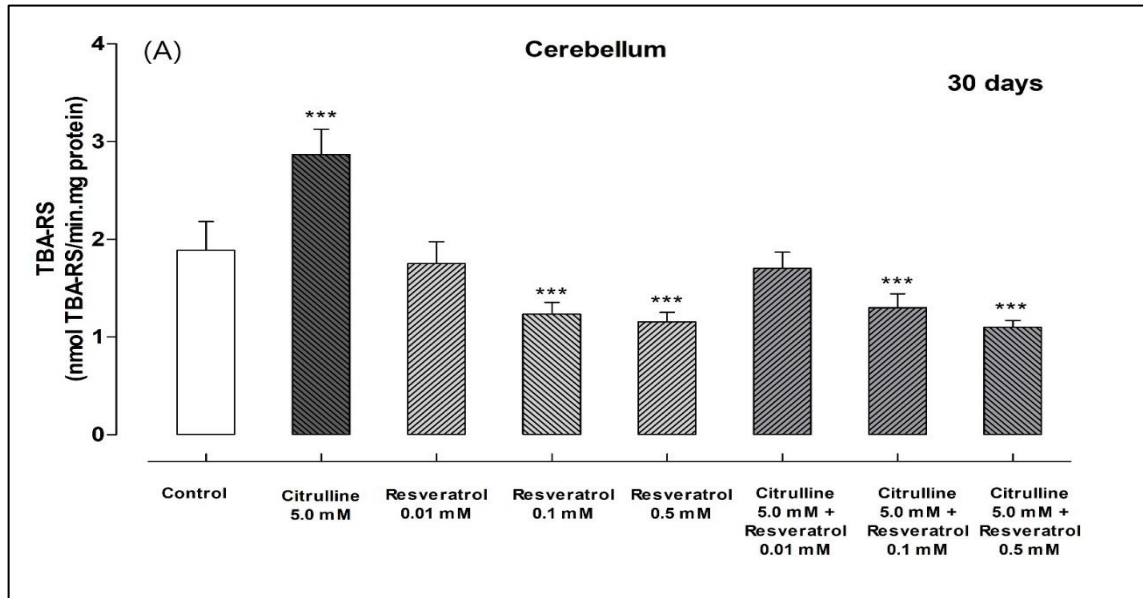
GSH-Px Activity (units/mg protein) 30 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	14.93 ± 2.09	14.18 ± 1.15	13.34 ± 1.10	10.86 ± 1.60**
	<i>Cerebral Cortex</i>	17.22 ± 2.03	18.00 ± 2.32	16.48 ± 1.89	16.14 ± 3.13
	<i>Hippocampus</i>	16.06 ± 1.58	16.30 ± 1.58	15.37 ± 1.07	15.67 ± 1.73

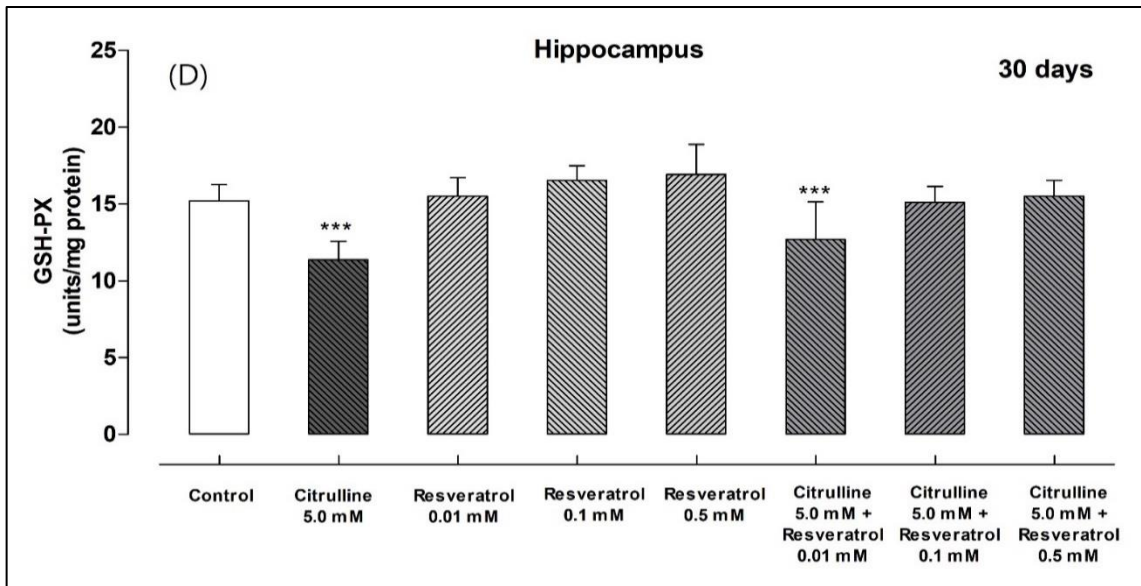
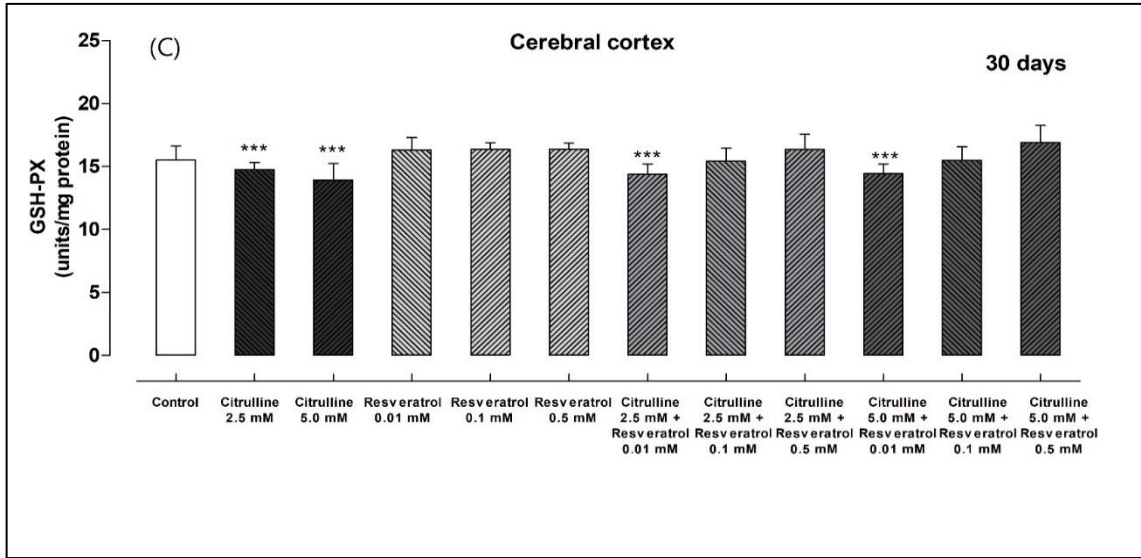
  

