

**SIMONE SASSO**

**EFEITO DOS COMPOSTOS GUANIDÍNICOS ACUMULADOS NA  
HIPERARGININEMIA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
RINS, FÍGADO E SANGUE DE RATOS: PAPEL PROTETOR DAS VITAMINAS E e  
C e DO L-NAME**

**JOINVILLE  
2014**

**SIMONE SASSO**

**EFEITOS DOS COMPOSTOS GUANIDÍNICOS ACUMULADOS NA  
HIPERARGININEMIA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
RINS, FÍGADO E SANGUE DE RATOS: PAPEL PROTETOR DAS VITAMINAS E e  
C e DO L-NAME**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Delwing de Lima.

**JOINVILLE**

**2014**

## Termo de Aprovação

### “Efeito dos Compostos Guanidínicos Acumulados na Hiperargininemia Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo em Rins, Fígado e Sangue de Ratos: Papel Protetor das Vitaminas E e C e do L-NAME”

por

Simone Sasso

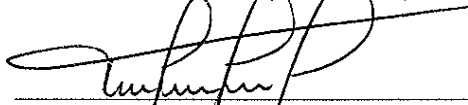
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente.



---

Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima

Orientadora (UNIVILLE)



---

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

#### Banca Examinadora:



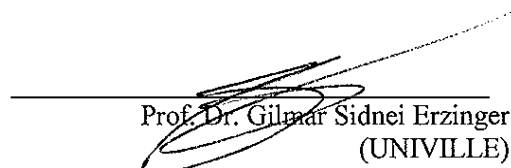
---

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



---

Profa. Dra. Débora Delwing Dal Magro  
(FURB)



---

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger  
(UNIVILLE)

Joinville, 03 de outubro de 2014

***Dedico este trabalho a minha família,  
pelo incentivo e companheirismo  
durante toda a minha caminhada.***

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, quero agradecer à Deus, pela vida, pela saúde, pela companhia em todos os momentos da minha vida e por me guiar perante as dificuldades enfrentadas.

Também quero agradecer a Deus por ter colocado no meu caminho a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Delwing de Lima, a você expressei a minha mais profunda gratidão. Obrigado pela paciência, compreensão, apoio e incentivo. Você, além de ser uma ótima orientadora é uma grande amiga, que jamais vou esquecer.

Agradeço em especial à minha família, principalmente aos meus pais, Dionísio e Dileta Sasso, pelo apoio, carinho, compreensão e pelos ensinamentos que jamais serão esquecidos. Obrigado pela educação que me deram, pois sem ela nada disso seria possível.

Ao meu noivo Cláudio, que em todos os momentos esteve ao meu lado me apoiando e incentivado. Obrigado pela compreensão, pela confiança e pela amizade. Você é o meu grande e eterno companheiro.

Ao meu irmão Marcos, cunhada Kelly e afiliados Maurício e Heitor, quero agradecer pela alegria, companhia e apoio em todos os momentos. Amo vocês.

A minha amiga Vanilda Galli, que esteve ao meu lado nos momentos de tristeza e alegria. Obrigado pela companhia, dedicação e pelas palavras de consolo. Sem sua amizade não sei o que seria de mim.

A minha grande companheira de laboratório, Leticia Dalmedico. A sua ajuda foi essencial para o meu trabalho, sem você não sei o que seria de mim. Obrigado por todos os momentos estar ao meu lado, me apoiando e fazendo o seu melhor para que tudo desse certo.

Ao professor Eduardo, pela disponibilidade e apoio.

A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos.

A secretária do mestrado Débora Nunes Pinheiro Gesser, pela ajuda, dedicação e atenção.

Aos membros da banca Gilmar Sidnei Erzinger e Débora Delwing Dal Magro pelas contribuições.

A CAPES, UNIVILLE e FAPESC.

MUITO OBRIGADA!

***“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.***

***Marthin Luther King***

## RESUMO

Na presente investigação, foram avaliados os efeitos *in vitro* dos compostos guanidínicos N- $\alpha$ -acetilarginina e homoarginina sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas e sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) em sangue, rins e fígado de ratos. Além disso, testamos a influência dos antioxidantes trolox e ácido ascórbico e do N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor da óxido nítrico sintase, sobre os efeitos causados pela N- $\alpha$ -acetilarginina e homoarginina sobre os parâmetros testados. Foram utilizados ratos machos Wistar de 60 dias de idade, não tratados. Os compostos guanidínicos N- $\alpha$ -acetilarginina e homoarginina foram adicionados ao ensaio a fim de se obter as seguintes concentrações finais: 0,1, 1,0 e 5,0  $\mu$ M e 1,0, 10,0 e 20,0  $\mu$ M, respectivamente. O grupo controle foi realizado sem a adição dos compostos guanidínicos. Para a prevenção com trolox (alfa-tocoferol), ácido ascórbico e L-NAME, os ratos foram divididos em 8 grupos: grupo 1 (controle-salina), grupo 2 (compostos guanidínicos), grupo 3 (controle-trolox 1,0 mM), grupo 4 (controle-ácido ascórbico 1,0 mM), grupo 5 (controle- L-NAME 1,0 mM), grupo 6 (compostos guanidínicos + trolox 1,0 mM), grupo 7 (compostos guanidínicos + ácido ascórbico 1,0 mM) e grupo 8 (compostos guanidínicos + L-NAME 1,0mM). Os resultados mostraram que a N- $\alpha$ -acetilarginina, na concentração de 5,0  $\mu$ M, diminuiu a atividade da CAT em eritrócitos, aumentou TBA-RS em córtex renal, diminuiu a atividade da CAT e da SOD na medula renal e diminuiu a atividade da CAT e aumentou da SOD e da GSH-Px em fígado de ratos de 60 dias de idade. Os dados sugerem que a N- $\alpha$ -acetilarginina altera as defesas antioxidantes e induz peroxidação lipídica no sangue, rins e fígado de ratos. Os antioxidantes e o L-NAME impediram a maioria das alterações causadas pela N- $\alpha$ -acetilarginina. A homoarginina na concentração de 10,0  $\mu$ M e 20,0  $\mu$ M reduziu o conteúdo total de sulfidrilas e na concentração de 20,0  $\mu$ M aumentou TBA-RS em plasma, diminuiu a atividade da CAT e aumentou da SOD e da GSH-Px em córtex renal e aumentou os níveis de TBA-RS e a atividade da SOD em medula renal de ratos de 60 dias de idade, em comparação com os grupos controle. Os dados sugerem que a homoarginina altera as defesas antioxidantes, provoca dano a proteínas e induz peroxidação lipídica no sangue e rins de ratos. Os antioxidantes e o L-NAME preveniram as alterações causadas pela homoarginina no sangue e rins de ratos. Os dados indicam que a indução do estresse oxidativo é provavelmente mediada pela geração de NO e /ou de ONOO<sup>-</sup> e outros radicais livres, uma vez que o L-NAME e os antioxidantes impediram os efeitos causados pelos compostos guanidínicos no sangue, rins e fígado de ratos. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o uso de antioxidantes, especialmente vitaminas E e C, deve ser considerados como uma estratégia terapêutica adjuvante para melhorar os danos causados pela N- $\alpha$ -acetilarginina e homoarginina em pacientes com Hiperargininemia.

**Palavras-chave:** N- $\alpha$ -acetilarginina; homoarginina; estresse oxidativo; antioxidantes; sangue; rim; fígado.

## ABSTRACT

In the present investigation, the *in vitro* effects of the guanidine compounds N- $\alpha$ -acetylarginine and homoarginine were evaluated on the thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the blood, kidney and liver of rats. In addition, we tested the influence of the antioxidants, trolox and ascorbic acid, as well as of the N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), nitric oxide synthase inhibitor, on the effects elicited by N- $\alpha$ -acetylarginine and homoarginine on the parameters tested. Untreated sixty-day-old male Wistar rats were used. The guanidine compounds N- $\alpha$ -acetylarginine and homoarginine were added to the assay at final concentrations: 0.1, 1.0 and 5.0  $\mu$ M and 1.0, 10.0 and 20.0  $\mu$ M, respectively. The control group was performed without the addition of guanidine compounds. For prevention with trolox (alpha-tocopherol), ascorbic acid and L-NAME, rats were divided into 8 groups: group 1 (control-saline), group 2 (guanidine compounds), group 3 (control- 1.0 mM trolox), group 4 (control - 1.0 mM ascorbic acid), group 5 (control- 1.0 mM L-NAME), group 6 (guanidine compounds + 1.0 mM trolox), group 7 (guanidine compounds + 1.0 mM ascorbic acid) and group 8 (guanidine compounds + 1.0 mM L-NAME). Results showed that N- $\alpha$ -acetylarginine, at a concentration of 5.0  $\mu$ M, decreased the activity of CAT in erythrocytes, enhanced TBA-RS in the renal cortex, decreased CAT and SOD activities in the renal medulla and decreased CAT and increased SOD and GSH-Px activities in the liver of 60-day-old rats. Data suggest that N- $\alpha$ -acetylarginine alters antioxidant defenses and induces lipid peroxidation in the blood, kidney and liver of rats. Antioxidants and L-NAME prevented most of the alterations caused by N- $\alpha$ -acetylarginine on the oxidative stress parameters evaluated. Homoarginine, at a concentration of 10.0  $\mu$ M and 20.0  $\mu$ M decreased total sulfhydryl content and, at concentration of 20.0  $\mu$ M, increased TBA-RS in the plasma, decreased total sulfhydryl content and CAT activity and increased SOD and GSH-Px activities in the renal cortex. Homoarginine also increased TBA-RS and SOD activity in the renal medulla of 60-day-old rats, as compared to the control group. Data suggest that homoarginine alters antioxidant defenses, causes damage to proteins and induces lipid peroxidation in the blood and kidney of rats; however, in the presence of antioxidants and L-NAME, most of these alterations caused by homoarginine in oxidative stress were prevented. Data indicate that oxidative stress induction is probably mediated by the generation of NO and /or ONOO<sup>-</sup> and other free radicals, since L-NAME and antioxidants prevented the effects caused by N- $\alpha$ -acetylarginine and homoarginine in the blood, renal tissues and liver of rats. The results support to a potential therapeutic strategy for this condition, which may include the use of appropriate antioxidants for ameliorating the damage caused by N- $\alpha$ -acetylarginine and homoarginine in patients with Hyperargininemia.

**Keywords:** N- $\alpha$ -acetylarginine; homoarginine; oxidative stress; antioxidants; blood; kidney;liver.



## LISTA DE FIGURAS REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Produção de água a partir do oxigênio.....	21
Figura 2 - Geração do radical superóxido a partir do oxigênio.....	21
Figura 3 - Processo de dismutação.....	22
Figura 4 - Reação de Fenton.....	22
Figura 5 - Reação de Haber-Weiss.....	22
Figura 6 - Formação do peroxinitrito e radical hidroxil a partir do radical superóxido e do óxido nítrico.....	22
Figura 7 - Estresse oxidativo x mecanismos de defesa.....	23
Figura 8 - Etapas do processo de lipoperoxidação.....	25
Figura 9 - Lipoperoxidação catalizada por íons de Ferro e Cobre.....	26
Figura 10 - Formação do radical hidroxil via reação de Fenton e subsequente ataque ao DNA.....	28
Figura 11 - Equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante.....	29
Figura 12 - Reação de dismutação do radical superóxido.....	29
Figura 13 - Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase.....	30
Figura 14 - Reação catalisada pela enzima glutationala peroxidase.....	31
Figura 15 - Integração dos sistemas de defesa enzimático.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
DTNB	Ácido Ditionitrobenzóico
EIM	Erro Inato do Metabolismo
GAA	Ácido Guanidinoacético
GBA	Ácido $\gamma$ -guanidinobutírico
GSH	Glutaciona
GSH-Px	Glutaciona Peroxidase
GSSG	Glutaciona Oxidada
GVA	$\alpha$ -ceto- $\gamma$ -guanidinovalérico
L $\cdot$	Radical Lipídico
L-NAME	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina metil éster
LOO $\cdot$	Radical Peroxila
LOOH	Hidroperóxidos
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> $\cdot^-$	Radical Superóxido
OH $\cdot$	Radical Hidroxil
ONOO $^-$	Ânion Peroxinitrito

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TBA-RS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS REFERÊNCIAL TEÓRICO**

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
<b>3 REVISÃO.....</b>	<b>16</b>
3.1 Erros inatos do metabolismo.....	16
3.2 Hiperargininemia.....	16
3.3 Radicais livres.....	20
3.4 Estresse oxidativo.....	23
3.4.1 Mecanismos de Dano Celular por Estresse Oxidativo.....	24
3.4.1.1 Lipoperoxidação .....	24
3.4.1.2 Dano às proteínas.....	26
3.4.1.3 Dano ao DNA.....	27
3.4.2 Sistema de Defesa Antioxidante.....	28
3.4.2.1 Enzimas Antioxidantes.....	29
3.4.2.2 Antioxidantes exógenos.....	32
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
4.1 Animais.....	35
4.2 Protocolo experimental.....	35
4.2.1 Estudo <i>in vitro</i> .....	35
4.2.2 Prevenção com Trolox, Ácido Ascórbico e L-NAME.....	35
4.3 Estudos bioquímicos.....	36
4.3.1 Preparação dos Eritócitos e do Plasma.....	36
4.3.2 Preparação dos Tecidos.....	36
4.3.3 TBA-RS.....	37
4.3.4 Conteúdo total de Sulfidrilas.....	37

4.3.5 Catalase .....	37
4.3.6 Gutationa Peroxidase.....	37
4.3.7 Superóxido Dismutase.....	38
4.3.8 Dosagem de Proteínas.....	38
<b>4.4 Análise estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Artigo 1: Effect of <i>N-acetylarginine</i>, a metabolite accumulated in hyperargininemia, on parameters of oxidative stress in rats: protective role of vitamins and L-LAME.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 Artigo 2: Protective role of vitamins and L-NAME in homoarginine induced blood and renal oxidative damage in rats.....</b>	<b>66</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO 1. Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Erros inatos do metabolismo (EIM) são alterações genéticas que se manifestam pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, ou por uma diminuição ou mesmo ausência de sua síntese, tendo como consequência o bloqueio de rotas metabólicas (BICKEL, 1987).

Hiperargininemia é um erro inato do ciclo da ureia causado pela deficiência na atividade da enzima arginase hepática, que catalisa a conversão de arginina em ureia e ornitina. Esta doença metabólica, descrita em todos os grupos étnicos, causa nível elevado de arginina no sangue e pode ser detectada por exames bioquímicos específicos (DE DEYN *et al.* 1997; SCAGLIA; LEE, 2006). A incidência estimada da hiperargininemia é de 1 em 2 milhões de nascidos vivos (SCAGLIA; LEE, 2006).

De acordo com Halliwell (1996) os pacientes hiperargininêmicos apresentam níveis elevados dos compostos guanidínicos N-alfa-acetilarginina, ácido arginínico e homoarginina no plasma e no fluido cérebro espinhal. Segundo Mori *et al.* (1998) além dos compostos guanidínicos, também foi sugerido que o óxido nítrico (NO) poderia ter um papel na fisiopatologia dessa doença, uma vez que o excesso de arginina presente na hiperargininemia pode servir de substrato para a síntese de NO.

O estresse oxidativo é comumente observado em alguns EIM (COLOME *et al.* 2000; WAJNER *et al.* 2004), resulta de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade da célula em reparar os danos através dos antioxidantes ou eliminar as moléculas danificadas (DU *et al.* 2013). O acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células normais contribui para a oxidação de vários componentes, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (GUERAUD *et al.* 2010). Mecanismos antioxidantes são fundamentais para proteger as células contra danos induzidos por ROS e estresse oxidativo (OAKLEY *et al.* 2009).

Considerando que a patogênese do quadro clínico característico apresentado por pacientes hiperargininêmicos é ainda desconhecida, este trabalho teve por objetivo investigar o efeito *in vitro* dos compostos guanidínicos N-alfa-acetilarginina e homoarginina sobre um importante parâmetro de estresse oxidativo, denominado formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), sobre o conteúdo total de sulfidrilas e sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase

(CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) em rim, fígado e sangue de ratos Wistar de 60 dias de idade. Em adição, também investigamos a influência dos antioxidantes, trolox (alfa-tocoferol) e ácido ascórbico e do L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase) sobre os efeitos causados pelos compostos guanidínicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Estudar os efeitos *in vitro* dos componentes guanidínicos (N-alfa-acetilarginina e Homoarginina) e a influência dos antioxidantes trolox (alfa-tocoferol) e ácido ascórbico e do L-NAME sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em rim, fígado e sangue de ratos com 60 dias de idade.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de N-alfa-acetilarginina sobre um importante parâmetro de estresse oxidativo (TBA-RS) em plasma, rim (córtex e medula) e fígado de ratos de 60 dias de idade;

- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de N-alfa-acetilarginina sobre o conteúdo total de sulfidrilas em plasma, rim (córtex e medula) e fígado de ratos de 60 dias de idade;

- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de N-alfa-acetilarginina sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GSH-Px e SOD em eritrócitos, rim (córtex e medula) e fígado de ratos de 60 dias de idade;

- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de homoarginina sobre o TBA-RS em plasma, rim (córtex e medula) e fígado de ratos de 60 dias de idade;

- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de homoarginina sobre o conteúdo total de sulfidrilas em plasma, rim (córtex e medula) e fígado de ratos de 60 dias de idade;

- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de homoarginina sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GSH-Px e SOD em eritrócitos, rim (córtex e medula) e fígado de ratos de 60 dias de idade;



- Investigar a influência dos antioxidantes trolox (alfa-tocoferol) e ácido ascórbico e do L-NAME sobre os efeitos *in vitro* dos compostos guanidínicos (N-alfa-acetilarginina e homoarginina) sobre o TBA-RS em plasma, rim (córtex e medula) e fígado de ratos;
- Investigar a influência dos antioxidantes trolox (alfa-tocoferol) e ácido ascórbico e do L-NAME sobre os efeitos *in vitro* dos compostos guanidínicos (N-alfa-acetilarginina e homoarginina) sobre o conteúdo total de sulfidrilas em plasma, rim (córtex e medula) e fígado de ratos.
- Investigar a influência dos antioxidantes trolox (alfa-tocoferol) e ácido ascórbico e do L-NAME sobre os efeitos *in vitro* dos compostos guanidínicos (N-alfa-acetilarginina e homoarginina) sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GSH-Px e SOD em eritrócitos, rim (córtex e medula) e fígado de ratos.