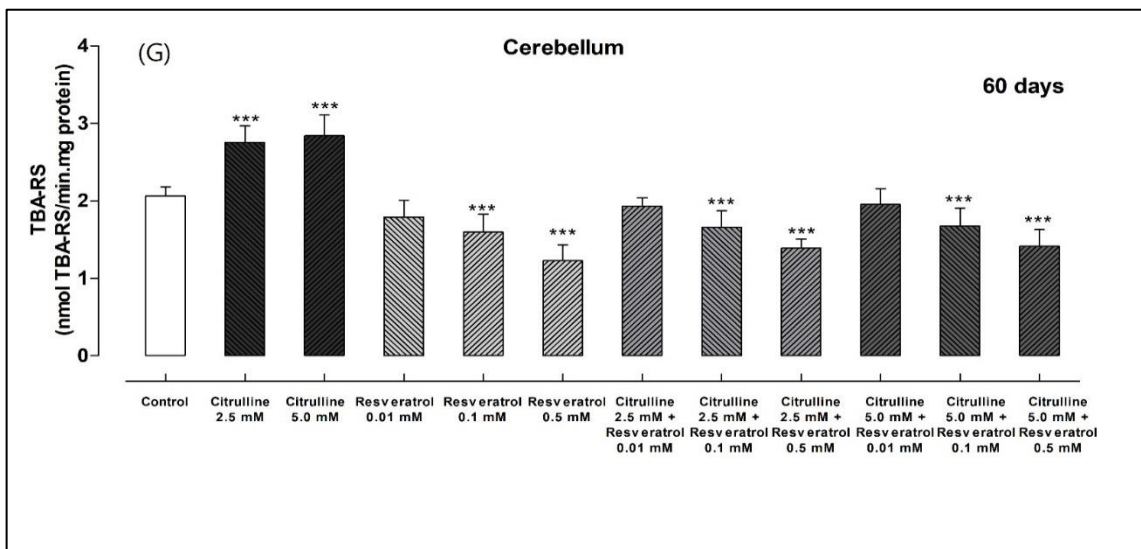
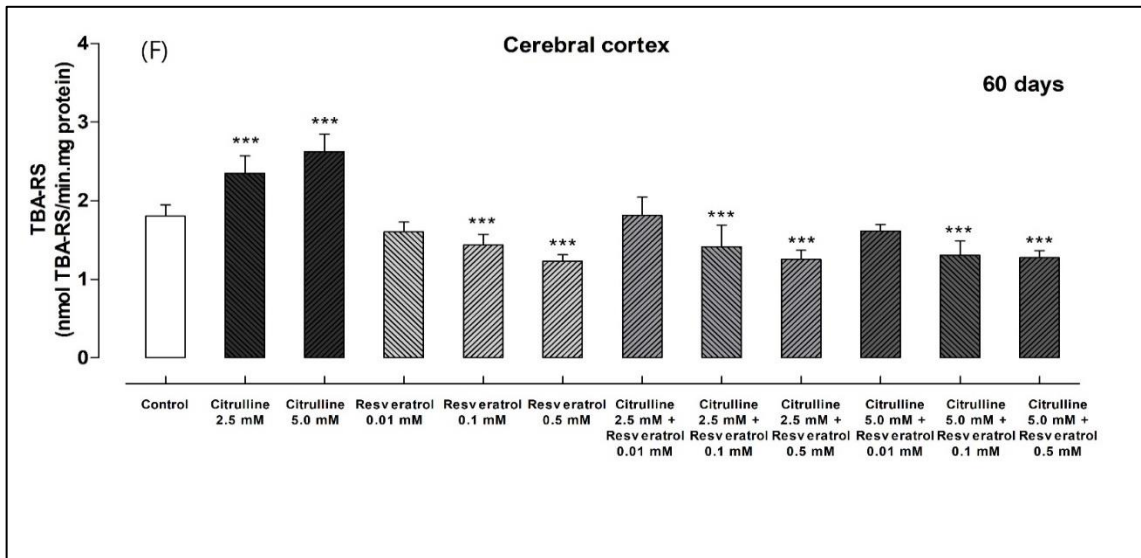
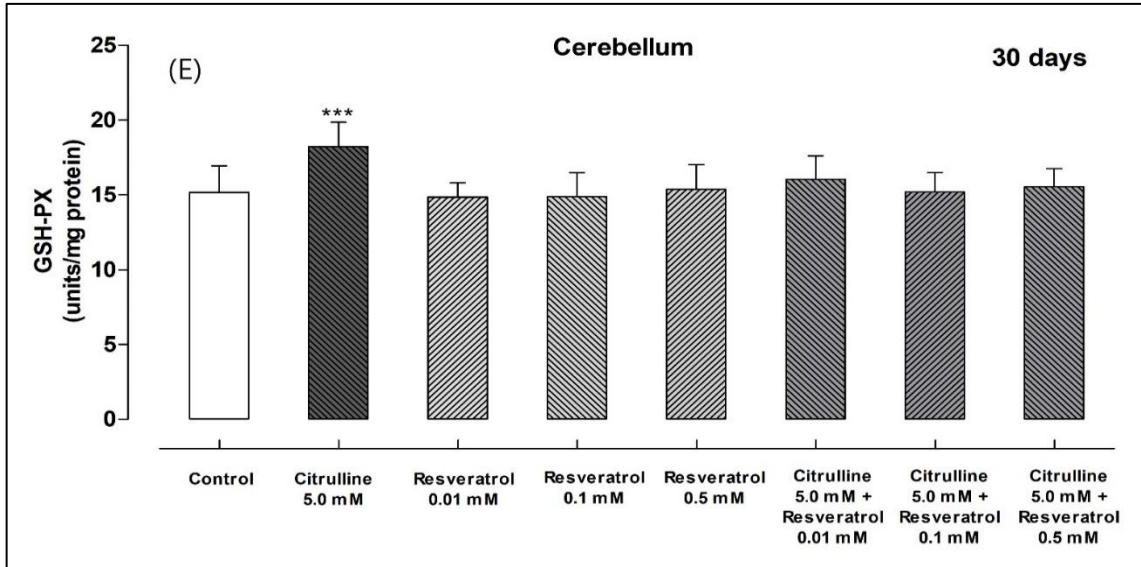
GSH-Px Activity (units/mg protein) 60 days	Ammonia concentration				
	Brain Structure	0.0 mM	0.01 mM	0.1 mM	1.0 mM
	<i>Cerebellum</i>	18.55 ± 1.50	18.52 ± 1.03	18.70 ± 2.10	18.83 ± 1.52
	<i>Cerebral Cortex</i>	15.57 ± 1.02	16.60 ± 0.88	15.15 ± 1.29	16.38 ± 0.94
	<i>Hippocampus</i>	21.10 ± 2.33	20.82 ± 2.28	20.07 ± 2.31	18.92 ± 2.21