## 3 REVISÃO

### 3.1 Erros inatos do metabolismo

Os EIM são alterações genéticas que se manifestam pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, ou por uma diminuição ou mesmo ausência de sua síntese. Essas alterações resultam em deficiência da atividade da enzima envolvida, ocasionando bloqueio de rotas metabólicas. Como consequência, pode ocorrer tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais, ambos com doença subsequente (BICKEL, 1987).

Segundo Giugliani (1988) os EIM são distúrbios graves que se manifestam na infância cujo diagnóstico pode ser dificultado devido ao grande número de alterações, diversidade de defeitos metabólicos e ausência, na maioria dos casos, de sinais e sintomas específicos. O diagnóstico deve ser realizado logo após o nascimento, a fim de possibilitar ao indivíduo um tratamento específico e imediato.

Os EIM representam cerca de 10% de todas as doenças genéticas (ARAUJO, 2004; SOUZA, 2002). Muitos profissionais consideram como casos extremamente raros de se deparar, sendo muitas vezes, a última hipótese diagnóstica (MARTINS, 1999; MARTINS *et al.* 2003; JARDIM; ASHTON-PROLLA, 1996).

A sua classificação é de acordo com a área do metabolismo afetada subdividindo-se em EIM: de aminoácidos, ácido orgânicos, glicídios, lipídios, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, enzimas eritrocitárias, lipoproteínas, hormônios e proteínas plasmáticas (SCRIVER *et al.* 2001).

Diagnosticar, rapidamente, é muito importante para impedir que os sintomas se agravem. Assim, a triagem neonatal é fundamental para o diagnóstico em fase pré-clínica, prevenindo o dano neurológico e em alguns casos a morte do paciente (MARTINS *et al.* 2003; JARDIM; ASHTON-PROLLA, 1996; SOUZA, 2002).

### 3.2 Hiperargininemia

A hiperargininemia é um erro inato do ciclo da ureia causado pela deficiência da enzima arginase hepática, a qual catalisa a conversão da arginina em ureia e

ornitina (BRUSILOW; HORWICH, 2001). Os pacientes com esta doença apresentam altos níveis de arginina e compostos guanidínicos (N-alfa-acetilarginina, ácido arginínico e homoarginina) no plasma e fluídos biológicos e desenvolvem disfunção neurológica progressiva, sinais de retardo mental e psicomotor, epilepsia e espasticidade (BRUSILOW; HORWICH, 2001; IYER *et al.* 1998).

A enzima final do ciclo da ureia é a arginase (L-arginina amidino hidrolase), que cataliza a hidrólise da L-arginina formando L-ornitina e ureia (ASH *et al.* 1998). O fígado é o único órgão que apresenta todas as enzimas do ciclo da ureia e é neste órgão que ocorre grande parte da ureagênese (BRUSILOW; HORWICH, 1995; JENKINSON *et al.* 1996). Os níveis de arginina no sangue aumentam de 5 até 15 vezes em relação aos valores normais (10 – 140  $\mu\text{mol/L}$ ) e até 10 vezes em líquido (13 -35  $\mu\text{mol/L}$ ) nos pacientes com ingestão normal de proteínas. A elevação do ácido orótico na urina é frequentemente observada na hiperargininemia (CEDERBAUM *et al.* 1979; BRUSILOW; HORWICH, 2001; CROMBEZ; CEDERBAUM, 2005; SCAGLIA; LEE, 2006).

No ano de 1983, foi demonstrada a existência de duas isoenzimas da arginase: a arginase A I, que é citosólica e tem atividade catabólica e ureagênica, presente no fígado e em eritrócitos; e a arginase A II, que é substancialmente mitocondrial, é considerada uma enzima biossintética, encontrada em tecidos extra-hepáticos, como o rim, trato gastrointestinal, cérebro e próstata, a qual tem, como principal produto, a ornitina (JENKINSON *et al.* 1996; GOTOH *et al.* 1997).

Pacientes hiperargininêmicos apresentam síndrome neurológica que consiste de um grau variado de retardo mental e psicomotor, epilepsia, severa espasticidade, hiperatividade e perda progressiva da capacidade motora e mental (SNYDERMAN *et al.* 1977; CEDERBAUM *et al.* 1979; MARESCAU *et al.* 1992; DE DEYN *et al.* 1997). Os pacientes podem apresentar episódios intermitentes de vômito, irritabilidade, letargia e coma. Ressalta-se que esses sintomas também podem ser observados em outros erros inatos do ciclo da ureia (COLOMBO, 1992). Um sinal bastante peculiar da hiperargininemia é a espasticidade progressiva, que não é observada nas demais doenças do ciclo da ureia (MARESCAU *et al.* 1990).

No período neonatal a maioria dos pacientes são descritos como normais. Os sinais relacionados à espasticidade de membros inferiores com tropeços, quedas e dificuldade de marcha são observados entre 2 e 4 anos de idade, e se não tratados,

evoluem progressivamente para um quadro de paraparesia espástica. Frequentemente desenvolvem deformidades esqueléticas no joelhos e tornozelos devido a grave espasticidade, o que pode levar a perda da capacidade de deambulação (DE DEYN *et al.* 1997; CROMBEZ; CEDERBAUM, 2005; SCAGLIA; LEE, 2006; CEDERBAUM; CROMBEZ, 2010).

De acordo com a literatura não há acometimento visual ou auditivo nos indivíduos afetados. Na infância, existe o relato de afetados que manifestam sinais de hiperatividade (DE DEYN *et al.* 1997; SCAGLIA; LEE, 2006; CEDERBAUM; CROMBEZ, 2010). Segundo alguns autores o déficit de crescimento é uma complicação presente em praticamente todos os afetados (CROMBEZ; CEDERBAUM, 2005; CEDERBAUM; CROMBEZ, 2010), apesar de outros trabalhos relatarem esta complicação de forma menos frequente e da existência de vários pacientes com altura normal (PRASAD *et al.* 1997).

Alguns pacientes, que foram diagnosticados e tratados desde o nascimento por dieta com restrição proteica e suplementação de aminoácidos essenciais, permanecem assintomáticos na vida adulta (CEDERBAUM *et al.* 2004). Por outro lado, alguns pacientes com deficiência de arginase e que apresentavam níveis normais de amônia pela restrição proteica, mas com níveis aumentados de arginina de forma persistente (acima de 600  $\mu\text{mol/L}$ ), não tiveram melhora em relação ao quadro clínico, resultando no acúmulo crônico de arginina ou de alguns dos seus metabólitos (CROMBEZ; CEDERBAUM, 2005; SCAGLIA; LEE, 2006).

A patogênese do quadro clínico característico apresentado por pacientes hiperargininêmicos é ainda desconhecida (CEDERBAUM *et al.* 1977). A hiperamonemia parece ser a causa do dano ao sistema nervoso central (SNC) de pacientes com enzimopatias do ciclo da ureia. No entanto, em pacientes hiperargininêmicos, a hiperamonemia observada é intermitente e supõe-se que outros fatores devam contribuir com os sintomas neurológicos (MIZUTANI *et al.* 1987). Nesse contexto, Marescau e colaboradores (1990), propuseram a hipótese de que a arginina seria neurotóxica nessas condições. Esse fato levou diversos pesquisadores a investigarem o papel da arginina e de seus metabólitos, os compostos guanidínicos, na patogênese dessa doença (MARESCAU *et al.* 1990; MARESCAU *et al.* 1992; DE DEYN *et al.* 1997; SILVA *et al.* 1999).

A arginina acumulada na hiperargininemia poderá ser metabolizada por uma série de reações enzimáticas secundárias, formando uma quantidade significativa de seus metabólitos, os compostos guanidínicos. Dessa forma, a arginina pode ser catabolizada por transaminação a  $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -guanidinovalérico (GVA); por descarboxilação oxidativa a GVA e ácido  $\gamma$ -guanidinobutírico (GBA); por redução a GVA e por ação de uma desidrogenase a ácido arginínico (MARESCAU *et al.* 1982). Como alternativa, a transamidinação da arginina pode formar ácido guanidinoacético (GAA) (DUBNOFF; BORSOOK, 1941) e GBA (PISANO; UNDERFRIEND, 1963) e sua acetilação resultar em N- $\alpha$ -acetilarginina. A via metabólica secundária mais favorecida é a de formação de ácido GVA por transaminação. A atividade de hidrogenação de GVA a ácido arginínico é também bastante pronunciada. Já o aumento da atividade de transaminação envolvida na biossíntese de GAA, GBA e ácido  $\beta$ -guanidinopropiônico é bem menos evidente (NATELSON; SHERWIN, 1979).

Dados da literatura mostram que os compostos guanidínicos (N-alfa-acetilarginina, ácido arginínico e homoarginina), os quais estão aumentados na hiperargininemia, reduziram em torno de 30 a 40% a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (*in vitro*) de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos de acordo com Silva *et al.* (1999), e induziram o estresse oxidativo cerebral (WYSE *et al.* 2001b).

Estudos prévios mostraram que a administração aguda de arginina reduziu a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase e da acetilcolinesterase em cérebro de ratos conforme Reis *et al.* (2002) e Wyse *et al.* (2004), induziu o estresse oxidativo cerebral e sanguíneo de acordo com Wyse *et al.* (2001a); Delwing *et al.* (2002); Delwing *et al.* (2008); De Lima *et al.* (2012), provocou déficit de memória em ratos, segundo Reis *et al.* (2002) e reduziu o metabolismo energético em hipocampo e cerebelo de ratos conforme Delwing *et al.* (2003); Delwing *et al.* (2006); Delwing *et al.* (2007a,b). Esses efeitos foram provavelmente causados pela geração de NO e/ou ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e/ou outros radicais livres, visto que antioxidantes importantes como a vitamina E (alfa-tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico) e o  $\text{N}^0$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) preveniram esses efeitos.

Segundo Mori *et al.* (1998) além dos compostos guanidínicos, também foi sugerido que o NO poderia ter um papel na fisiopatologia dessa doença, uma vez que o excesso de arginina presente na hiperargininemia pode servir de substrato para a síntese de NO sob ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

A hiperargininemia pode ser diagnosticada bioquimicamente pela dosagem dos altos níveis de arginina existentes nos fluídos biológicos dos pacientes (CEDERBAUM *et al.* 1977). Outro parâmetro bioquímico é a dosagem dos compostos guanidínicos, os quais são catabólitos da arginina, na urina, plasma e líquor. No entanto, a confirmação do diagnóstico, deve ser obtida através da determinação da atividade da arginase em eritrócitos (MARESCAU *et al.* 1992).

De acordo com a literatura, pacientes hiperargininêmicos frequentemente desenvolvem intolerância a alimentos ricos em proteína. As famílias relatam que as crianças evitam ingerir alimentos com alto teor proteico, como carnes, ovos, leite e seus derivados, desde o período de lactante (DE DEYN *et al.* 1997; PRASAD *et al.* 1997).

O tratamento da hiperargininemia parece ser o mais ameno quando comparado a outras doenças do ciclo da ureia (IYER *et al.* 1998). Uma dieta hipoproteica com restrição proteica juntamente com a suplementação de fórmulas especiais sem arginina e contendo aminoácidos essenciais e o uso de drogas que promovam o desvio de amônia por vias metabólicas alternativas ao ciclo da ureia, para remoção de nitrogênio, como o benzoato de sódio e fenilbutirato de sódio tem sido utilizados (IYER *et al.* 1998; CROMBEZ; CEDERBAUM, 2005; SCAGLIA; LEE, 2006; CEDERBAUM; CROMBEZ, 2010).

### **3.3 Radicais livres**

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

Segundo Nedel (2005) quando um radical livre não encontra outro para se ligar a fim de obter estabilidade, ele capta elétrons de outras moléculas saudáveis, transformando-as em outros radicais livres, iniciando uma reação em cadeia com dano celular caso não ocorra intervenção dos antioxidantes.

A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, realizando funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, os radicais livres atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. A sua produção, em quantidades adequadas, possibilita a geração de adenosina trifosfato (ATP), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação nos mecanismos de defesa durante o processo de infecção (SHAMI; MOREIRA, 2004; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio ( $O_2$ ) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons e os 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

A enzima citocromo C oxidase presente na cadeia de transporte de elétrons, remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo C, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao  $O_2$  para formar água. Os 2 a 5% restantes do  $O_2$  são reduzidos univalentemente em metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

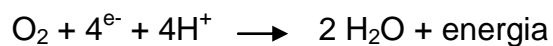


Figura 1 - Produção de água a partir do oxigênio. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Devido a sua configuração eletrônica, o  $O_2$  apresenta forte tendência a receber um elétron de cada vez. Assim, com a adição de um elétron o  $O_2$  gera o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Figura 2) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

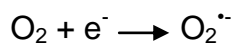


Figura 2 - Geração do radical superóxido a partir do oxigênio. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Através do processo de dismutação, o superóxido ao receber mais um elétron e dois íons de hidrogênio forma o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o  $O_2$  (Figura 3). Essa reação é catalisada pela enzima SOD (YU, 1994). O  $H_2O_2$  apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada

eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Diferente dos radicais livres, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

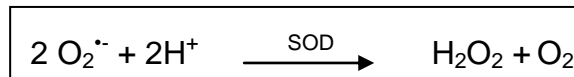


Figura 3 - Processo de dismutação. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Ao receber mais um elétron e um íon hidrogênio o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é transformado a radical hidroxil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) que pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima influenciando enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (JENKINS, 1988). O  $\text{OH}^{\cdot}$  também pode ser formado quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com íons de ferro ou cobre, reação denominada Reação de Fenton (Figura 4) (KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

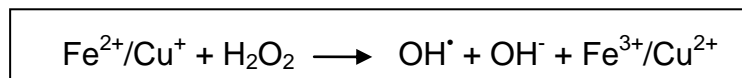


Figura 4 - Reação de Fenton. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Os íons de metais de transição também podem catalisar a reação entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e superóxido, produzindo o  $\text{OH}^{\cdot}$ , esta reação é conhecida como Reação de Haber-Weiss (Figura 5) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

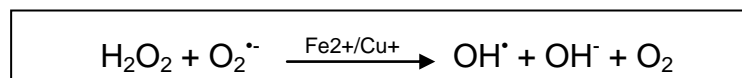


Figura 5 - Reação de Haber-Weiss. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

No estresse oxidativo o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pode reagir com NO, formando  $\text{ONOO}^-$ , que é altamente reativo e prejudicial às biomoléculas. Posteriormente ocorre a formação do  $\text{OH}^{\cdot}$  (Figura 6) (GREEN *et al.* 2004; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

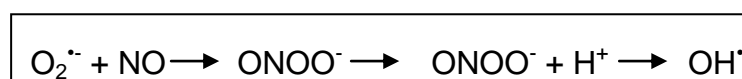


Figura 6 - Formação do peroxinitrito e radical hidroxil a partir do radical superóxido e do óxido nítrico. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).



O NO, ONOO<sup>-</sup> juntamente com os íons nitrosônio (NO<sup>+</sup>) e nitroxila (NO<sup>-</sup>) são chamados de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (BERGENDI *et al.* 1999). O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina por ação da enzima NOS (ZHANG *et al.* 2006).

O aumento nas concentrações de NO em condições fisiopatológicas pode causar lesão celular e conseqüentemente a formação de radicais livres favorecendo os danos do estresse oxidativo (WEI *et al.* 2003). Já o ONOO<sup>-</sup>, pode difundir-se para o meio intra ou extracelular, e então promover a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (BECKMAN, 1996).

### 3.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e as defesas antioxidantes (Figura 7) (FREEMAN; CRAPO, 1982; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). É uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ROS/RNS ocasionando dano celular e prejudicando as funções vitais (DRÖGE, 2002). A ROS/RNS fazem parte do nosso metabolismo celular normal, sendo que ambos são reconhecidos por representarem um papel duplo, uma vez que podem tanto prejudicar como beneficiar o organismo (VALKO *et al.* 2006).

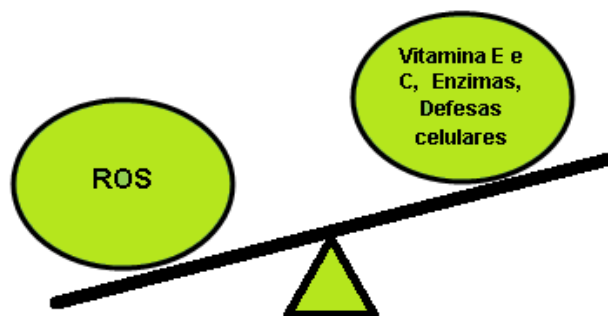


Figura 7 - Estresse oxidativo x mecanismos de defesa (adaptado de MARKS *et al.* 1996).

De acordo com Lushchak (2011) os fatores que induzem o estresse oxidativo podem ser divididos em externos (físicos e químicos) e internos. Nos fatores físicos incluem a variação de temperatura, luz e radiação. Os químicos envolvem vários compostos que ao entrarem no organismo causam aumento nos níveis de espécies

reativas. Já os fatores internos estão relacionados com os processos metabólicos que o nosso organismo realiza diariamente.

O estresse oxidativo vem sendo relacionado com a patogênese de inúmeras doenças. Vários estudos mostram que as reações oxidativas contribuem no envelhecimento e em inúmeros processos patológicos, que incluem doenças cardiovasculares (STOCKER; KEANEY, 2004), doenças pulmonares (CANTIN, 2004), diabetes (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2004) e doenças neurodegenerativas (VINA *et al.* 2004). Além disso, relatos clínicos e experimentais sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na degeneração neuronal, em doenças como o Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Huntington (MÖLLER *et al.* 2010; ALIEV *et al.* 2013). A participação do estresse oxidativo também está relacionado a diversos tumores humanos, incluindo melanoma, leucemias, carcinomas gástrico, prostático, mamário e de cólon (REUTER *et al.* 2010).

O estresse oxidativo ocorre no SNC, devido ao seu alto consumo de O<sub>2</sub>, ao alto conteúdo lipídico, principalmente de ácidos graxos poliinsaturados; aos altos níveis de ferro, os quais favorecem a lipoperoxidação; e à baixa defesa antioxidante (BUTTERFIELD; STADTMAN, 1997; HALLIWELL, 2006).

### 3.4.1 Mecanismos de Dano Celular por Estresse Oxidativo

#### 3.4.1.1 Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (MAHATTANATAWEE *et al.* 2006; STAHL *et al.* 2001). A peroxidação lipídica leva à formação de hidroperóxidos de lipídios e lipídeos reativos que contribuem no processo de autoxidação (NAM, 2011; SULTANA *et al.* 2013; ZAMBO *et al.* 2013).

A natureza complexa do processo de peroxidação lipídica têm atraído cientistas de diferentes áreas devido a sua relação com inúmeras doenças, tais como aterosclerose (BERLINER; HEINECKE, 1996), câncer (HAMMAD *et al.* 2009; WU *et al.* 2010), diabetes (SILVERSTEIN; FEBBRAIO, 2009), exposição crônica ao

álcool (YANG *et al.* 2010), lesão pulmonar aguda (IMAI *et al.* 2008; NONAS *et al.* 2006) bem como doenças neurodegenerativas (SIMONIAN; COYLE, 1996), que incluem Alzheimer (MONTINE *et al.* 2005) e Parkinson (PORTER *et al.* 2010).

Segundo Yin *et al.* (2011) o mecanismo de lipoperoxidação é um processo em cadeia constituído pela fase de iniciação, propagação e terminação. Na iniciação as ROS atingem os ácidos graxos poliinsaturados, levando a remoção do hidrogênio, formando um radical lipídico (L<sup>•</sup>) (MIYASHITA, 2008). Este radical reage com o O<sub>2</sub> produzindo um radical peroxila (LOO<sup>•</sup>), caracterizando assim a etapa de propagação. Esses radicais reagem posteriormente com moléculas de lipídeos formando os hidroperóxidos (LOOH) ou podem ser neutralizados por antioxidantes (Figura 8). Alternativamente, eles podem reagir com outros radicais lipídicos formando produtos estáveis (LOOL), caracterizando a reação de terminação (FRANKEL, 2005).

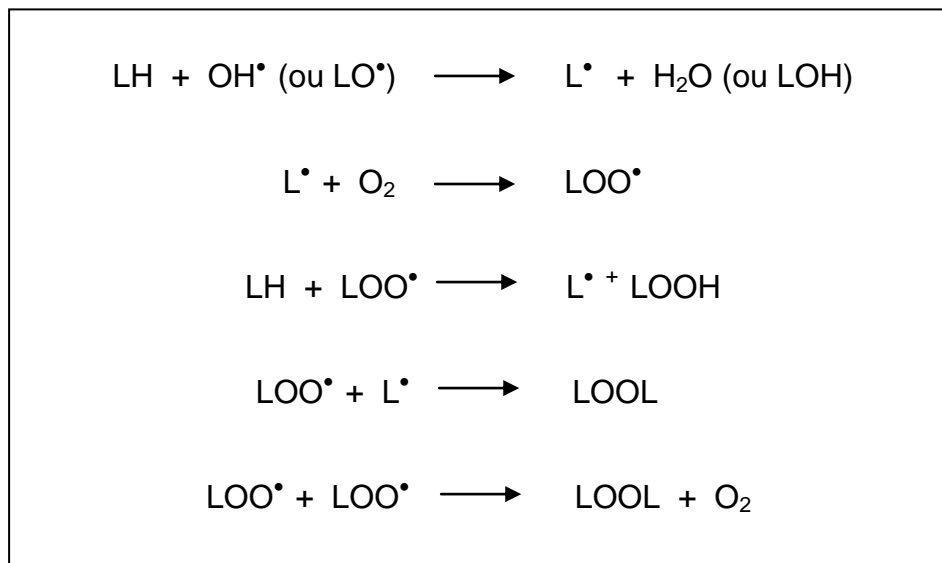


Figura 8 - Etapas do processo de lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

•: Radical livre

A lipoperoxidação pode ser induzida por metais de transição como o ferro e cobre, através da decomposição de LOOH (Figura 9) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ORRENIUS *et al.* 2007).

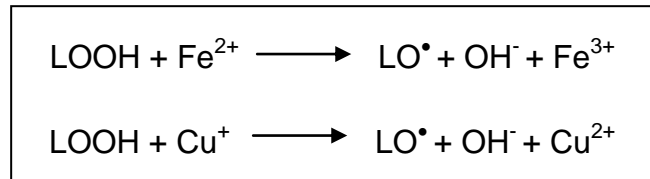


Figura 9 - Lipoperoxidação catalizada por íons de Ferro e Cobre (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ORRENIUS *et al.* 2007).

A peroxidação lipídica pode ser medida pela determinação química de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), através da quantidade de malondialdeído (MDA) formado, sendo este um importante indicador de estresse oxidativo (KOCHA *et al.* 1997; PIZZIMENTI *et al.* 2013).

#### 3.4.1.2 Dano às proteínas

Os radicais livres causam modificações estruturais nas proteínas levando a oxidação e conseqüentemente a perda da sua função e formação de grupos carbonílicos. Os resíduos carbonílicos são gerados a partir da quebra e oxidação da cadeia polipeptídica ou pela oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos como arginina, lisina, prolina e treonina (LOPACZYNSKIA; ZEISEL, 2001). A modificação de proteínas pode ser induzida por ERO, por cátions metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ), por endobióticos (GSH), no processo da fagocitose, por irradiação, por peróxidos lipídicos, por oxidoredutases, por fármacos, etc (THÉROND *et al.* 2000; SHACTER, 2000).

As proteínas têm muitos sítios reativos (BARREIROS *et al.* 2006). Durante o estresse oxidativo, o primeiro evento é a formação de um radical centrado no carbono, por extração de  $\text{H}^\bullet$  do carbono  $\alpha$ , em uma ligação peptídica, causando fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, com produção frequente de compostos carbonilados (VASCONCELOS *et al.* 2007).

De acordo com Vasconcelos *et al.* (2007) as proteínas podem conter sítios de ligação com metais que são susceptíveis a reações reversíveis de oxidação e redução, levando a produzir uma sequência de sinais que podem ser reconhecidos por proteases celulares específicas que levam a degradação das proteínas.

As ROS inibem a enzima que edita e corrige o RNA transportador, para formar a sequência correta de aminoácidos da proteína, resultando em síntese de proteínas anômalas (LING; SÖLL, 2010). Além disso, os radicais livres oxidam os aminoácidos cisteína e metionina, provocando sérias alterações na estrutura e função das proteínas (ZHANG, 2010).

A união entre proteínas danificadas e produtos da peroxidação lipídica dá origem a um pigmento fluorescente chamado de lipofuscina, o qual corresponde a um agregado que é armazenado nos lisossomos e constitui um biomarcador do envelhecimento, que se acumula no cérebro, fígado e outros órgãos ou tecidos (HÖHN *et al.* 2010; JUNG *et al.* 2010).

#### 3.4.1.3 Dano no DNA

O acúmulo de ROS representa uma importante fonte de instabilidade genômica e danos sucessivos no DNA, podendo ocasionar alterações em genes específicos responsáveis por desempenhar funções importantes na homeostasia celular. Entre eles estão os genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular, reparação de dano ao DNA e nos mecanismos antioxidantes (COUSSENS; WERB, 2002; ROESSNER *et al.* 2008).

As ERO são capazes de induzir danos diretos na molécula de DNA, como nas quatro bases do DNA, resultando em quebras simples ou duplas das cadeias com consequente modificações cromossômicas e alterações oxidativas nas bases. De forma indireta, o DNA também pode ser atingido através da peroxidação lipídica, da oxidação de proteínas e de alterações na expressão gênica (COUSSENS; WERB, 2002; KRYSTON *et al.* 2011).

O dano oxidativo devido a ação das ERO pode levar a criação de moléculas alteradas de DNA. Uma destas moléculas é chamada de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG, que se destaca pela facilidade de medição e com isso é considerada um biomarcador de dano oxidativo). Ela é potencialmente mutagênica, uma vez que tem a capacidade de se emparelhar com resíduos de adenina, aumentando a frequência de translocações espontâneas G:C→T:A (ROESSNER *et al.* 2008; DINCER *et al.* 2007).

Reações do tipo Fenton podem ocorrer constantemente ao redor do DNA (Figura 10), e o  $\text{OH}^\bullet$ , pode reagir, em sítios específicos, provocando danos às bases purinas e pirimidinas (HERMES-LIMA, 2004; NEOFYTOU *et al.* 2012; KALYANARAMAN, 2013).

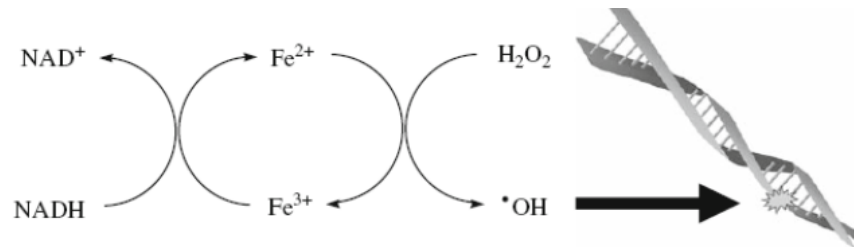


Figura 10 - Formação do radical hidroxil via reação de Fenton e subsequente ataque ao DNA. Fonte: (MATTOS, 2009).

### 3.4.2 Sistema de Defesa Antioxidante

O sistema de defesa antioxidante é uma estratégia de defesa que envolve diferentes níveis de proteção. O objetivo é impedir e/ou neutralizar a formação de ERO e reparar os danos ocasionados por elas (Figura 11). Assim, o termo antioxidante pode ser definido como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (ANGELO; JORGE, 2007).

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos para proteger seus constituintes celulares e manter o estado redox celular (DALVI, 2013). O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (HALLIWELL, 2012). A defesa não enzimática são moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação (SOUSA *et al.* 2007).

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px). Entre as principais defesas não-enzimáticas estão as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e a glutathione (GSH), todos sendo sequestradores de radicais (KALIORA *et al.* 2006; GASPARRI, 2005).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis e/ ou

reagindo com os radicais livres. Os secundários retardam o início da autoxidação, através da complexação de metais, sequestro de  $O_2$  e decomposição de LOOH para formar espécie não radical (SOUSA *et al.* 2007).

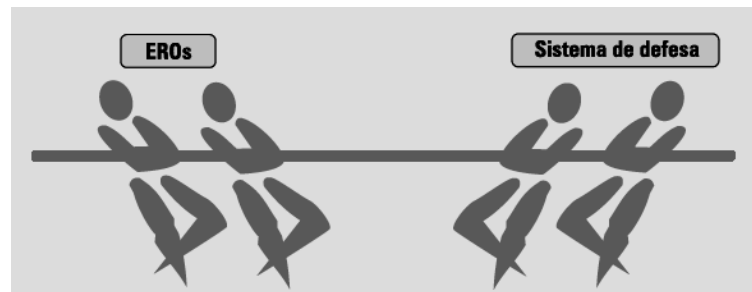


Figura 11 - Equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante. Fonte: (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

#### 3.4.2.1 Enzimas Antioxidantes

##### SUPERÓXIDO DISMUTASE

A superóxido dismutase é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das ROS (CHANDRAN *et al.* 2005; GU *et al.* 2006; AVILEZ *et al.* 2008). Ela catalisa a dismutação de dois radicais superóxido gerando  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Figura 12) (YU, 1994).

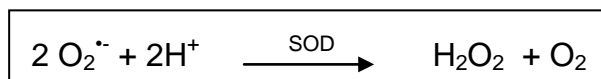


Figura 12 - Reação de dismutação do radical superóxido. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

São classificadas de acordo com seus cofatores metálicos: cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (GILL; TUJETA, 2010).

As Cu/Zn-SOD, são constituídas por duas subunidades proteicas, as quais contêm no sítio ativo um íon cobre e um íon zinco. Estão localizadas em todas as células eucarióticas e possuem estabilidade ao calor, ao ataque de proteases e à desnaturação. As Mn-SOD são formadas por quatro subunidades proteicas, contendo um íon manganês por subunidade e estão localizados na matriz

mitocondrial. As Fe-SOD apresentam duas subunidades proteicas, com um ou dois íons ferro por molécula de enzima e estão presentes em bactérias, algas e plantas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

## CATALASE

A CAT é uma das principais enzimas na eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ela converte duas moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 2 moléculas de H<sub>2</sub>O e uma molécula de O<sub>2</sub> (Figura 13) (HELDT; HELDT, 2005; DUBEY, 2011). A atividade da CAT é efetiva, principalmente, quando os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estão mais elevados, por isso são consideradas indispensáveis em condições de estresse oxidativo (DUBEY, 2011).



Figura 13 - Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

A CAT é expressa em vários tecidos, apresentando alta atividade no fígado, sangue e rins e menor atividade no tecido cardíaco, pulmão e cérebro (HO *et al.* 2004).

## GLUTATIONA PEROXIDASE

A GSH tem como função proteger as células contra danos oxidativos causados por radicais oxidantes, sequestrando-os a fim de manter o balanço redox da célula e defendê-la contra agentes eletrofílicos (ANGELO; JORGE, 2007; DALVI *et al.* 2013; KALIORA; DEDOUSSIS, 2006; GASPARRI, 2005).

O mecanismo de ação da GSH-Px ocorre por meio da redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de hidroperóxidos orgânicos com utilização da GSH, que atua como co-substrato da GSH-Px, tendo propriedade de doador de elétrons, a qual poderá ser regenerada por meio da glutathione redutase (GR) com a transferência de hidrogênio do NADPH formado pela via pentose-fosfato (Figura 14) (ANGELO; JORGE, 2007; DALVI *et al.* 2013; KALIORA; DEDOUSSIS, 2006; GASPARRI, 2005).



A GSH-Px, tem um papel importante na detoxificação de substâncias geradas pelos xenobióticos, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou peróxidos orgânicos, cofatores para formação de glutathiona oxidada (GSSG) (TEKMAN *et al.* 2008). A GSH-Px converte a GSH à GSSG, removendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e formando água (Figura 14) (FERRARI *et al.* 1985).

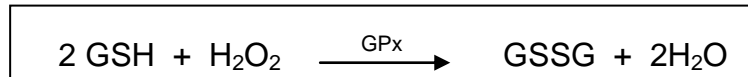


Figura 14 - Reação catalisada pela enzima glutathiona peroxidase. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

As enzimas CAT e GSH-Px agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do  $\text{OH}^\bullet$ , contra o qual não há sistema enzimático de defesa (Figura 15) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

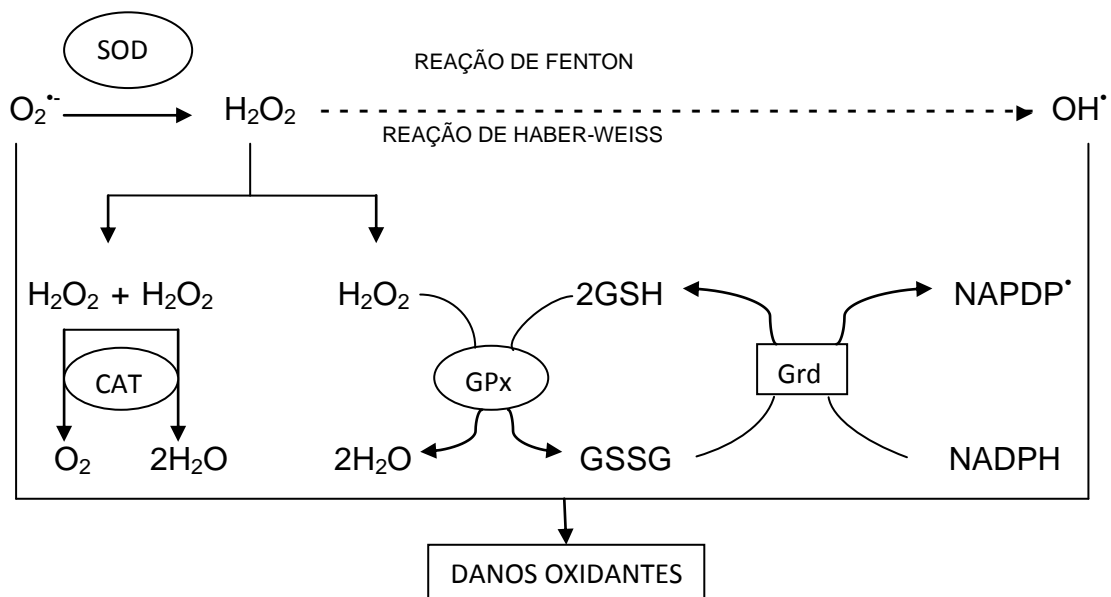


Figura 15 - Integração dos sistemas de defesa enzimático. Fonte: (ROVER *et al.* 2001).