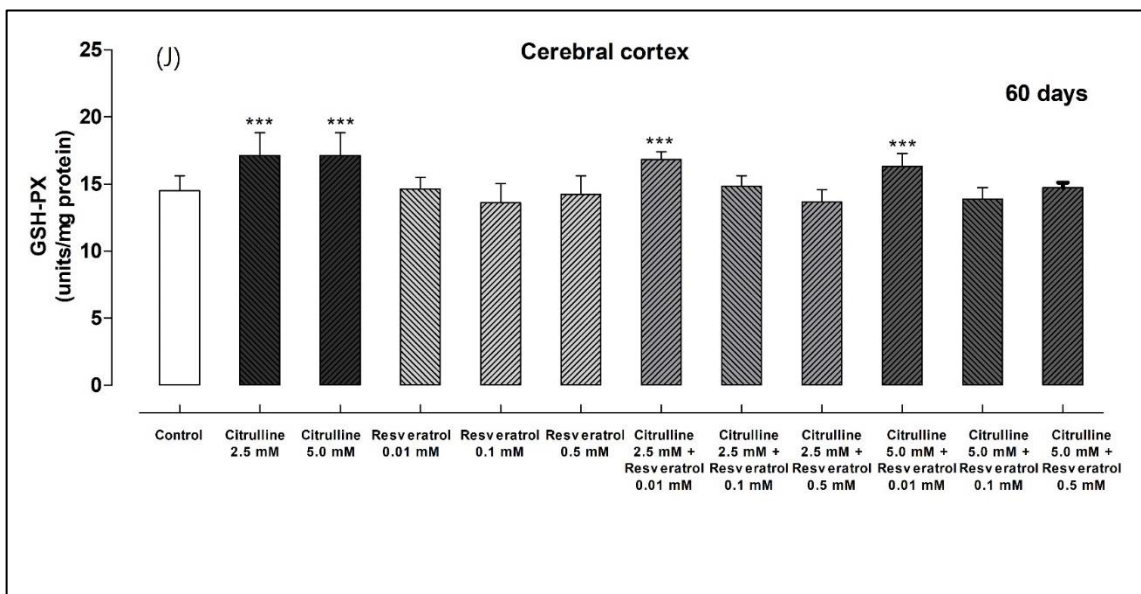
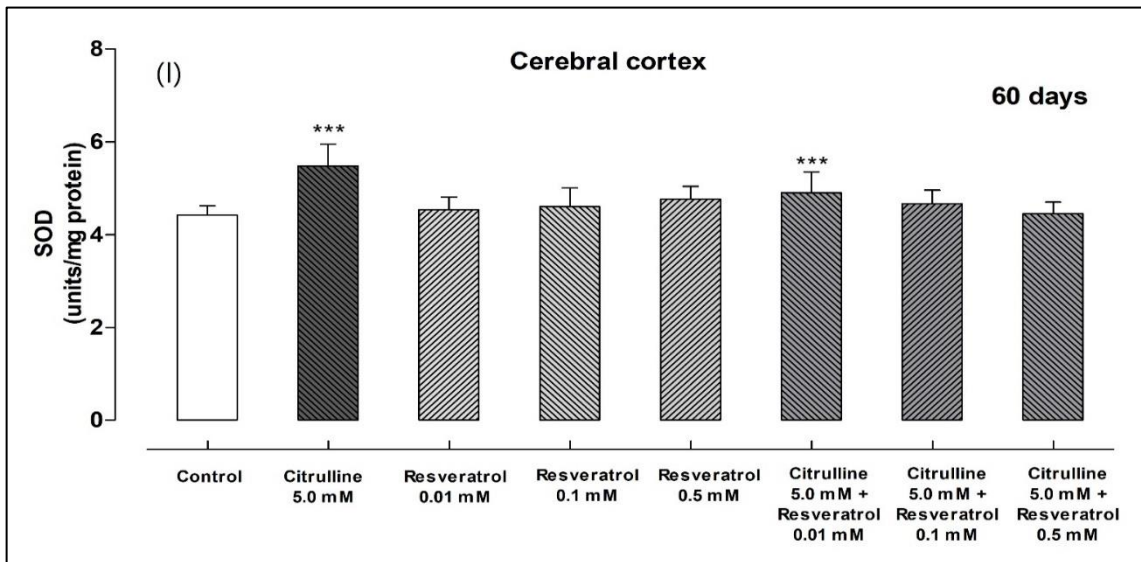
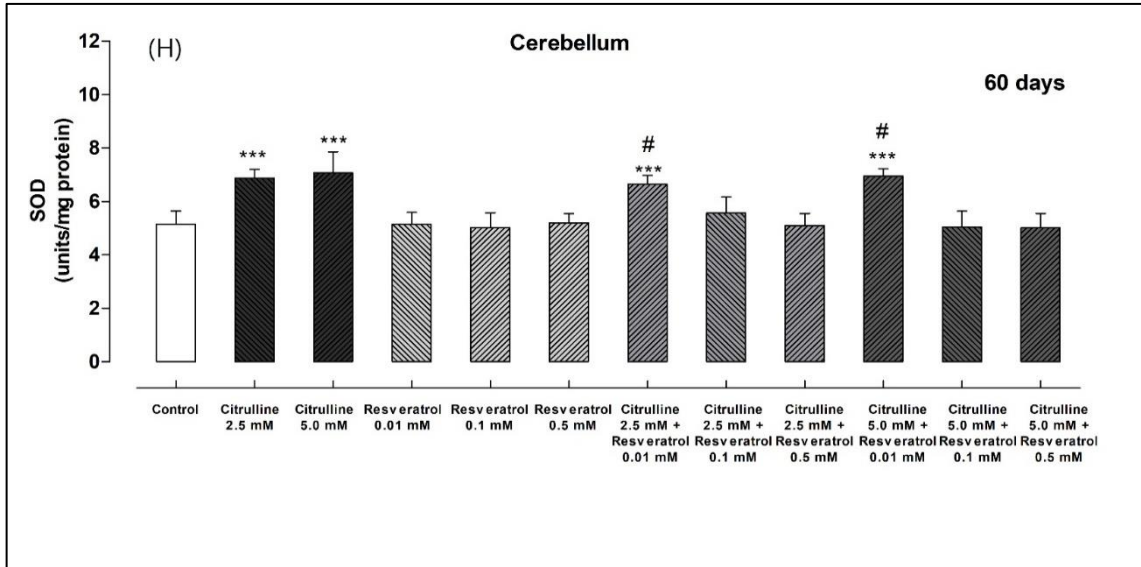
Data are mean ± S.D. for seven independent experiments performed in duplicate. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\* p<0.001, compared to control group (Duncan's multiple range test).