A GSH-Px é largamente utilizada como biomarcadora, apresentando resultados expressivos em diversas situações de estresse, seja por compostos orgânicos ou inorgânicos (COGO *et al.* 2009).

### 3.4.2.2 Antioxidantes exógenos

#### ÁCIDO ASCÓRBICO

O Ácido Ascórbico (vitamina C) é um micronutriente solúvel em água, necessário para várias funções biológicas. Atua como cofator em reações enzimáticas, como na síntese de colágeno (DARR *et al.* 1993). Ele é amplamente distribuído em todos os tecidos do corpo, e recicla outros antioxidantes, como a vitamina E e a GSH (HALLIWELL, 2001).

A Vitamina C é encontrada na natureza sob duas formas: reduzida (ácido ascórbico) ou na forma oxidada (ácido deidroascórbico). As duas são ativas, porém a forma oxidada está menos difundida nas substâncias naturais. A transformação do ácido ascórbico em ácido deidroascórbico acontece de forma natural no organismo e é reversível (ROCHA *et al.* 2013).

Essa vitamina desempenha uma função muito importante na varredura do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio,  $OH^{\cdot}$ , oxigênio *singlet* e óxido de nitrogênio reativo (BARROS *et al.* 2011). O ascorbato é um importante antioxidante na ausência de metais de transição, enquanto que na presença destes, possui propriedades pró-oxidantes (BERGENDI *et al.* 1999).

A ingestão adequada de vitamina C é importante, pois age prevenindo o acúmulo excessivo de radicais livres no organismo, ajudando assim a combater o envelhecimento precoce dos tecidos (BARROS; BOCK, 2009). Devido a sua solubilidade em água, acredita-se que ela faça parte da primeira linha de defesa do organismo e pela facilidade em doar elétrons apresenta também ação antioxidante (SILVA; COZZOLINO, 2009). Devido as suas características, a vitamina C ajuda a prevenir a oxidação das moléculas solúveis em água e, indiretamente, protege as vitaminas A e E da oxidação (TORRES *et al.* 2003).

#### VITAMINA E

A vitamina E com sua complexa função biológica, tem gerado enorme interesse entre as comunidades de ciências básicas e clínicas, devido a sua

utilidade aparente no combate a uma série de distúrbios relacionados ao estresse oxidativo (COMBS, 2012).

Segundo Batlouni (1997) a vitamina E, cuja forma mais prevalente e ativa é o alfa-tocoferol, é o antioxidante lipossolúvel predominante nos tecidos. Estudos laboratoriais demonstraram que a vitamina E é um antioxidante extremamente potente, que captura os radicais peroxila, interrompendo a cadeia de peroxidação lipídica. Protege os lípideos poliinsaturados da lesão pelos radicais livres e parece essencial à proteção das lipoproteínas circulantes e ao funcionamento adequado das membranas celulares.

Os compostos vitamínicos E apresentam estabilidade na ausência de  $O_2$  e lípideos oxidantes. Em contrapartida, a taxa de degradação da vitamina E aumenta quando o  $O_2$  está presente, demonstrando ser mais rápida quando radicais livres estão presentes (DAMODARAM, 2010).

No cérebro, tem sido mostrado que a vitamina E possui papel protetor, pois é capaz de reduzir a degeneração de células hipocâmpais após isquemia cerebral (HARA *et al.* 1990). Dados da literatura indicam que a suplementação de vitamina E aumenta os níveis de GSH e diminui a concentração de lípideos peroxidados em eritrócitos (JAIN *et al.* 2000), pois ela possui a propriedade de finalizar a propagação de reações dos radicais livres nas membranas lipídicas (MARSHALL; BANGERT, 1995).

As vitaminas C e E apresentam um efeito cooperativo, a interação destas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lípideos da membrana e na proteção ao DNA (GEY, 1998). A vitamina C regenera a vitamina E à sua forma reduzida doando elétrons ao radical  $\alpha$ -tocoferil, prolongando dessa maneira, seu efeito antioxidante (CARR; FREI, 1999; SENER *et al.* 2005).

## L-NAME

O L-NAME é um potente inibidor sintético da enzima NOS, é análogo ao substrato, a L-arginina, e age como agonista competitivo da arginina, pois compete com esta pelo sítio ativo da NOS (SHINDE *et al.* 2000), impedindo dessa forma a geração de citrulina e NO.

O NO é sintetizado endogenamente pela ação da enzima NOS em tecidos especializados tendo como precursora a L-arginina (LAW *et al.* 2001). O NO é um radical livre e em muitos sistemas biológicos tem meia vida curta, devido a sua reatividade com outros constituintes intracelulares, como o  $O_2^-$  (BECKMAN *et al.* 1993). A reação entre o NO e  $O_2^-$  resulta na formação do  $ONOO^-$ , o qual é citotóxico (LIPTON *et al.* 1993). Esta reação é extremamente favorável, pois o NO pode efetivamente competir com a enzima SOD pelo  $O_2^-$  (BECKMAN *et al.* 1993). Em meio ácido, o  $ONOO^-$  é transformado em ácido peroxinítrico, o qual leva a formação espontânea de  $OH^\bullet$ . Os nitratos são os produtos finais dessas reações (BERGENDI *et al.* 1999).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar de 60 dias de idade (tamanho aproximado da amostra: 54), provenientes da Empresa Tecpar (Curitiba). Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade. Foram mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro à temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água. Foram distribuídos seis animais por gaiolas. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade da Região de Joinville.

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996.

### 4.2 Protocolo experimental

#### 4.2.1 Estudos *in vitro*

Foram utilizados ratos machos Wistar não tratados, ou seja, os mesmos não foram submetidos a nenhum tratamento antes do sacrifício.

Os compostos guanidínicos N-alfa-acetilarginina e Homoarginina foram adicionados aos todos de ensaio a fim de se obter as seguintes concentrações finais: 0,1, 1,0 e 5,0  $\mu\text{M}$ ; 1,0, 10,0 e 20,0  $\mu\text{M}$  e 0,1, 1,0 e 5,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O grupo controle foi realizado sem a adição dos compostos guanidínicos.

#### 4.2.2 Prevenção com trolox, ácido ascórbico e L-NAME

Os ratos foram divididos em grupos: grupo 1 (controle-salina), grupo 2 (compostos guanidínicos), grupo 3 (controle-trolox 1,0 mM), grupo 4 (controle-ácido ascórbico 1,0 mM), grupo 5 (controle-L-NAME 1,0 mM), grupo 6 (compostos

guanidínicos + trolox 1,0 mM), grupo 7 (compostos guanidínicos + ácido ascórbico 1,0 mM) e grupo 8 (compostos guanidínicos + L-NAME 1,0 mM). Após a adição dos compostos descritos acima, os tubos de ensaio foram incubados por 1 hora a temperatura de 37°C.

As doses de trolox, ácido ascórbico e L-NAME seguiram os protocolos descritos por Streck *et al.* (2001), Silva *et al.* (2004) e Qi *et al.* (1995).

### **4.3 Estudos bioquímicos**

#### **4.3.1 Preparação dos eritrócitos e do plasma**

Os ratos foram sacrificados por decapitação e o sangue total obtido foi utilizado para preparar as amostras de eritrócitos e de plasma.

O sangue total foi centrifugado a 3.500 rpm e o plasma foi separado e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes. Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados 3 vezes e centrifugados a 3.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína.

#### **4.3.2 Preparação dos tecidos**

O rim e o fígado foram removidos, decapsulados e mantidos em gelo com tampão fosfato de sódio. O córtex renal foi cuidadosamente separado da medula renal. O homogeneizado (1:10) foi preparado em tampão fosfato de sódio 20mM, pH 7,4, 140mM de cloreto de potássio (KCl) usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 3.500 rpm a 4°C por 10 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, dano a lipídeos e dano a proteínas (FERREIRA *et al.* 2012).

#### 4.3.3 TBA-RS

TBA-RS é usado como um índice de dano a lipídeos e foi determinado pelo método de Esterbauer e Cheeseman (1990). TBA-RS foi determinado espectrofotometricamente a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondealdeído por mg de proteína.

#### 4.3.4 Conteúdo total de Sulfidrilas

Foi determinado pelo método de Aksenov e Markesbery (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. Resumidamente, 50 µL de homogeneizado foram adicionados a 1 ml de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30 µl de DTNB 10mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

#### 4.3.5 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984). A decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorada em espectrofotômetro a 240 nm por 90 segundos. Uma unidade de enzima é definida como 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto e a atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

#### 4.3.6 Glutationa peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi determinada pelo método de Wendel (1981) com algumas modificações. O tert-butil-hidroperóxido foi utilizado como substrato da reação. A decomposição da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 4 minutos. Uma unidade de enzima é definida como 1 µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

#### 4.3.7 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto oxidação do pirogallol, como descrito por Marklund (1985). A auto oxidação do pirogallol foi continuamente monitorada com espectrofotômetro em 420nm. A atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

#### 4.3.8 Dosagem de proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

### 4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via seguido pelo Teste Múltiplo de Duncan quando indicado.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Artigo 1

Artigo publicado em: Cell biochemistry and function

Cell Biochem Funct 2014; 32: 511–519.

Published online 15 July 2014 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/cbf.3045

#### **EFFECT OF *N*-ACETYLARGININE, A METABOLITE ACCUMULATED IN HYPERARGININEMIA, ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN RATS: PROTECTIVE ROLE OF VITAMINS AND L-NAME**

#### ***N*-ACETYLARGININE INDUCES OXIDATIVE STRESS**

Simone Sasso <sup>1</sup>, Leticia Dalmedico <sup>2</sup>, Débora Delwing-Dal Magro <sup>3</sup>, Angela T.S.  
Wyse <sup>4</sup>, Daniela Delwing-de Lima <sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Mestrado 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 Farmácia, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE,  
Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC,  
Brazil.

<sup>3</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.

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>5</sup> Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, 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, Brasil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: [daniela.delwing@univille.br](mailto:daniela.delwing@univille.br)

## ABSTRACT

In the present investigation, we initially evaluated the *in vitro* effect of N-acetylgarginine on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the blood, kidney and liver of rats. Results showed that N-acetylgarginine, at a concentration of 5.0  $\mu\text{M}$ , decreased the activity of CAT in erythrocytes, enhanced TBA-RS in the renal cortex, decreased CAT and SOD activities in the renal medulla and decreased CAT and increased SOD and GSH-Px activities in the liver of 60-day-old rats. Furthermore, we tested the influence of the antioxidants, trolox and ascorbic acid, as well as of the N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase) on the effects elicited by N-acetylgarginine on the parameters tested. Antioxidants and L-NAME prevented most of the alterations caused by N-acetylgarginine on the oxidative stress parameters evaluated. Data indicate that oxidative stress induction is probably mediated by the generation of NO and /or ONOO<sup>-</sup> and other free radicals, since L-NAME and antioxidants prevented the effects caused by N-acetylgarginine in the blood, renal tissues and liver of rats. Our findings lend support to a potential therapeutic strategy for this condition, which may include the use of appropriate antioxidants for ameliorating the damage caused by N-acetylgarginine.

**Keywords:** N-acetylgarginine; oxidative stress; antioxidants; blood; kidney; liver.

## INTRODUCTION

Hyperargininemia is an inherited metabolic disorder caused by severe deficiency of liver arginase activity, the last enzyme of the urea cycle.<sup>1</sup> Tissue levels of arginine (Arg) and their derivatives (guanidine compounds, GC) are increased in human hyperargininemia.<sup>2,3</sup> According to Deignan and collaborators,<sup>4</sup> Arg is increased in the plasma, liver, kidneys and brain of Arginase I-knockout and double-knockout mice, as compared to wildtype controls.

A potential neurotoxic role for Arg and its metabolites, the GC, such as N-acetylarginine, homoarginine and argininic acid has been suggested,<sup>1,4-6</sup> as an explanation for the peculiar neurological involvement described in these patients. GC are increased in plasma and the cerebrospinal fluid of hyperargininemic patients.<sup>2,3,7</sup> Moreover, changes in nucleotide hydrolysis,<sup>8</sup> membrane fluidity,<sup>9</sup> or oxidative stress<sup>10</sup> may further contribute to the disease's pathophysiology.

Furthermore, increases in Arg levels may result in increased nitric oxide (NO) production, and a possible role for NO in the pathophysiology of hyperargininemia has been suggested.<sup>11-15</sup> Despite the important physiological roles attributed to NO, excessive generation of this molecule and also of its derivative peroxynitrite anion (ONOO<sup>-</sup>) have been implicated in the pathophysiology of common conditions such as stroke, Alzheimer's and Parkinson diseases, cardiovascular disease, atherogenesis, and the atherosclerotic state.<sup>16-18</sup> In this context, chemical reactions of NO with the ONOO<sup>-</sup> and with other free radicals lead to the production of highly reactive intermediates.<sup>19</sup>

Reactive oxygen species (ROS) are chemically reactive molecules that contain oxygen. Examples include superoxide ions and hydroxyl radicals as well as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>20,21</sup> The production of ROS is one of the most important factors in the induction of neuronal death. The generation of ROS and free radicals mediates changes in cellular signaling pathways, gene regulation, oxidative damage of proteins and lipid peroxidation.<sup>22,23</sup>

The purpose of this study was to investigate the *in vitro* effects of different concentrations of N-acetylarginine, which are increased in the plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of hyperargininemic patients, on TBA-RS (an important parameter of lipoperoxidation), total sulfhydryl content (an important parameter of

damage to protein) and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, GSH-Px and SOD) in the blood, kidney and liver of rats. Furthermore, we tested the influence of the antioxidants,  $\alpha$ -tocopherol (trolox) and ascorbic acid and of the N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor) on the effects elicited by N-acetylarginine in order to investigate the possible participation of free radicals on the effects of N-acetylarginine on these parameters.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and reagents**

Sixty-day-old Wistar rats (180-200g), obtained from the Tecpar Company, Curitiba, Brazil, were used in the experiments. The animals from our own breeding stock were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), with free access to water and commercial protein chow. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Region Joinville, Joinville, Brazil. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

### **In vitro studies**

For *in vitro* experiments, untreated sixty-day-old rats were used. N-acetylarginine was added to the assay at 0.1  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$  and 5.0  $\mu\text{M}$  final concentrations. Control experiments were performed without N-acetylarginine addition.

### **Trolox ( $\alpha$ -tocopherol), ascorbic acid and L-NAME administration**

The assays were divided into eight groups: Group 1 (control-saline), group 2 (N-acetylarginine), group 3 (control - 1.0 mM trolox), group 4 (N-acetylarginine + 1.0 mM trolox), group 5 (control - 1.0 mM ascorbic acid), group 6 (N-acetylarginine

+ 1.0 mM ascorbic acid), group 7 (control - 1,0 mM L-NAME), and group 8 (N-acetylarginine + 1.0 mM L-NAME). The doses of trolox, ascorbic acid and L-NAME utilized were chosen according to Wyse, et al.<sup>24</sup>, Silva, et al.<sup>25</sup> and Qi et al.<sup>26</sup> respectively.

### **Erythrocyte and plasma preparation**

Erythrocytes and plasma were prepared from whole blood samples obtained from rats. Whole blood was collected and transferred to heparinized tubes for erythrocyte separation. Blood samples were centrifuged at  $1,000 \times g$ , plasma was removed by aspiration and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100  $\mu\text{L}$  of washed erythrocytes and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination of the antioxidant enzyme activities.

For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thawed three times, and centrifuged at  $13,500 \times g$  for 10 min. The supernatant was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein.

### **Tissues preparation**

After decapitation, the liver and kidney were removed, decapsulated and kept in ice-cold buffered sodium phosphate (20mM, pH 7.4, 140mM KCl). The renal cortex was carefully separated from renal medulla. The liver, renal cortex and renal medulla were homogenized in 10 volumes (1:10w/v) of 20mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140mM KCl. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India); by passing 5 pulses and centrifuged at  $800^{\circ}g$  for 10min at  $4^{\circ}\text{C}$ , to discard nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for assaying the free-radical scavenging enzymes, total sulfhydryl content and for estimation of lipid peroxidation.<sup>27</sup>

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

TBA-RS were determined according to the method described by Esterbauer and Cheeseman<sup>28</sup>. TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyl free radicals. For the *in vitro* measurements, plasma and tissues were mixed with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 25 min. TBA-RS was determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS was calculated as nanomole of malondialdehyde formed per milligram of protein.

### **Total Sulphydryl Content**

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery,<sup>29</sup> which is based on the reduction of 5,50-dithio-bis (2- nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412nm. Briefly, 50µl of homogenate were added to 1ml of PBS buffer pH 7.4 containing 1mM EDTA. The reaction was started by the addition of 30µL of 10mM DTNB and incubated for 30min at room temperature in a dark room. Results are reported as nmol TNB/mg protein.

### **Catalase Assay (CAT)**

CAT activity was assayed by the method of Aebi.<sup>30</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer at 240 nm for 90 s. One unit of the enzyme is defined as 1 µmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute and specific activity is reported as units per mg protein.

### **Glutathione Peroxidase (GSH-Px)**

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel,<sup>31</sup> except for the concentration of NADPH, which was adjusted to 0.1 mM after previous tests

performed in our laboratory. Tert-butylhydroperoxide was used as substrate. NADPH disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer at 340 nm for 4 min. One GSH-Px unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute and specific activity is reported as units per mg protein.

### **Superoxide Dismutase (SOD) assay**

This method, used for the assay of SOD activity, is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on O<sub>2</sub>, which is a substrate for SOD<sup>32</sup>. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm. A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. The results were reported as units/mg protein.

### **Protein determination**

Protein was measured by the Lowry et al.<sup>33</sup> method, using serum bovine albumin as standard.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed by ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, when the F-test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC compatible computer. Values of  $P < 0.05$  were considered to be significant.