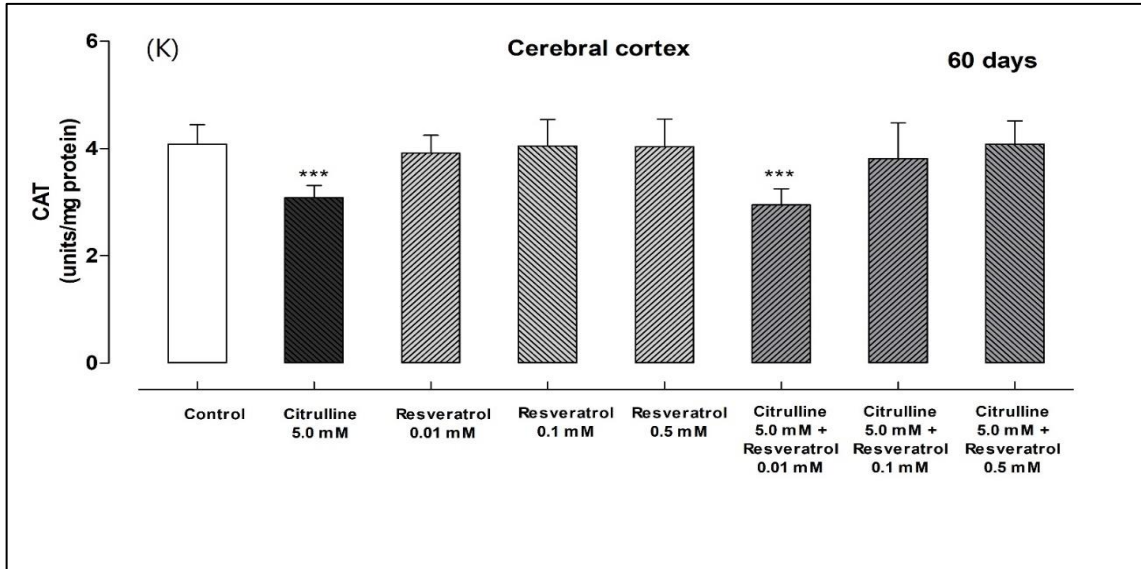
Fig. 1. Influence of resveratrol on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrum of rats elicited by citrulline (*in vitro*)



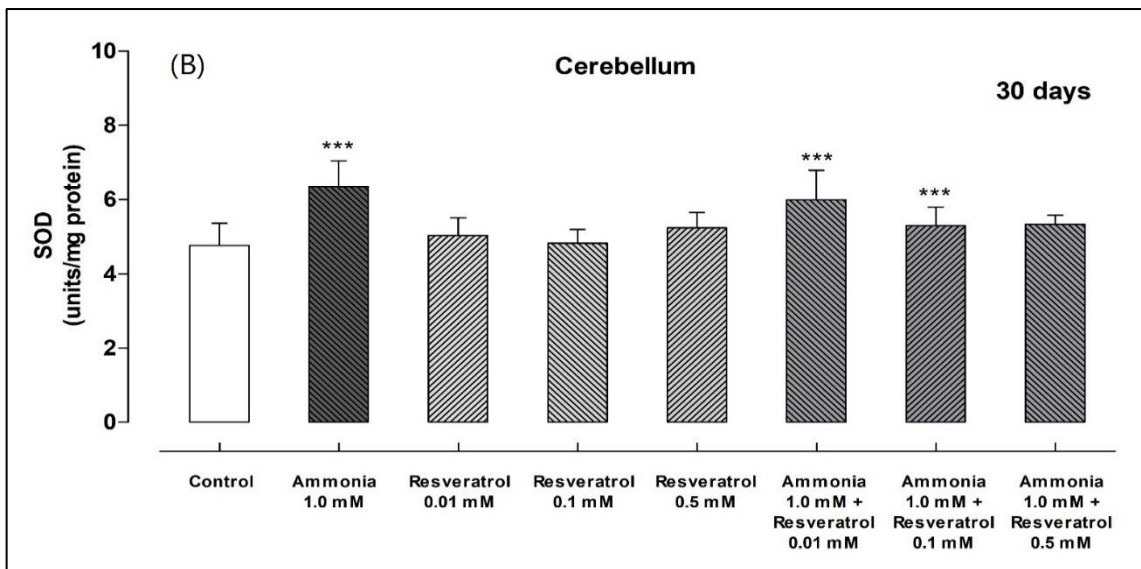
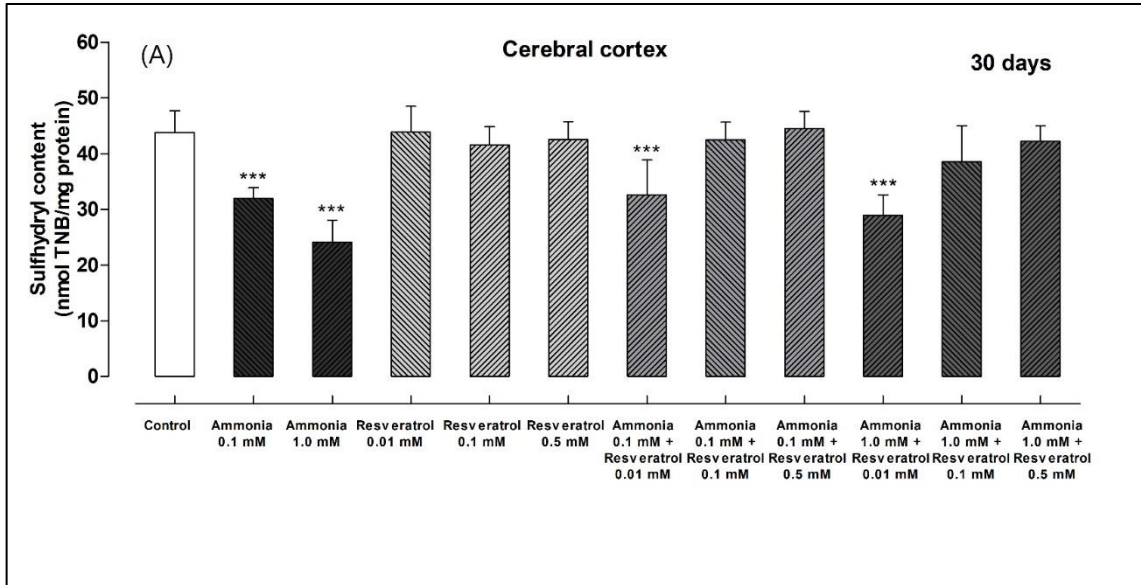