## **RESULTS**

*In vitro* effects of N-acetylarginine on TBA-RS and on total sulfhydryl content in plasma and on the activities of antioxidant enzymes in the erythrocytes of rats.



We first studied the *in vitro* effects of different concentrations of N-acetylgarginine (0.1  $\mu$ M - 5.0  $\mu$ M) on an important parameter of lipoperoxidation, namely TBA-RS and on total sulfhydryl content in plasma and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the erythrocytes of rats. Figure 1 shows that N-acetylgarginine decreased the activity of CAT (B) {5.0  $\mu$ M (47%), [F(3,20)=10.943;  $p$ <0.001]} in the erythrocytes of rats, as compared to the control group. In contrast, N-acetylgarginine did not alter TBA-RS (A) [F(3,20)=1.035;  $p$ >0.05] and total sulfhydryl content [F(3,20)=1.580;  $p$ >0.05] (data not shown) in the plasma or the activities of SOD (C) [F(3,23)=0.343;  $p$ >0.05] and GSH-Px (D) [F(3,24)=0.303;  $p$ >0.05] in the erythrocytes of 60-day-old rats.

*In vitro* effects of N-acetylgarginine on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the kidney of rats.

The *in vitro* effects of different concentrations of N-acetylgarginine (0.1  $\mu$ M - 5.0  $\mu$ M) on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the kidney (cortex and medulla) of rats were also verified. As can be seen in Figure 2, N-acetylgarginine at a concentration of 5.0  $\mu$ M enhanced TBA-RS (A) {46,7%, [F(3,20)=5.265;  $p$ <0.001]}, but did not alter total sulfhydryl content [F(3,20)=1.992;  $p$ >0.05] (data not shown) and the activities of CAT (B) [F(3,22)=1.451;  $p$ >0.05], SOD (C) [F(3,20)=2.468;  $p$ >0.05] and GSH-Px (D) [F(3,24)=0.068;  $p$ >0.05] in the renal cortex of rats. Regarding the renal medulla of rats, N-acetylgarginine (5.0  $\mu$ M) decreased CAT (B) {68%, [F(3,23)=13.375;  $p$ <0.001]} and SOD (C) {56,1%, [F(3,21)=5,830;  $p$ <0.01]} activities, but did not alter TBA-RS (A) [F(3,22)=1.122;  $p$ >0.05], total sulfhydryl content [F(3,20)=0.282;  $p$ >0.05] (data not shown) and GSH-Px activity (D) [F(3,24)=0.166;  $p$ >0.05], as compared to the control group.

*In vitro* effects of N-acetylgarginine on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the liver of rats.

Subsequently, the *in vitro* effects of N-acetylgarginine (0.1  $\mu$ M - 5.0  $\mu$ M) on the same parameters analyzed were also verified in the liver of 60-day-old rats. Figure 3 shows that N-acetylgarginine (5.0  $\mu$ M), when added to the incubation medium,

decreased CAT (B) {39%, [F(3,20)=15.784;  $p < 0.001$ ]}, and increased SOD (C) {38,1%, [F(3,20)=4.639;  $p < 0.05$ ]} and GSH-Px (D) {42,5%, [F(3,21)=4.217;  $p < 0.05$ ]} activities in the liver of rats, as compared to the control group. On the other hand, no alteration was observed in TBA-RS (A) [F(3,21)=0.530;  $p > 0.05$ ] or total sulfhydryl content [F(3,20)=0.323;  $p > 0.05$ ] (data not shown), at any of the concentrations tested.

*Influence of trolox, ascorbic acid and L-NAME on the effects elicited by N-acetylgarginine in the blood, kidney and liver of rats.*

Finally, we also evaluated the influence of the antioxidants, trolox and ascorbic acid, as well as L-NAME on the effects elicited by N-acetylgarginine in the blood, kidney (renal cortex and medulla) and liver of rats, in order to verify the possible participation of free radicals in the effects of N-acetylgarginine on TBA-RS and in the activities of CAT, SOD and GSH-Px activities. With regard to the influence of the antioxidants and L-NAME on the effects elicited by N-acetylgarginine, *post hoc* analyses showed that the antioxidants and L-NAME did not alter these parameters *per se*. As can be observed in Figure 4, the antioxidants and L-NAME were able to prevent the increase in TBA-RS (A) [F(7,40)=4.442;  $p < 0.001$ ] in the renal cortex of rats. With regard to CAT activity, ascorbic acid and L-NAME, but not trolox, were able to prevent the reduction in CAT activity (B) [F(7,40)=11.467;  $p < 0.001$ ] in the erythrocytes of rats. On the other hand, the antioxidants and L-NAME were able to prevent the decrease in CAT activity (C) [F(7,40)=5.043;  $p < 0.001$ ] and SOD activity (D) [F(7,40)=11.983;  $p < 0.001$ ] in the renal medulla; the decrease in CAT activity (E) [F(7,40)=14.726;  $p < 0.001$ ] and the increase in SOD activity (F) [F(7,40)=4.928;  $p < 0.001$ ] and GSH-Px activity (G) [F(7,40)=3.696;  $p < 0.05$ ] in the liver of 60-day-old rats.

## **DISCUSSION**

Oxidative stress is caused by an imbalance between the production of ROS and the ability of a biological system to detoxify the reactive intermediates or easily repair the resultant damage. Oxidative stress contributes to the development of various diseases, such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, fragile X syndrome,

diabetes, atherosclerosis, cancer, liver cirrhosis, and the aging process and is commonly observed in some inborn errors of intermediary metabolism.<sup>34-39</sup> Excessive production of ROS causes oxidative damage to various biological macromolecules including DNA, lipids and proteins, thereby disrupting cellular function and ultimately inducing apoptosis or necrosis.<sup>40-43</sup> Endogenous and exogenous antioxidants, as well as the antioxidative defense enzymes are crucial for tissue protection under oxidative stress. Some studies have shown that many natural substances are potential neuroprotective agents.<sup>44-46</sup>

The evaluation of the extent of blood oxidative stress by standardized methods can be useful to define the role of oxidative stress in different pathologies and can be used for clinical diagnosis.<sup>47</sup> In the present investigation, we initially investigated the *in vitro* effects of different concentrations of N-acetylarginine (0.1  $\mu\text{M}$  - 5.0  $\mu\text{M}$ ) on an important parameter of lipoperoxidation, namely TBA-RS and on an important parameter of damage to protein, as measured by total sulfhydryl content in the plasma, as well as the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the erythrocytes of rats. Results showed that N-acetylarginine, at a concentration of 5.0  $\mu\text{M}$ , decreased the activity of CAT in the erythrocytes of rats, indicating that N-acetylarginine compromised the antioxidant enzymatic defense. In contrast, this GC did not alter the activities of SOD and GSH-Px in the erythrocytes and TBA-RS and total sulfhydryl content in the plasma of 60-day-old rats, as compared to the control group. CAT metabolizes  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which is an oxidizing agent that is naturally produced in organisms as a by-product of oxidative metabolism; however excessive  $\text{H}_2\text{O}_2$  production causes oxidative damage.<sup>48,49</sup>

According to the literature, the kidney is highly vulnerable to damage caused by ROS, likely due to the abundance of long chain polyunsaturated fatty acids in the composition of renal lipids.<sup>50</sup> Furthermore, we also investigated the *in vitro* effects of different concentrations of N-acetylarginine (0.1  $\mu\text{M}$  - 5.0  $\mu\text{M}$ ) on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the kidney (cortex and medulla) of rats. Our results showed that N-acetylarginine (at a concentration of 5.0  $\mu\text{M}$ ) enhanced TBA-RS, but did not alter total sulfhydryl content and the activities of CAT, SOD and GSH-Px in the renal cortex of rats, suggesting that this GC induces lipid peroxidation in this structure. Lipoperoxidation, the oxidative catabolism of polyunsaturated fatty acids, is widely

accepted as a general mechanism for cellular injury and death and has been implicated in diverse pathological conditions.<sup>51,52</sup> N-acetylgarginine (5.0  $\mu\text{M}$ ) decreased CAT and SOD activities in the renal medulla of rats, but did not alter TBA-RS, total sulfhydryl content and GSH-Px activity, as compared to the control group. SOD is a major defense for aerobic cells in combating the toxic effects of superoxide radicals,<sup>53</sup> while CAT is an enzyme antioxidant, which decomposes hydroxyl radicals and is widely distributed in all animal tissues with the highest activity in the red blood cells and liver.<sup>54</sup> Reductions in these enzyme activities result in various deleterious effects due to the accumulation of superoxide and hydroxyl radicals. Results demonstrated that this metabolite decreased antioxidant defenses in the renal medulla of rats and also suggest that the renal cortex is more susceptible to lipoperoxidation induced by N-acetylgarginine.

Considering that the liver plays a central role in the maintenance of systemic lipid homeostasis and is especially susceptible to ROS damage,<sup>55</sup> the *in vitro* effects of N-acetylgarginine (0.1  $\mu\text{M}$  - 5.0  $\mu\text{M}$ ) on the same parameters analyzed in the blood and kidney were also verified in the liver of 60-day-old rats. Results showed that N-acetylgarginine (5.0  $\mu\text{M}$ ), when added to the incubation medium, decreased CAT and increased SOD and GSH-Px activities in the liver of rats, as compared to the control group. On the other hand, no alteration was observed in TBA-RS and total sulfhydryl content, at any of the concentrations tested. Since SOD activity is enhanced, which increases the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the reduction in CAT activity might be due to the consumption of the enzyme, in an attempt to prevent oxidative stress. The reduction in this enzyme activity results in various deleterious effects due to the accumulation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and hydroxyl radicals. GSH-Px removes organic hydroperoxides, as well as hydrogen peroxide.<sup>48</sup> The increase in GSH-Px activity probably occurred to offset the reduction caused in CAT activity. Previous data have shown that antioxidant enzymes may respond to oxidative stress by increasing their activity in order to reduce damages.<sup>56</sup> It is important to point out that enzymes investigated in this study seem to have a different response to ROS, depending on the tissue investigated. Although we cannot precisely establish the mechanisms by which an increase in SOD and GSH-Px activities in the liver were detected, it is possible that this occurred due to the increased generation of free radicals, provoked by N-acetylgarginine.

Finally, we also evaluated the influence of the antioxidants, trolox and ascorbic acid, as well as L-NAME, a potent nitric oxide synthase inhibitor, on the effects elicited by N-acetylgarginine in the blood, kidney (renal cortex and medulla) and liver of rats, in order to verify the possible participation of free radicals in the effects of N-acetylgarginine on the antioxidant enzyme activities and on TBA-RS. The use of antioxidants in the prevention and cure of various diseases is intensifying, and there is considerable interest in the study of the antioxidant activities of molecules.<sup>57,58</sup> Antioxidants appear to act against disease processes by increasing the levels of endogenous antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation.<sup>59</sup> With regard to the influence of the antioxidants and L-NAME on the effects elicited by N-acetylgarginine, *post hoc* analyses showed that the antioxidants and L-NAME did not alter these parameters *per se*. On the other hand, antioxidants and L-NAME were able to prevent the increase in TBA-RS in the renal cortex of rats; ascorbic acid and L-NAME, but not trolox were able to prevent the reduction in CAT activity in the erythrocytes of rats. The antioxidants and L-NAME were able to prevent the decrease in CAT and SOD activities in the renal medulla and prevented decreases in CAT activity and the increased SOD and GSH-Px activities in the liver of rats. Results suggest that the scavenging of free radicals by trolox, ascorbic acid and L-NAME are involved in the effects of N-acetylgarginine on the parameters analyzed.

In summary, our findings suggest that N-acetylgarginine alters antioxidant defenses and induces lipid peroxidation. Furthermore, our results demonstrate that the alterations in the parameters of oxidative stress studied are probably mediated by the generation of NO and /or ONOO<sup>-</sup> and other free radicals, which are scavenged by trolox and ascorbic acid, since these antioxidants prevented the effects caused by the *in vitro* administration of N-acetylgarginine in the blood, kidney and liver of rats. In addition, our findings reinforce data that lend support to a novel adjuvant therapeutic strategy, based on antioxidant vitamins, for ameliorating the alterations caused by arginine and GC in Hyperargininemia.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Universidade da Região de Joinville and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC.

## REFERENCES

1. Brusilow SW, Horwich A. 2001. Urea Cycle enzymes. In *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed.). McGraw-Hill: New York; 1909-1963.
2. Marescau B, Qureshi IA, De Deyn PP, *et al.* Guanidino compounds in plasma, urine and cerebrospinal fluid of hyperargininemic patients during therapy. *Clin Chim Acta* 1985; **146**: 21–27.
3. Marescau B, De Deyn PP, Lowenthal A, *et al.* Guanidino compounds analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: follow-up of guanidine compounds levels during therapy. *Pediatr Res* 1990; **27**: 297–303.
4. Deignan JL, Marescau B, Livesay JC, *et al.* Increased plasma and tissue guanidino compounds in a mouse model of hyperargininemia. *Mol Genet Metab* 2008; **93**: 172–178.
5. De Deyn PP, Marescau B, Qureshi IA, 1997. Hyperargininemia: a treatable inborn error of metabolism? In *Guanidino Compounds*. De Deyn PP, Marescau B, Qureshi IA, (ed.). J. Libbey: London; 53-69.
6. Hiramatsu M. A role for guanidine compounds in the brain. *Mol Cell Biochem* 2003; **244**: 57–62.
7. Mizutani N, Hayakawa C, Ohya Y, *et al.* Guanidino compounds in hiperargininemia. *J Exp Med* 1987; **153**: 197–205.
8. Balz D, Wyse AT, Morsch VM, *et al.* In vitro effects of L-arginine and guanidino compounds on NTPDase1 and 5'-nucleotidase activities from rat brain synaptosomes. *Int J Dev Neurosci* 2003; **21**: 75–82.
9. Silva CG, Parolo E, Streck EL, *et al.* In vitro inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hiperargininemia. *Brain Res* 1999; **838**: 78–84.

10. Wyse AT, Bavaresco CS, Hagen ME, *et al.* In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hiperargininemia. *Brain Res* 2001a; **923**: 50–57.
11. Buchmann I, Milakofsky L, Harris N, *et al.* Effect of arginine administration on plasma and brain levels of arginine and various related amino compounds in the rat. *Pharmacology* 1996; **53**: 133–142.
12. Wyse ATS, Bavaresco CS, Bandinelli C, *et al.* Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. *Neurochem Res* 2001b; **26**: 515–520.
13. Reis EA, Oliveira LS, Lamers ML, *et al.* Arginine administration inhibits hippocampal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Res* 2002; **951**: 151–157.
14. Delwing D, Tagliari B, Streck EL, *et al.* Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. *Brain Res* 2003; **983**: 58–63.
15. Scaglia F, Brunetti-Pierri N, Kleppe S, *et al.* Clinical consequences of urea cycle enzyme deficiencies and potential links to arginine and nitric oxide metabolism. *J Nutr* 2004; **134**: 2775S–2782S.
16. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide in neuronal degeneration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; **211**: 33–40.
17. White CR, Brock TA, Chang LY, *et al.* Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 1044–1048.
18. Heales SJ, Bolanõs JP, Stewart VC, *et al.* Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochem Biophys Acta* 1999; **1410**: 215–228.
19. Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry* 2002; **67**: 281–292.
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press: Oxford, 1999; 82-83.
21. Cash TP, Yi P, Celeste MS. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radical Biol Med* 2007; **43**: 1219–1325.
22. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2006; **13**: 129–142.
23. Shrilatha B, Muralidhara DR. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male

- reproductive milieu in the streptozotocin-diabetic rat. *Int J Androl* 2007; **30**: 508–518.
24. Wyse ATS, Zugno AI, Streck EL, *et al.* Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 2002; **27**: 1685–1689.
  25. Silva CG, Bueno ARF, Schuck PF, *et al.* Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Neurochem Int* 2004; **44**: 45–52.
  26. Qi B, Yamagami T, Naruse Y, *et al.* Effect of taurine on depletion of erythrocyte membrane Na-K ATPase activity due to ozone exposure or cholesterol enrichment. *J Nutr Sci Vitaminol* 1995; **41**: 627–634.
  27. Ferreira AGK, Cunha AA, Machado FR, *et al.* Experimental Hyperprolinemia Induces Mild Oxidative Stress, Metabolic Changes, and Tissue Adaptation in Rat Liver. *Journal of Cellular Biochemistry* 2012; **113**: 174–183.
  28. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; **186**: 407–421.
  29. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; **302**: 141–145.
  30. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 121–126.
  31. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Method Enzymol* 1981; **77**: 325–332.
  32. Marklund SL. 1985. Pyrogallol autoxidation. In: Handbook for oxygen radical research. Greenwald RA (ed.); CRC press: Boca Raton; 243–247.
  33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265–267.
  34. Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat: Involvement of estrogen receptors and oxidative stress. *Neurosci Letters* 2010; **480**: 206–210.
  35. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; **68**: 989–998.
  36. Colome C, Sierra C, Vilaseca MA. Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Méd Clin* 2000; **115**: 111–117.