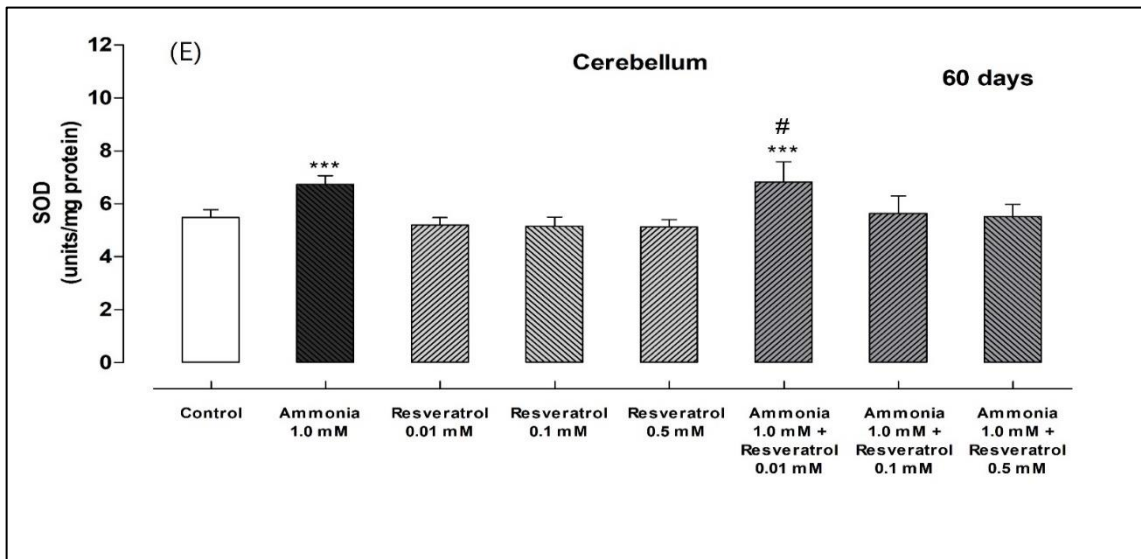
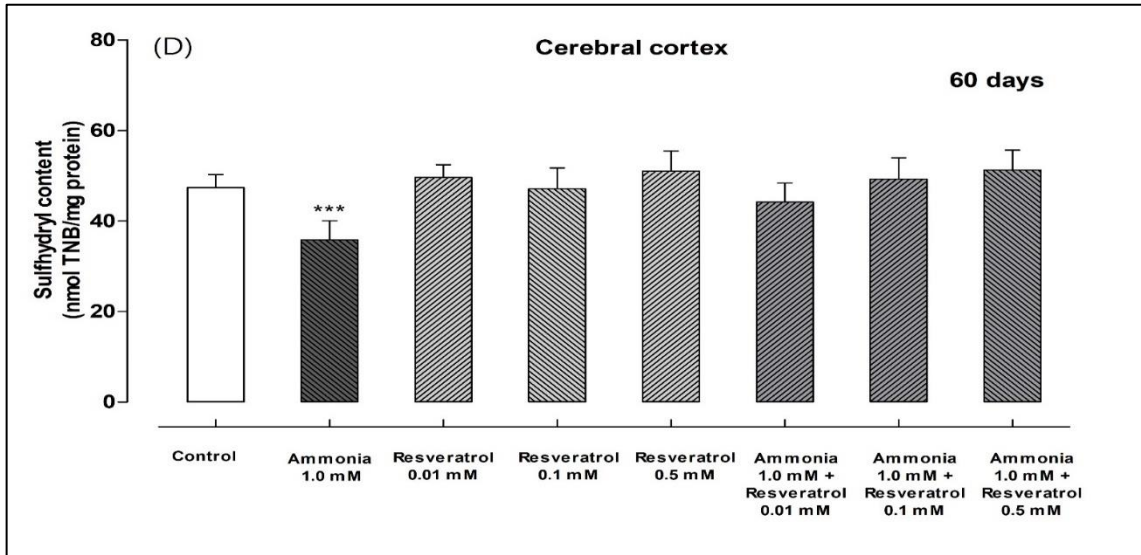
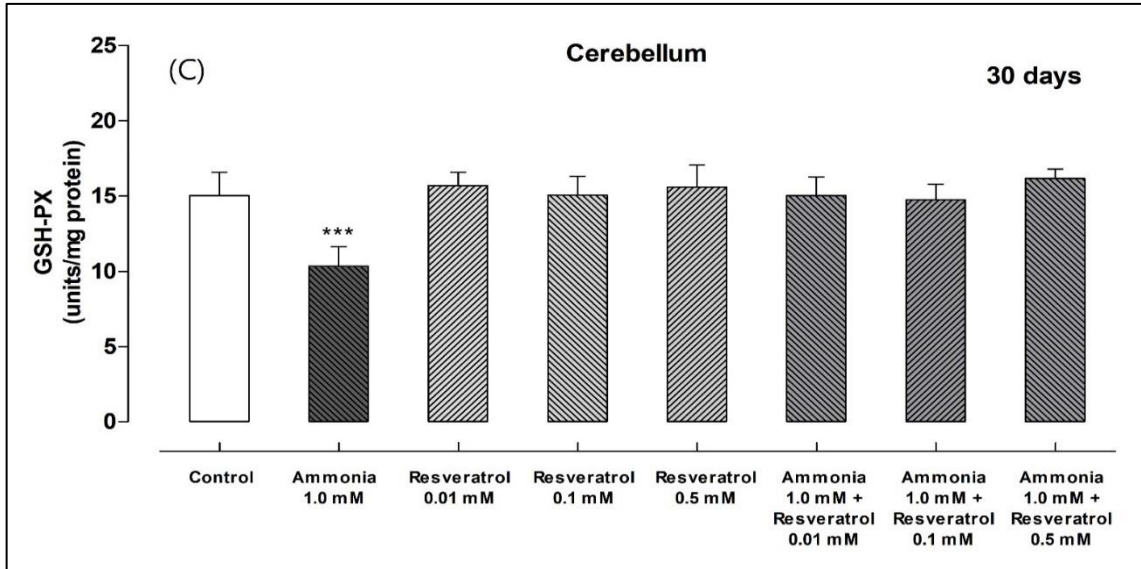




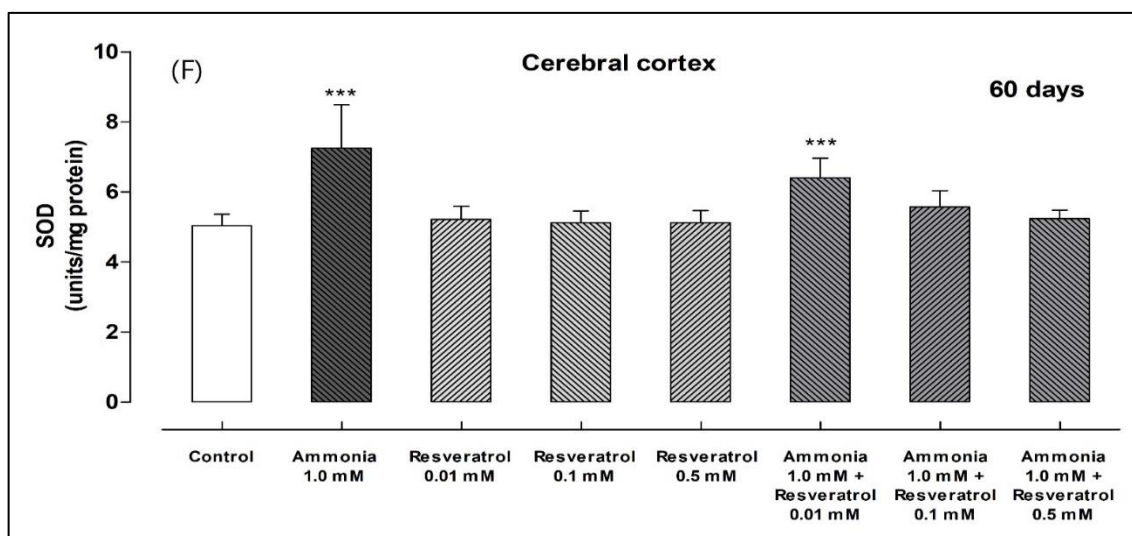


**Fig. 2. Influence of resveratrol on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrum of rats elicited by ammonia (*in vitro*)**









### Legends to figures

Table 1. *In vitro* effects of citrulline on TBA-RS and total sulfhydryl content in the cerebrums of 30- and 60-day-old-rats. Data are means  $\pm$  S.D. of seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to control group (Duncan's multiple range test).

Table 2. *In vitro* effects of citrulline on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrums of 30- and 60-day-old-rats. Data are means  $\pm$  S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared to control group (Duncan's multiple range test).

Table 3. *In vitro* effects of ammonia on TBA-RS and total sulfhydryl content in the cerebrums of 30- and 60-day-old-rats. Data are means  $\pm$  S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \* $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to control group (Duncan's multiple range test).