37. Kennedy G, Spence VA, McLaren M, *et al.* Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms. *Free Rad Biol Med* 2005; **39**: 584–589.
38. Mu X, He GR, Cheng YX, *et al.* Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental Parkinsonism in vivo and in vitro. *Pharm Biochem Behav* 2009; **92**: 642–648.
39. Wajner M, Latini A, Wyse ATS, *et al.* The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 2004; **27**: 427–448.
40. Gardner AM, Xu FH, Fady C, *et al.* Apoptotic versus nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 1997; **22**: 73–83.
41. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, *et al.* More than one way to die: apoptosis and necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999; **18**: 7719–7730.
42. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal M* 2010; **15**: 186–190.
43. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biol Med* 2010; **48**: 749–762.
44. Zhang HX, Yu NC, Huang GF, *et al.* Neuroprotective effects of purslane herb aqueous extracts against d-galactose induced neurotoxicity. *Chem Biol Interact* 2007; **170**: 145–152.
45. Ali SS, Kasoju N, Luthra A, *et al.* Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int* 2008; **41**: 1–15.
46. Liu T, Jin H, Sun QR, *et al.* Neuroprotective effects of emodin in rat cortical neurons against  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *Brain Res* 2010; **1347**: 149–160.
47. Repetto MG, Reides CG, Evelson P, *et al.* Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *Eur J Clin Invest* 1999; **29**: 643–649.
48. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and nervous system, *Trends. Neurosci* 1985; **8**: 22–26.
49. Jiang B, Liu JH, Bao YM, *et al.* Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. *Toxicon* 2004; **43**: 53–59.

50. Ozbek E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. *International Journal of Nephrology* 2012; 2012: 9.
51. Gutteridge JMC, Quinlan GJ. Malondialdehyde formation from lipid peroxides in thiobarbituric acid test. The role of lipid radicals, iron salts and metal chelator. *J Appl Biochem* 1983; **5**: 293–299.
52. Halliwell B. Oxygen radicals: a common sense look at their nature and medical importance. *Med Biol* 1984; **62**:71–77.
53. McCord JM, Keele BB, Fridovich Jr I. An enzyme based theory of obligate anaerobiosis; the physiological functions of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 1976; 1024–1027.
54. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, *J Biochem Mol Toxicol* 2003; **17**: 24–38.
55. Hsouna AB, Saoudi M, Trigui M, *et al.* Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of Ceratonia siliqua leaf extract against CCl<sub>4</sub> induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2011; **49**: 3183–3191.
56. Travacio M, Ilesuy S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Free Radic Res Latin America* 1996; **48**: 9–13.
57. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**: 44–84.
58. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; **18**: 872–879.
59. Bansal AK, Bansal M, Soni G, *et al.* N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chem Biol Interact* 2005; **156**: 101–111.

## Legends to Figures

Figure 1. *In vitro* effect of increasing concentrations of *N*-acetylarginine (0.1  $\mu$ M - 5.0  $\mu$ M) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A) in plasma and on the activities of CAT (B), SOD (C) and GSH-Px (D) in the erythrocytes of rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $P < 0.001$ , compared to the control group (Duncan's multiple range tests). TBA-RS is expressed as nmol of malondialdehyde per mg protein. Enzyme activities are expressed as units per mg protein. One catalase (CAT) unit is defined as 1  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  consumed per minute. One glutathione peroxidase (GSH-Px) unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. One superoxide dismutase (SOD) unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation.

Figure 2. *In vitro* effects of increasing concentrations of *N*-acetylarginine (0.1  $\mu$ M - 5.0  $\mu$ M) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A) and on the activities of CAT (B), SOD (C) and GSH-Px (D) in the kidney (renal cortex and medulla) of rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $P < 0.001$  and \*\* $P < 0.01$ , compared to the control group (Duncan's multiple range tests). TBA-RS is expressed as nmol of malondialdehyde per mg protein. Enzyme activities are expressed as units per mg protein. One catalase (CAT) unit is defined as 1  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  consumed per minute. One glutathione peroxidase (GSH-Px) unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. One superoxide dismutase (SOD) unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation.

Figure 3. *In vitro* effect of increasing concentrations of *N*-acetylarginine (0.1  $\mu$ M - 5.0  $\mu$ M) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A) and on the activities of CAT (B), SOD (C) and GSH-Px (D) in the liver of rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $P < 0.001$  and \* $P < 0.05$ , compared to control group (Duncan's multiple range tests). TBA-RS is expressed as nmol of malondialdehyde per mg protein. Enzyme activities are expressed as units per mg protein. One catalase (CAT) unit is defined as 1  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  consumed per minute. One glutathione peroxidase (GSH-Px) unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. One superoxide dismutase (SOD) unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation.

Figure 4. *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and L-NAME on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A) in the renal cortex; on the activities of CAT (B) in the erythrocytes; CAT (C) and SOD (D) in the renal medulla; CAT (E), SOD (F) and GSH-Px (G) in the liver of 60-day-old rats in the presence or absence of *N*-acetylarginine. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \* $P < 0.05$ , compared to control group and \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control group (Duncan's multiple range tests). TBA-RS is expressed as nmol of malondialdehyde per mg protein. Enzyme activities are expressed as units per mg protein. One catalase (CAT) unit is defined as 1  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  consumed per minute. One glutathione peroxidase (GSH-Px) unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. One superoxide dismutase (SOD) unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation. NAA, *N*-acetylarginine; Tro, trolox; AA, ascorbic acid.

Figure 1

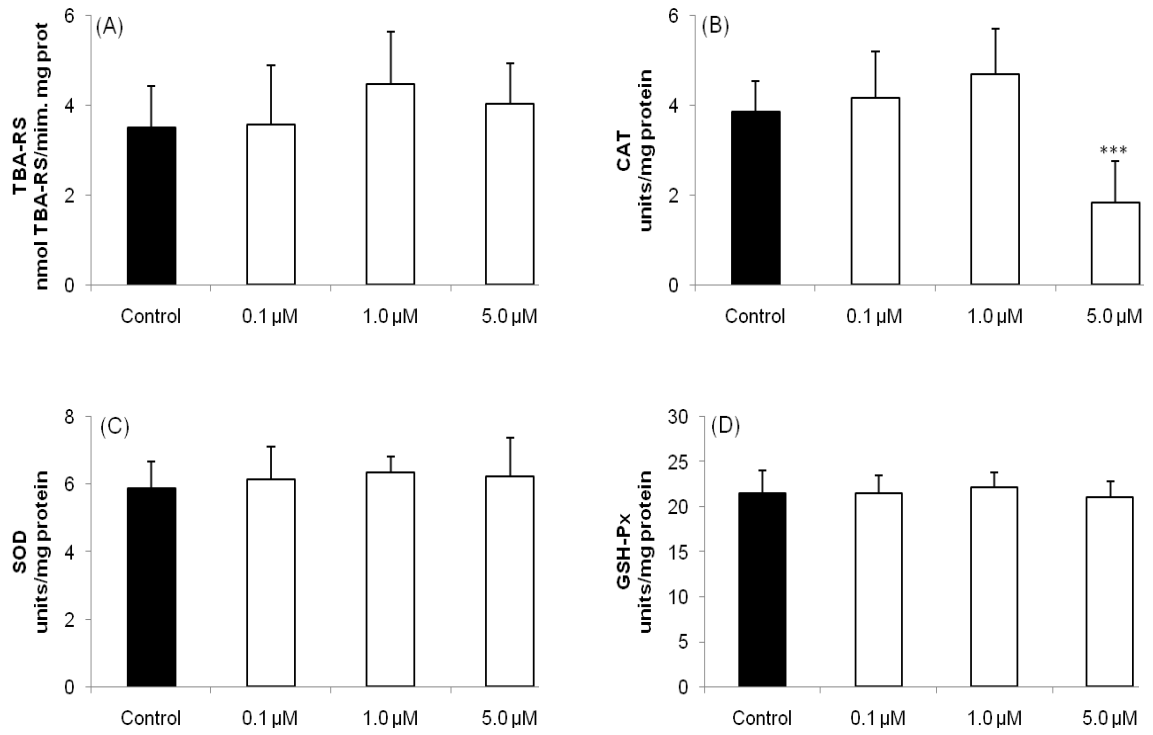
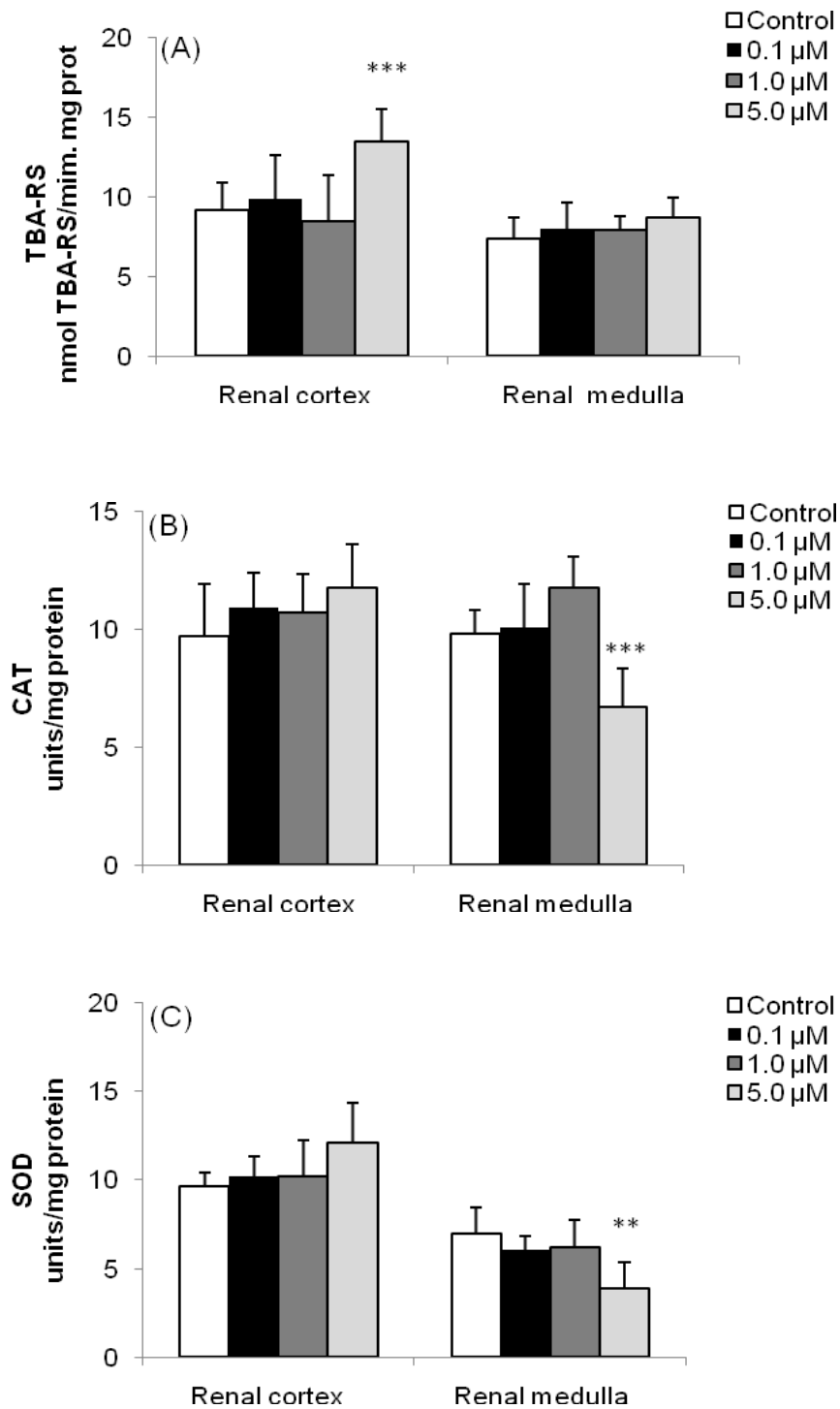


Figure 2



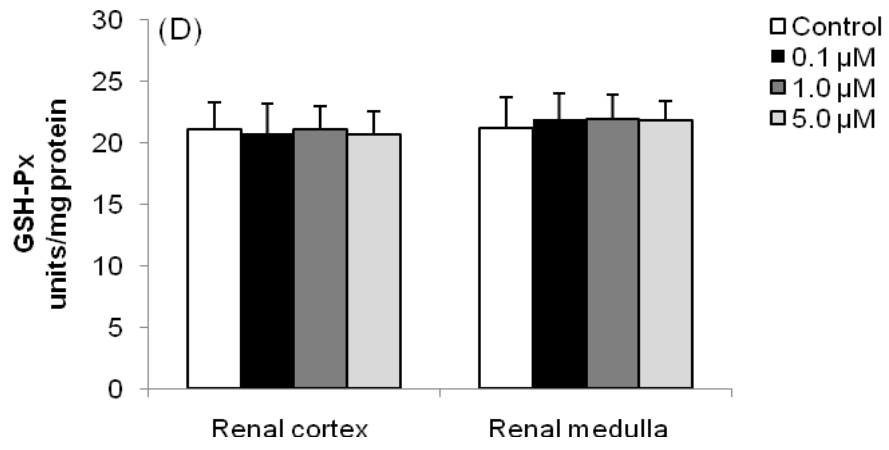


Figure 3

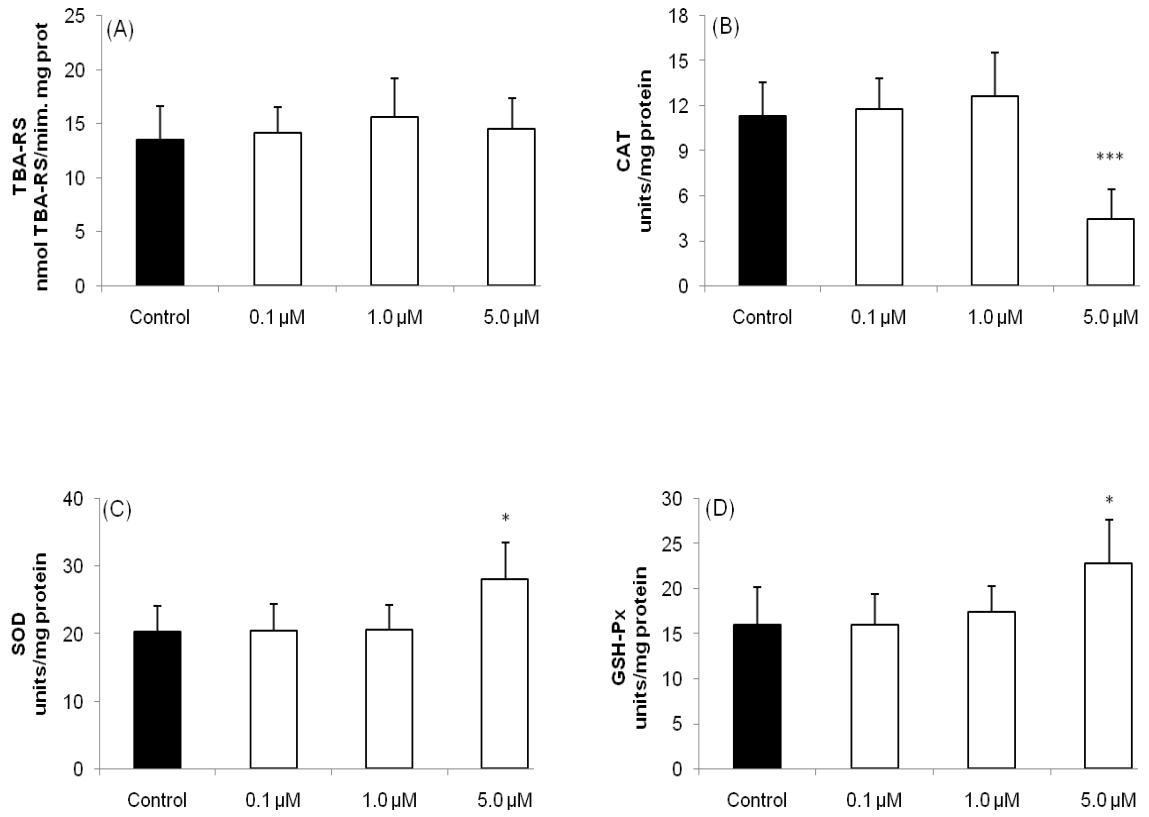
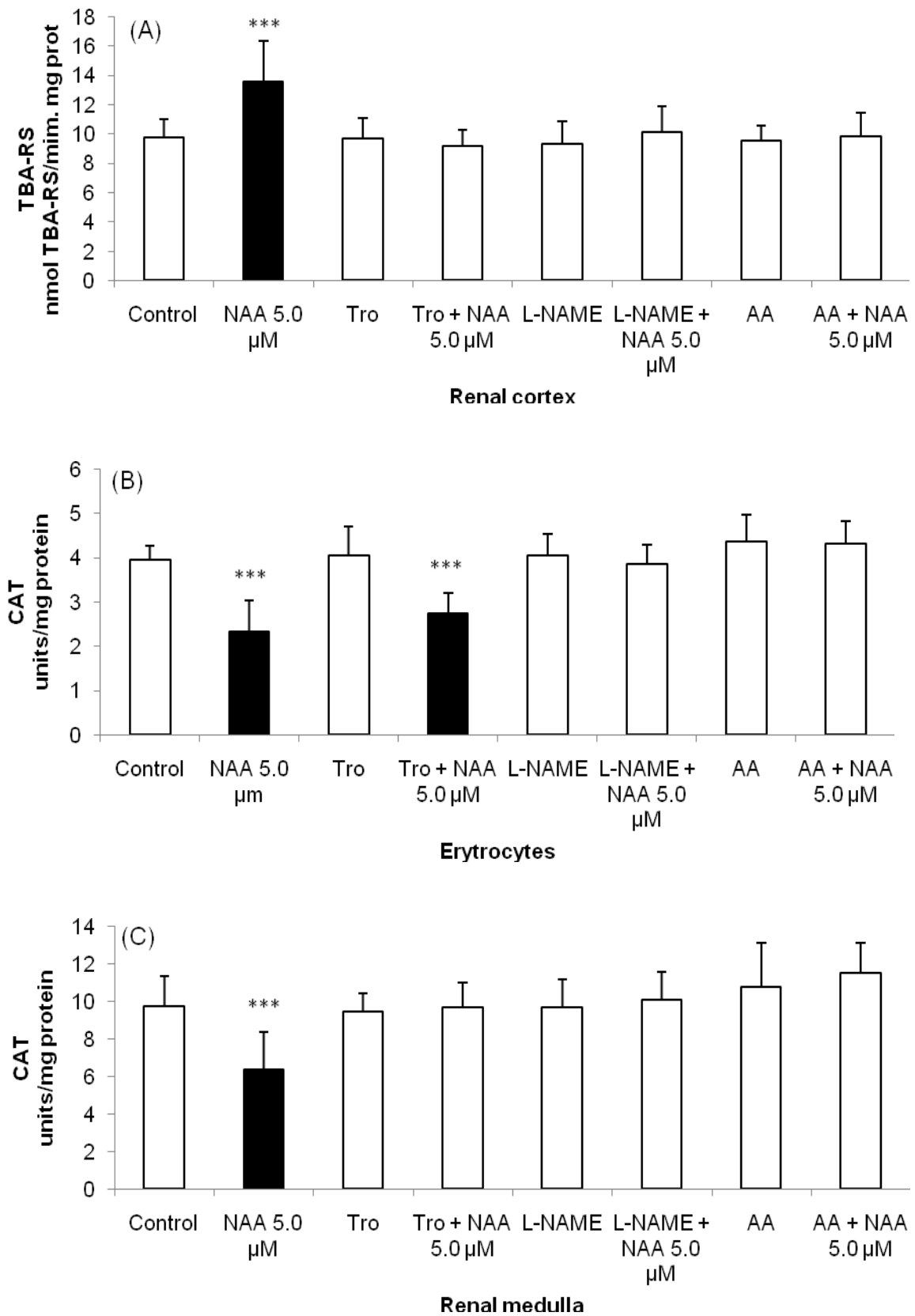
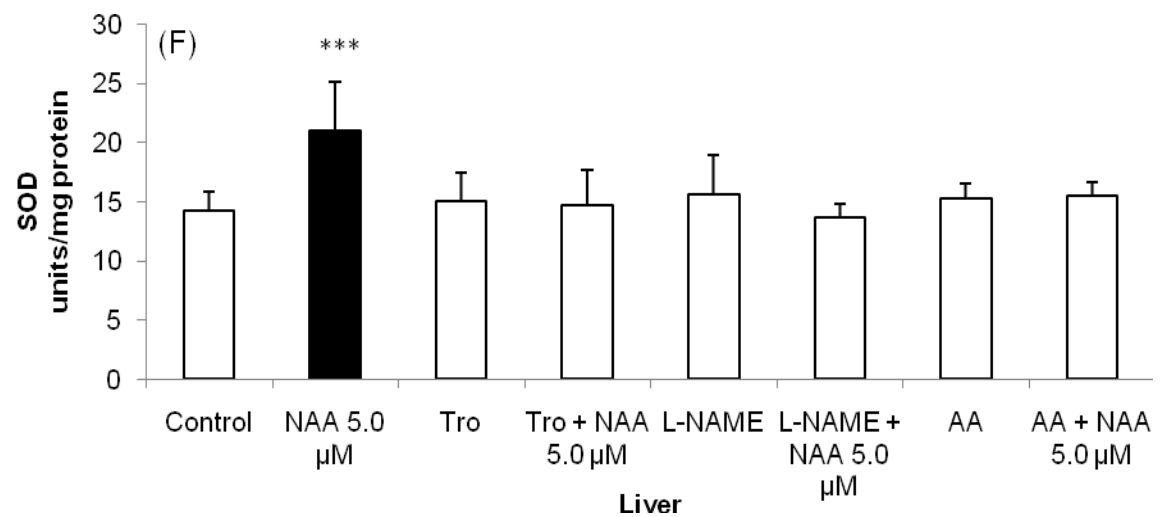
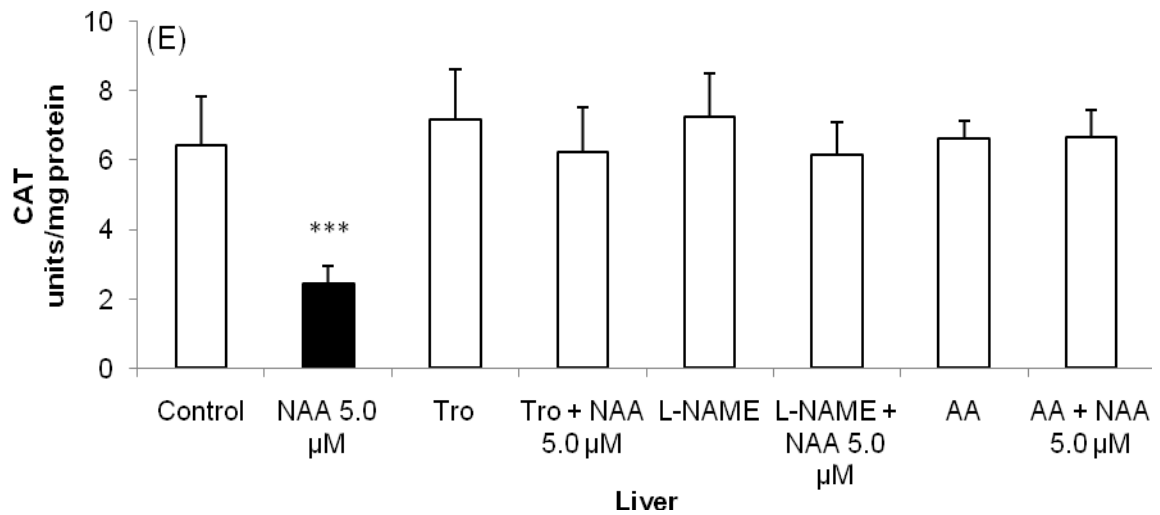
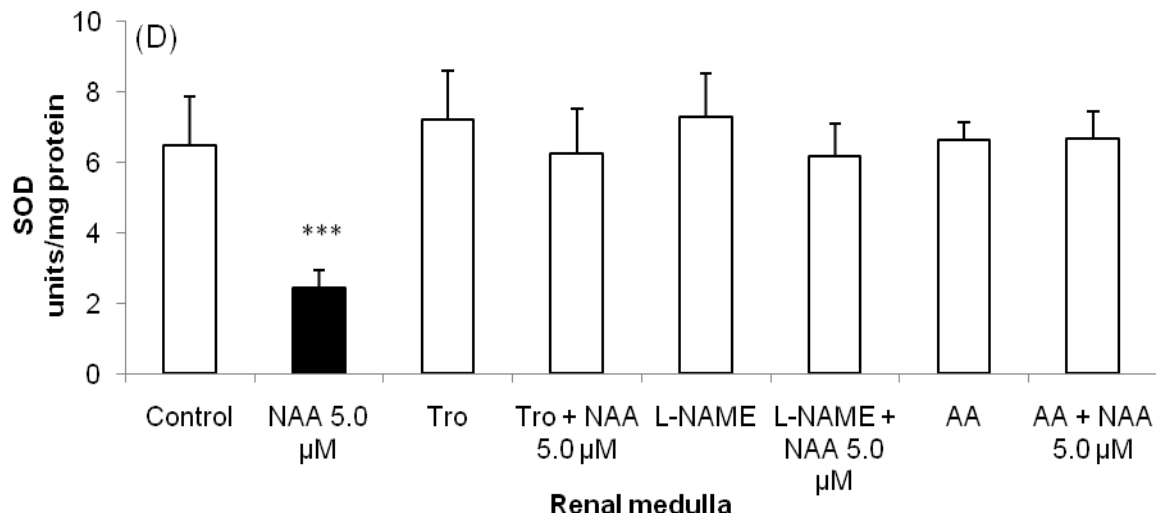
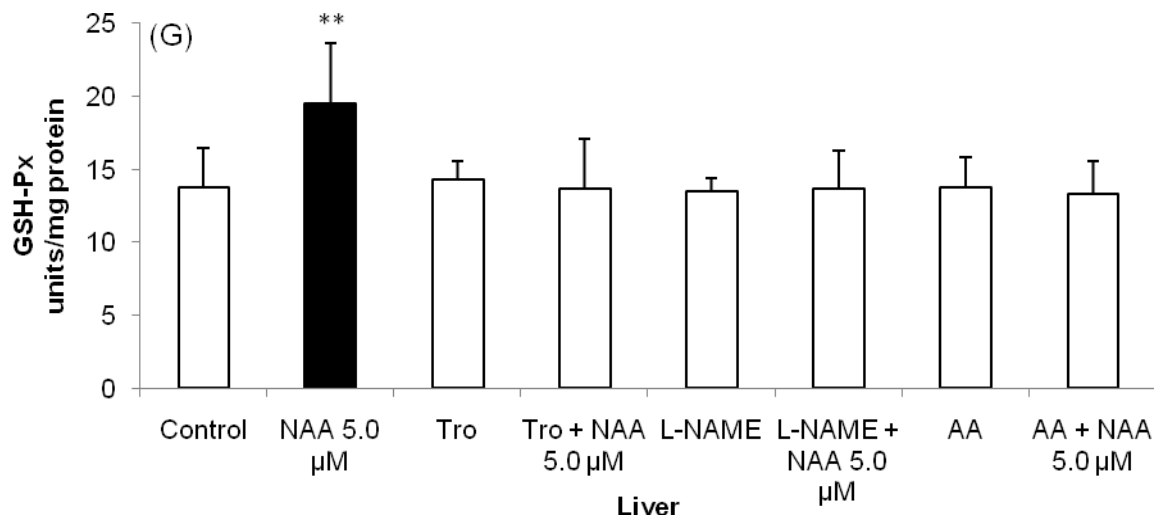




Figure 4







## 5.2 Artigo 2

**Artigo enviado para revista:** Biomedicine & Pharmacotherapy

**Data de envio:** 08 de setembro de 2014.

### **PROTECTIVE ROLE OF VITAMINS and L-NAME IN HOMOARGININE- INDUCED BLOOD AND RENAL OXIDATIVE DAMAGE IN RATS**

**Running title: HOMOARGININE INDUCES OXIDATIVE STRESS**

Simone Sasso<sup>a</sup>, Leticia Dalmedico<sup>b</sup>, Débora Delwing-Dal Magro<sup>c</sup>, Eduardo Manoel Pereira<sup>b</sup>, Angela T.S. Wyse<sup>d</sup>, Daniela Delwing-de Lima<sup>e\*</sup>

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

<sup>c</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.

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo,  
Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>e</sup> Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE,

Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, 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, Brasil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: [daniela.delwing@univille.br](mailto:daniela.delwing@univille.br)

## ABSTRACT

In this study initially evaluated the *in vitro* effects of homoarginine on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the blood, kidney and liver of rats. Results showed that homoarginine at concentrations of 10.0  $\mu\text{M}$  and 20.0  $\mu\text{M}$  decreased total sulfhydryl content and, at concentration of 20.0  $\mu\text{M}$ , enhanced TBA-RS in the plasma of rats, decreased total sulfhydryl content and CAT activity and increased SOD and GSH-Px activities in the renal cortex of rats. Homoarginine also increased TBA-RS and SOD activity in the renal medulla of 60-day-old rats, as compared to the control group. Furthermore, we also verified the influence of the antioxidants, trolox and ascorbic acid, as well as of N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor, on the effects elicited by homoarginine on the parameters tested. Antioxidants and/or L-NAME prevented most alterations caused by homoarginine on the oxidative stress parameters evaluated. Data suggest that homoarginine alters antioxidant defenses, causes damage to proteins and induces lipid peroxidation in the blood and kidney of rats; however, in the presence of antioxidants and L-NAME, most of these alterations in oxidative stress were prevented. Our findings lend support to a potential therapeutic strategy for this condition, which may include the use of appropriate antioxidants for ameliorating the damage caused by homoarginine in Hyperargininemia.

**Keywords:** Homoarginine; oxidative stress, antioxidants; blood, kidney, liver.

## INTRODUCTION

Hyperargininemia is a rare Inborn Error of Metabolism (IEM) that affects the activity of the enzyme, arginase, which is the final enzyme of the urea cycle and catalyzes the conversion of arginine (Arg) to urea and ornithine [1]. It is an autosomal recessive disorder and is characterized by early childhood progressive neurologic impairment with spastic paraplegia, epilepsy, developmental delay, or regression [2,3]. Other uncommon presentations, such as persistent neonatal jaundice with biopsy-proven hepatic cirrhosis, have been reported [4]. In addition, the slight increase in transaminase values and the decrease in prothrombin activity observed in some patients could indicate mild hepatic dysfunction related to hyperargininemia, as suggested by some authors [3–5]. The main biochemical abnormality of hyperargininemia is the increased Arg level in blood and other fluids. The disease is pan-ethnic with an estimated incidence of 1 in 2 million live births [5]. Since hyperargininemia is a very rare disease and only a limited number of patients have been described, the clinical course of hyperargininemia remains poorly characterized [6].

Arg and its metabolites, including guanidine compounds (GC), may act as neurotoxins. GC can produce demyelination with consequent upper motor neuron signals, and can affect GABAergic neurotransmission and decrease the fluidity of the plasma membrane by inhibiting  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -adenosine triphosphatase, resulting in epileptogenic properties. In addition, Arg acts as a substrate for nitric oxide synthase [3,5]. In fact, elevated Arg and GC may also result in neurotoxicity via augmented nitric oxide synthesis, thereby leading to oxidative damage to the brain [7]. Indeed, several GC have been previously shown to be increased in the plasma, cerebrospinal fluid (CSF), as well as brain tissue of hyperargininemic patients [8– 9] and in a mouse model [10]. The increase in these compounds occurs due to the blockage of the arginase reaction, activating secondary biochemical pathways. Thus, Arg is converted to  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -guanidinovaleric acid by transamination, and this compound forms argininic acid by hydrogenation. Arg can also be converted to N-acetylarginine by acetylation and guanidinoacetic acid,  $\beta$ -guanidinopropionic acid or  $\gamma$ -guanidinobutyric acid by transamidation [11,12,8]. Homoarginine can be formed from lysine by guanidination [12].

Oxidative stress is commonly observed in some inborn errors of intermediary metabolism [13,14] and results from an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the cell's ability to mitigate damage through antioxidant pathways or mechanisms that repair or eliminate damaged molecules [15]. Accumulation of intracellular ROS in normal cells contributes to the oxidation of various components, including nucleic acids, proteins, and lipids [16]. Antioxidant mechanisms that can be either enzymatic (including catalases, dismutases and peroxidases) or non-enzymatic (such as vitamin A, C or E) are critical to protect cells against ROS-induced damage both at steady state and upon acute oxidative stress [17].

GC induce oxidative stress in the rat brain, due to increased chemiluminescence and decreased enzymatic and nonenzymatic antioxidant defenses [18]. As such, we investigated the *in vitro* effects of different concentrations of homoarginine (increased in the plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of hyperargininemic patients), on an important parameter of lipoperoxidation, namely TBA-RS, and on an important parameter of protein damage, namely total sulfhydryl content, and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, GSH-Px and SOD) in the blood, kidney and liver of rats. Furthermore, we also tested the influence of the antioxidants,  $\alpha$ -tocopherol (trolox) and ascorbic acid and of N<sup>ϕ</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on the effects elicited by homoarginine, in order to investigate the possible participation of NO and/or its derivatives ONOO<sup>-</sup> and other free radicals on the effects of homoarginine on these parameters.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and reagents**

Sixty-day-old Wistar rats (180-200g), obtained from the Tecpar Company, Curitiba, Brazil, were used in the experiments. The animals from our own breeding stock were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature (22±1°C), with free access to water and commercial protein chow. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all



the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Region Joinville, Joinville, Brazil. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

### ***In vitro studies***

For *in vitro* experiments, untreated sixty-day-old rats were used. Homoarginine was added to the assay at 1.0, 10.0 and 20.0  $\mu\text{M}$  final concentrations. Control experiments were performed without homoarginine addition.

### **Trolox ( $\alpha$ -tocopherol), ascorbic acid and L-NAME administration**

The assays were divided into eight groups: group 1 (control-saline), group 2 (homoarginine), group 3 (control - 1.0 mM trolox), group 4 (homoarginine + 1.0 mM trolox), group 5 (control - 1.0 mM ascorbic acid), group 6 (homoarginine + 1.0 mM ascorbic acid), group 7 (control – 1.0 mM L-NAME), group 8 (homoarginine + 1.0 mM L-NAME). The doses of trolox, ascorbic acid and L-NAME utilized were chosen according to [19–21] respectively.

### **Erythrocyte and plasma preparation**

Erythrocytes and plasma were prepared from whole blood samples obtained from rats. Whole blood was collected and transferred to heparinized tubes for erythrocyte separation. Blood samples were centrifuged at  $1,000 \times g$ , plasma was removed by aspiration and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100  $\mu\text{L}$  of washed erythrocytes and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination of the antioxidant enzyme activities.

For antioxidant enzyme activities determination, erythrocytes were frozen and thawed three times, and centrifuged at  $13,500 \times g$  for 10 min. The supernatant was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein.

### **Tissue preparation**

After decapitation, the liver and kidney were removed, decapsulated and kept in ice-cold buffered sodium phosphate (20 mM, pH 7.4, 140 mM KCl). The renal cortex was carefully separated from renal medulla. The liver, renal cortex and renal medulla were homogenized in 10 volumes (1:10w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses and centrifuged at  $800 \times g$  for 10min at  $4^{\circ}\text{C}$ , to discard nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for assaying the free-radical scavenging enzymes, total sulfhydryl content and for estimation of lipid peroxidation [22].

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

TBA-RS were determined according to the method described by Esterbauer and Cheeseman [23]. TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyl free radicals. For the measurements, plasma and tissues were mixed with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 25 min. TBA-RS was determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS was calculated as nanomole of malondialdehyde formed per milligram of protein.

### **Total Sulphydryl Content**

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery [24], which is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative (TNB), whose absorption is measured spectrophotometrically at 412nm. Briefly, 50 $\mu$ l of homogenate were added to 1ml of PBS buffer pH 7.4 containing 1mM EDTA. The reaction was started by the addition of 30 $\mu$ L of 10mM DTNB and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. Results are reported as nmol TNB/mg protein.