Table 4. *In vitro* effects of ammonia on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrums of 30- and 60-day-old-rats. Data are means  $\pm$  S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to control group (Duncan's multiple range test).

Fig. 1. *In vitro* effects of resveratrol (0.01-0.5 mM) on citrulline-elicited alterations in; thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in the cerebellum of 30-day-old rats (A), SOD activity in the hippocampus of 30-day-old rats (B), GSH-Px activity in the cerebral cortex of 30-day-old rats (C), GSH-Px activity in the hippocampus of 30-day-old rats (D), GSH-Px activity in the cerebellum of 30-day-old rats (E), thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in the cerebral cortex of 60-day-old rats (F), thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in the cerebellum of 60-day-old rats (G), SOD activity in the hippocampus of 60-day-old rats (H), SOD activity in the cerebral cortex of 60-day-old rats (I), GSH-Px activity in the cerebral cortex of 60-day-old rats (J), CAT activity in the cerebral cortex of 60-day-old rats (K). Results are expressed as means  $\pm$  SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group (Duncan's multiple range test). # partially prevented.

Fig. 2. *In vitro* effects of resveratrol (0.01-0.5 mM) on ammonia-elicited alterations in; total sulfhydryl content in the cerebral cortex of 30-day-old rats (A), SOD activity in the cerebellum of 30-day-old rats (B), GSH-Px activity in the cerebellum of 30-day-old rats (C), total sulfhydryl content in the cerebral cortex of 60-day-old rats (D), SOD activity in the cerebellum of 60 day-old rats (E), SOD activity in the cerebral cortex of 60 day-old rats (F). Results are expressed as means  $\pm$  SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group (Duncan's multiple range test). # partially prevented.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que a administração *in vitro* de citrulina e amônia levou a um quadro de estresse oxidativo, uma vez que aumentou os níveis de TBA-RS, reduziu o conteúdo total de sulfidrilas e alterou a atividade da SOD, CAT e GSH-Px em cérebro de ratos de 30 e 60 dias de idade.

Com isso foi possível evidenciar que a administração *in vitro* da citrulina e amônia promoveu lipoperoxidação, danos às proteínas e alterações nas atividades das enzimas antioxidantes, contribuindo assim para elucidar o papel do estresse oxidativo na fisiopatogênese da Citrulinemia Tipo I.

Ao estudar o papel antioxidante do Resveratrol sobre o dano oxidativo causado pela Citrulinemia Tipo I, evidenciou-se a capacidade do mesmo na prevenção do aumento dos níveis de TBA-RS, na prevenção da redução do conteúdo total de sulfidrilas e em várias das atividades das enzimas antioxidantes, como SOD e GSH-PX, promovidas pela citrulina e amônia *in vitro*.

Em conclusão, nossos dados indicam que a patogênese da Citrulinemia Tipo I está associada à um quadro de estresse oxidativo, relacionado ao aumento de radicais livres, e que o Resveratrol em todas as concentrações utilizadas em nosso estudo (0,01, 0,1 e 0,5 mM) apresentou atividade antioxidante frente a intoxicação *in vitro* pela citrulina e amônia. Esses resultados poderão contribuir para uma melhor elucidação da ainda não bem esclarecida fisiopatogênese da CTLN1 e para elaboração de novas práticas terapêuticas para o manejo dessa doença. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar outros mecanismos sobre a fisiopatogênese da doença, e para avaliar se o efeito antioxidante do Resveratrol frente a CTLN1 se reproduz *in vivo*.



## REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394–400, 2007.
- ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: Importância na dieta e na conservação dos alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398–406, 2013.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 49, 2012.
- AKSENOV, M.; MARKERSBERY, W. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141–145, 2001.
- AMÂNCIO, F. A. M.; SCALCO, F. B.; COELHO, C. A. R. Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo em um hospital universitário. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 169–174, 2007.
- ANDRADE JÚNIOR, D. R. DE et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60–68, 2005.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ARAÚJO, A. P. DE Q. C. Doenças metabólicas com manifestações psiquiátricas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, n. 6, p. 285–289, 2004.
- ARICHI, H. . et al. Effects of stilbene components of roots of *polygonum Euspidatum* Sieb et Zuce on lipid metabolism. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 30, p. 1766–1779, 1982.
- ARTUCH, R. et al. A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 198–203, 2004.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 31, n. 3, p. 259–280, 2008.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARROS, P. P. et al. Lycopene and resveratrol pretreatment did not interfere with the liver of hepatectomized rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 194–202, 2017.

BELGUENDOUZ, L.; FRÉMONT, L.; GOZZELINO, M. T. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 811–816, 1998.

BLAKE, R.; TROUNCE, I. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 4, p. 1404–1412, 2014.

BOSOI, C. R.; ROSE, C. F. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 95–102, 2009.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. **Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.**, 2008.

BRUNETTI-PIERRI, N. et al. 30-Year Follow-Up of a Patient With Classic Citrullinemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 106, n. 2, p. 248–250, 2012.

BRUSILOW, S. W.; HORWICH, A. Urea cycle enzymes. In: **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 8ª ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1909–1963.

CABRAL, A. et al. Citrulinemia - Heterogeneidade Clínica , Diagnóstico e Tratamento. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 33, n. 3, p. 201–208, 2002.

CAVALLARO, A. et al. Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. **Physiological Research**, v. 52, n. 5, p. 555–562, 2003.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CLANCY, R.; CHUNG, H. EEG changes during recovery from acute severe neonatal citrullinemia. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 78, p. 222–227, 1991.

COLOME, C.; SIERRA, C.; VILASECA, M. A. Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? **Medicina Clínica**, v. 115, p. 111–117, 2000.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Screening for inborn errors of metabolism among newborns with metabolic disturbance and/or neurological manifestations without determined cause. **Revista Paulista de Medicina**, v. 119, n. 5, p. 160–164, 2001.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.

DI MASCIO, P. et al. Singlet molecular oxygen: Düsseldorf - São Paulo, the Brazilian connection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 161–175, 2016.

DIAMENT, A. J. Aminoacidopatias de interesse neurológico. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 32, n. 2, p. 93–103, 1974.

DIEZ-FERNANDEZ, C. et al. Kinetic mutations in argininosuccinate synthetase deficiency: Characterisation and in vitro correction by substrate supplementation. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, p. 710–719, 2016.

DOS SANTOS, A. Q. et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, p. 161–167, 2006.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

EL HUSNY, A. S.; FERNANDES-CALDATO, M. C. Erros Inatos do Metabolismo: Revisão de Literatura. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, n. 2, p. 41–45, 2006.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto e Saúde**, v. 10, n. 20, p. 93–102, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

GEDIK, E. et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 46, p. 7101–7106, 2008.

GOMES, M. M.; SAUNDERS, C.; ACCIOLY, E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 5, n. 3, p. 275–282, 2005.

GÖRG, B. et al. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 567–579, 2008.

**Guide For The Care and Use of Laboratory Animals**. 8<sup>a</sup> ed. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

GURGEL, C. S. S. et al. Estado nutricional em vitamina A de puérperas adolescentes e adultas assistidas em maternidade pública. **Revista de Nutrição**, v. 29, n. 4, p. 473–482, 2016.

HERRERA SANCHEZ, M. B. et al. Extracellular vesicles from human liver stem cells restore argininosuccinate synthase deficiency. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2017.

HUSSEIN, M. A. A convenient mechanism for the free radical scavenging activity of resveratrol. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 459–469, 2011.



KAHL, R. Protective and adverse biological action of phenolic antioxidants. In: SIES, H. (Ed.). **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. San Diego, CA: Academic Press, 1991. p. 245–273.

KOSE, E. et al. Identification of three novel mutations in fourteen patients with citrullinemia type 1. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 12, p. 686–689, 2017.

KOSENKO, E. et al. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. **Free Radical Research**, v. 27, p. 637–644, 1997.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433–441, 2003.

LEWIN, B. et al. **Lewin's Genes X**. 10. ed. [s.l.] Jones & Bartlett Publishers, 2011.

LIMA, M. S. R.; DIMENSTEIN, R.; RIBEIRO, K. D. S. Vitamin E concentration in human milk and associated factors: a literature review. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 90, n. 5, p. 440–448, 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MAESTRI, N. E.; CLISSOLD, D. B.; BRUSILOW, S. W. Long-term survival of patients with argininosuccinate synthetase deficiency. **The Journal of Pediatrics**, v. 127, n. 6, p. 929–935, 1995.

MARKLUND, S. **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**. 3ª ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1985.

MARTINEZ, M. A. R. et al. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 405–419, 2006.

MELO, L. R. M. DE et al. Effect of maternal supplementation with vitamin E on the concentration of  $\alpha$ -tocopherol in colostrum. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 1, p. 40–46, 2017.

MIAN, A.; LEE, B. Urea-cycle disorders as a paradigm for inborn errors of hepatocyte metabolism. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 12, p. 583–589, 2002.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E C. **Legislações do CONCEA**. Disponível em: <<http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>>.

MOKNI, M. et al. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 6, p. 981–987, 2007.

NADAI, C. P. et al. Aminoacidopatias: características clínicas e genéticas. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 64, p. 465–473, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.** [s.l: s.n.].

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

PARMEGGIANI, B.; VARGAS, C. R. Oxidative stress in urea cycle disorders: Findings from clinical and basic research. **Clinica Chimica Acta**, v. 477, p. 121–126, 2018.

PRESTES, C. C. et al. Citrulline and ammonia accumulating in citrullinemia reduces antioxidant capacity of rat brain in vitro. **Metabolic Brain Disease**, v. 21, n. 1, p. 63–74, 2006.

QUINONEZ, S. C.; THOENE, J. G. **Citrullinemia Type I**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1458/>>.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.

RAIMANN, E. et al. Citrulinemia - Casos Clínicos. **Revista Chilena de Pediatria**, v. 65, n. 4, p. 215–218, 1994.

RICE-EVANS, C. A. . et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radic. Res.**, v. 22, p. 375–383, 1995.

ROCHA, J. C. et al. Consenso para o tratamento nutricional das Doenças do Ciclo da Ureia. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 40, n. 4, p. 175–184, 2009.

RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de Proteínas por Oxigênio Singleto: Mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563–568, 2006.

RUDER, J. et al. Neonatal citrullinemia: Novel, reversible neuroimaging findings correlated with ammonia level changes. **Pediatric Neurology**, v. 51, n. 4, p. 553–556, 2014.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, n. 3, p. 442–455, 2013.

SCAGLIA, F. et al. Clinical Consequences of Urea Cycle Enzyme Deficiencies and Potential Links to Arginine and Nitric Oxide Metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2775-, 2004.

SCRIVER, C. R. et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases**. New York: McGraw-Hill, 2001.

SILVA, A. L. C. DA et al. Vitamina E no Leite Humano e sua relação com o requerimento nutricional do recém-nascido a termo. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 35, n. 2, p. 158–164, 2017.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441–451, 2011.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 91–113, 1997.

SU, H.-C.; HUNG, L.-M.; CHEN, J.-K. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 290, p. E1339–E1346, 2006.

TRAVACIO, M.; LLESUY, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. **Free Radic. Res. Lati. Am.**, v. 48, p. 9–13, 1996.

VAN BACKEL, M. M. et al. Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 976–981, 2000.

VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Simpósio: Nutrição Clínica.**, v. 31, n. 1, p. 31–44, 1998.

WAJNER, M. et al. Investigação de erros inatos do metabolismo. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 21, n. 3, p. 343–360, 2001.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

## AUTORIZAÇÃO

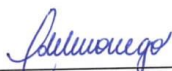
Nome do autor: Larissa Delmonego

RG: 5.817.660

Título da Dissertação: "Papel Protetor do Resveratrol sobre o Dano Oxidativo Cerebral em Ratos causado pela Citrulinemia Tipo I".

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 04 de fevereiro de 2019.



---

Assinatura do aluno