### **Catalase Assay (CAT)**

CAT activity was assayed by the method of Aebi [25]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer at 240 nm for 90 s. One unit of the enzyme is defined as 1  $\mu$ mol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute and specific activity is reported as units per mg protein.

### **Glutathione Peroxidase (GSH-Px)**

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel [26], except for the concentration of NADPH, which was adjusted to 0.1 mM after previous tests performed in our laboratory. Tert-butylhydroperoxide was used as substrate. NADPH disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer at 340 nm for 4 min. One GSH-Px unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute and specific activity is reported as units per mg protein.

### **Superoxide Dismutase (SOD) assay**

This method, used for the assay of SOD activity, is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on O<sub>2</sub>, which is a substrate for SOD [27]. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of

SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm. A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. The results were reported as units/mg protein.

### **Protein determination**

Protein was measured by the Lowry et al. [28] method, using serum bovine albumin as standard.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed by ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, when the F-test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC compatible computer. Values of  $P < 0.05$  were considered to be significant.

## **RESULTS**

*In vitro effects of homoarginine on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the blood of rats.*

Initially verified the *in vitro* effects of different concentrations of homoarginine (1.0, 10.0 and 20.0  $\mu\text{M}$ ) on TBA-RS and on total sulfhydryl content in the plasma and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the erythrocytes of rats. Figure 1 shows that homoarginine at a concentration of 20.0  $\mu\text{M}$  enhanced TBA-RS (A) {40.5%, [F(3,20)=6.407;  $p < 0.01$ ]} and, at concentration of 10.0  $\mu\text{M}$  (39.06%) and 20.0  $\mu\text{M}$  (61.8%), decreased total sulfhydryl content (B) [F(3,20)=40.366;  $p < 0.001$ ] in the plasma of rats. In contrast, homoarginine did not alter CAT (C) [F(3,20)=0.557;  $p > 0.05$ ], SOD (D) [F(3,20)=1.225;  $p > 0.05$ ] or GSH-Px activities (E) [F(3,20)=0.179;  $p > 0.05$ ] in the erythrocytes of 60-day-old rats, as compared to the control group.

*In vitro effects of homoarginine on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the kidney of rats.*

The *in vitro* effects of different concentrations of homoarginine on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the kidney (cortex and medulla) of rats were also verified. As can be observed in Figure 2(B), homoarginine at 20.0  $\mu$ M, significantly decreased total sulfhydryl content {20.17%, [F(3,20)=4.118;  $p < 0.05$ ]} and did not alter TBA-RS (A) [F(3,20)=1.750;  $p > 0.05$ ]. With regard to the antioxidant enzymes, homoarginine at 20.0  $\mu$ M decreased CAT activity (C) {31.7%, [F(3,20)=3.362;  $p < 0.05$ ]} and increased SOD activity (D) {42.0%, [F(3,20)=5.818;  $p < 0.01$ ]} and GSH-Px activity (F) {18.4%, [F(3,20)=18.512;  $p < 0.001$ ]} in the renal cortex of rats. In the renal medulla of rats, homoarginine (20.0  $\mu$ M) increased TBA-RS (A) {36.5%, [F(3,20)=5.165;  $p < 0.01$ ]} and SOD activity (D) {26.8%, [F(3,20)=6.142;  $p < 0.01$ ]}, but did not alter total sulfhydryl content (B) [F(3,20)=0.174;  $p > 0.05$ ] and the activities of CAT (C) [F(3,20)=2.049;  $p > 0.05$ ] and GSH-Px (E) [F(3,20)=0.555;  $p > 0.05$ ], as compared to the control group.

*In vitro effects of homoarginine on TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes in the liver of rats.*

Subsequently, the *in vitro* effects of homoarginine on the same parameters analyzed were also verified in the liver of 60-day-old rats. Figure 3 shows that homoarginine, when added to the incubation medium, did not alter any of the parameters analyzed in the liver of rats, as can be seen in Figure 3 (A) TBA-RS [F(3,20)=0.300;  $p > 0.05$ ], (B) total sulfhydryl content [F(3,20)=0.316;  $p > 0.05$ ], (C) CAT [F(3,20)=0.796;  $p > 0.05$ ], (D) SOD [F(3,20)=0.992;  $p > 0.05$ ] and (E) GSH-Px activities [F(3,20)=0.780;  $p > 0.05$ ], at any of the concentrations tested.

*Influence of trolox, ascorbic acid and L-NAME on the effects elicited by homoarginine in the blood and kidney of rats.*

Finally, we evaluated whether the alterations in TBA-RS, total sulfhydryl content and in the activities of antioxidant enzymes caused by homoarginine administration in the blood and kidney were mediated by NO and/or ONOO<sup>-</sup> and the production of

other free radicals. With this idea in mind, we examined the possible action of the antioxidants trolox and ascorbic acid, as well as L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, on the effects produced by homoarginine on these parameters. *Post hoc* analyses showed that the antioxidants and L-NAME did not alter these parameters *per se*. As can be observed in Figure 4, the antioxidants and L-NAME were able to prevent the increase in TBA-RS (A) [ $F(7,40)= 6.412$ ;  $P<0.001$ ] in the plasma. Furthermore, the antioxidants, but not L-NAME, were able to prevent the increase in TBA-RS (B) [ $F(7,40)=19.185$ ;  $P<0.001$ ] in the renal medulla of rats. With regard to total sulfhydryl content (C), trolox and L-NAME, but not ascorbic acid, were able to prevent the reduction caused by homoarginine (20.0  $\mu\text{M}$ ) [ $F(11,60)= 31.254$ ;  $P<0.001$ ] in the plasma of rats; moreover, the antioxidants and L-NAME were able to prevent the reduction caused by homoarginine in total sulfhydryl content (D) [ $F(7,40)=8.354$ ;  $P<0.001$ ] in the renal cortex of rats.

With regard to the antioxidant enzymes, Figure 5 shows that the antioxidants, but not L-NAME, prevented the reduction in CAT activity (A) [ $F(7,40)=7.165$ ;  $P<0.001$ ] in the renal cortex. The antioxidants and L-NAME also prevented the increase in SOD activity (B) in the renal cortex [ $F(7,40)=12.729$ ;  $P<0.001$ ] and (C) [ $F(7,40)= 11.117$ ;  $P<0.001$ ] in the renal medulla; and the increase in GSH-Px activity (D) [ $F(7,40)= 6.498$ ;  $p<0.001$ ] in the renal cortex of rats.

## DISCUSSION

The production of ROS is one of the most important factors that induce neuronal death. The generation of ROS and free radicals mediates changes in cellular signaling pathways, gene regulation and the oxidative damage of proteins, and lipid peroxidation [29,30]. To prevent the damage caused by ROS, living organisms have developed an antioxidant defense system that includes the presence of non-enzymatic antioxidants and enzymes such as CAT, SOD and GSH-Px [31]. It has been suggested that, in addition to these natural antioxidants, other synthetic or natural ROS scavengers may reduce the incidence of free radical-mediated diseases [31,32].

Different authors demonstrated that, *in vitro*, homoarginine, N-acetylarginine and argininic acid significantly inhibit  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the cerebral cortex of rats and induce oxidative stress, since these compounds increase chemiluminescence and decrease enzymatic and nonenzymatic antioxidant defenses [33,18]. Furthermore, Arg and GC alter cholinesterases activities *in vitro*, probably via free radicals, since antioxidants prevent such effects [34].

Considering that GC induce oxidative stress in the brain of rats [18] and that little is known about the effects of GC in the blood, kidney and liver of rats, in the present study we evaluated the *in vitro* effects of different concentrations of homoarginine (in the range of 1.0  $\mu\text{M}$  - 20.0  $\mu\text{M}$ ) on lipid peroxidation, as measured by TBARS levels; damage to protein, as measured by sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the blood, kidney (renal cortex and renal medulla) and liver of rats. Initially, our results revealed that homoarginine, at a concentration of 20.0  $\mu\text{M}$ , enhanced TBA-RS and at concentrations of 10.0  $\mu\text{M}$  and 20.0  $\mu\text{M}$  decreased total sulfhydryl content in the plasma of rats. In contrast, this metabolite did not alter the activity of antioxidant enzymes in the erythrocytes of 60-day-old rats, as compared to the control group. Our results suggest that, *in vitro*, GC stimulates lipid peroxidation and oxidative damage to proteins in rat blood. TBA-RS is a parameter of lipid oxidation and reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation [35]. Total sulfhydryl content is a parameter that measures the sulfhydryl content of the sample, which is inversely correlated with oxidative damage to the protein. The oxidation of free thiols leads to the formation of disulfide bonds, which correlates with oxidative damage to the protein [24]. In respect to antioxidant enzymes, CAT metabolizes  $\text{H}_2\text{O}_2$ , GSH-Px removes organic hydroperoxides, as well as  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and SOD catalyses the dismutation of the superoxide radical [36].

With regard to experiments carried out in the kidney, in the present study homoarginine (20.0  $\mu\text{M}$ ) significantly decreased total sulfhydryl content, did not alter TBA-RS, decreased CAT activity and increased SOD and GSH-Px activities in the renal cortex of rats, indicating that the GC oxidize proteins and compromise antioxidant enzymatic defenses in this organ. Since SOD activity is enhanced, in turn increasing the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the reduction of CAT activity might occur due to the consumption of the enzyme, in an attempt to prevent oxidative stress. The

increase in GSH-Px activity probably occurred to compensate the reduction in CAT activity. In the renal medulla of rats, homoarginine (20.0  $\mu\text{M}$ ) increased TBA-RS and SOD activity, but did not alter total sulfhydryl content and the activities of CAT and GSH-Px, as compared to the control group. As oxidative stress is defined as the imbalance between free radical production and antioxidant defenses, our results suggest that homoarginine elicits oxidative stress in the kidney of rats. Previous data have shown that antioxidant enzymes may respond to oxidative stress by increasing their activity in order to reduce damage [37]. In addition, the enzymes susceptible to the attachment of free radicals could be variable.

Curiously, our results also showed that *in vitro* administration of homoarginine does not alter TBA-RS, total sulfhydryl content and the activities of the antioxidant enzymes, CAT, SOD and GSH-Px, in the liver of rats, as compared to the control group. It is important to point out that the enzymes investigated in this study seem to have a different response to ROS, depending on the tissue investigated.

Finally, we evaluated whether the alterations in TBA-RS, total sulfhydryl content and in the activities of antioxidant enzymes caused by homoarginine administration in the blood and kidney were mediated by NO and/or ONOO<sup>-</sup> and the production of other free radicals. Nitric oxide is a relatively stable and mildly reactive free radical, reacting mainly with transition metal centers, organic radicals such as tyrosyl and peroxy radicals and most notably with superoxide to yield peroxynitrite, which is extremely cytotoxic [38,39]. Considering this hypothesis, we examined the possible action of the antioxidants,  $\alpha$ -tocopherol (trolox) [which is an excellent trapping agent for lipid peroxy radicals; [40] and ascorbic acid [which traps hydroxyl and superoxide radicals; [41], as well as L-NAME, which is a nitric oxide synthase inhibitor, on the effects produced by homoarginine on these parameters. The analyses showed that the antioxidants and L-NAME did not alter these parameters *per se*. Results revealed that the antioxidants and L-NAME were able to prevent the increase in TBA-RS in the plasma. Furthermore, the antioxidants, but not L-NAME were able to prevent the increase in TBA-RS in the renal medulla of rats. With regard to total sulfhydryl content, trolox and L-NAME, but not ascorbic acid were able to prevent the reduction caused by homoarginine (20.0  $\mu\text{M}$ ) in the plasma of rats; and the antioxidants and L-NAME were able to prevent the reduction, caused by homoarginine, in the total sulfhydryl content in the renal cortex of rats. With regard to



antioxidant enzymes, results showed that the antioxidants, but not L-NAME prevented the reduction in CAT activity in the renal cortex; and that the antioxidants and L-NAME prevented the increase in SOD activity in the renal cortex and in the renal medulla; and the increase of GSH-Px activity in the renal cortex of rats. Therefore, it is feasible that oxidative stress is elicited by reactive oxygen and nitrogen species and is involved in the effects caused by homoarginine on the parameters analyzed.

In conclusion, these findings suggest that homoarginine alters antioxidant defenses and stimulates oxidative damage to both proteins and lipids, promoting oxidative stress in the blood and kidney of rats. In addition, we demonstrate that the presence of antioxidants and L-NAME prevented the alterations in some parameters of oxidative stress caused by the *in vitro* administration of homoarginine. If the oxidative stress elicited by homoarginine in our study also occurs in hyperargininemic patients, it is possible that this, together with other mechanisms, may contribute to the dysfunction characteristic of this disease. Based on the results presented herein, it is proposed that the administration of antioxidants, especially vitamins E and C, should be considered as a potential adjuvant therapeutic strategy for ameliorating the damage caused by homoarginine in hyperargininemia.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from Universidade da Região de Joinville and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC.

## REFERENCES

- [1] Ash DE. Structure and function of arginases. *J. Nutr* 2004; 134: 2765–2767.
- [2] Cederbaum S, Crombez EA. Arginase deficiency: Gene Reviews. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, (Eds.), Seattle, WA: University of Washington; Seattle 2004;1993-2014.
- [3] Crombez EA, Cederbaum SD. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Mol. Genet. Metab* 2005; 84(3): 243–251.
- [4] Braga AC, Vilarinho L, Ferreira E, Rocha H. Hyperargininemia presenting as persistent neonatal jaundice and hepatic cirrhosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24(2): 218–221.
- [5] Scaglia F, Lee B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006; 142C(2):113–120.
- [6] Carvalho DR, Brum JM, Speck-Martins CE, Ventura FD, Navarro MM, Coelho KE, et al. Clinical Features and Neurologic Progression of Hyperargininemia. *Pediatr Neurol* 2012; 46(6):369–374.
- [7] Luiking YC, Engelen MPKJ, Deutz NEP. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13(1): 97–104.
- [8] Mizutani N, Hayakawa C, Ohya Y, Watanabe K, Watanabe Y, Mori A. Guanidino compounds in hyperargininemia. *Tohoku J Exp Med* 1987; 153(3): 197–205.
- [9] Deignan JL, De Deyn PP, Cederbaum SD, Fuchshuber A, Roth B, Gsell W, et al. Guanidino compound levels in blood, cerebrospinal fluid, and post-mortem brain material of patients with argininemia. *Mol Genet Metab* 2010; 100:31–36.
- [10] Deignan JL, Marescau B, Livesay JC, Iyer RK, De Deyn PP, Cederbaum SD, et al. Increased plasma and tissue guanidino compounds in a mouse model of hyperargininemia. *Mol Genet Metab* 2008; 93(2):172–178.
- [11] De Deyn PP, Marescau B, Qureshi IA. Hyperargininemia: a treatable inborn error of metabolism? In: De Deyn PP, Marescau B, Qureshi IA. (Eds.) *Guanidino Compounds in Biology and Medicine*. London, UK: John Libbey & Company Ltd 1997; 2(8):53-69.
- [12] Marescau B, De Deyn PP, Lowenthal A, Qureshi IA, Antonozzi I, Backmann C, et al. Guanidino compound analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: follow-up of guanidino compound levels during therapy. *Pediatr Res* 1990; 27(3): 297–303.
- [13] Colome C, Sierra C, Vilaseca MA. Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Méd Clin* 2000; 115:111–117.

- [14] Wajner M, Latini A, Wyse ATS, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27:427–448.
- [15] Du C, Anderson A, Lortie M, Parsons R, Bodnar A. Oxidative damage and cellular defense mechanisms in sea urchin models of aging. *Free Radic Biol Med* 2013; 63(2):254–263.
- [16] Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc I, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 2010; 44(10): 1098–124.
- [17] Oakley FD, Abbott D, Li Q, Engelhardt JF. Signaling components of redox active endosomes: The redoxosomes. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(6):1313–33.
- [18] Wyse ATS, Bavaresco CS, Hagen MEK, Delwing D, Dutra-filho CS, Wajner M. In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidine compounds accumulating in hyperargininemia. *Brain Res* 2001; 923:50–57.
- [19] Wyse ATS, Zugno AI, Streck EL, Matté C, Calcagnotto T, Wannmacher CMD, et al. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 2002; 27:1685-1689.
- [20] Silva CG, Bueno ARF, Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Rosa RB, et al. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Neurochem Int* 2004; 44(1):45-52.
- [21] Qi B, Yamagami T, Naruse Y, Sokejima S, Kagamimori S. Effect of taurine on depletion of erythrocyte membrane Na-K ATPase activity due to ozone exposure or cholesterol enrichment. *J Nutr Sci Vitaminol* 1995; 41(6):627–634.
- [22] Ferreira AGK, Cunha AA, Machado FR, Pederzolli CD, Dalazen GR, Assis AM, et al. Experimental Hyperprolinemia Induces Mild Oxidative Stress, Metabolic Changes, and Tissue Adaptation in Rat Liver. *J Cel Biochem* 2012; 113(1):174–183.
- [23] Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186:407–421.
- [24] Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 302:141–145.
- [25] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; 105:121–126.
- [26] Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77:325–332.

- [27] Marklund SL. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (Eds.) Handbook for oxygen radical research. CRC press, Boca Raton 1985; 243–247.
- [28] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Oliver H, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265–267.
- [29] Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2000; 13(3):129–142.
- [30] Shrilatha B, Muralidhara DR. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the streptozotocin-diabetic rat. *Int J Androl* 2007; 30(6):508–518.
- [31] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44–84.
- [32] Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18(10):872–879.
- [33] Silva CG, Parolo E, Streck EL, Wajner M, Wannmacher CMD, Wyse ATS. In vitro inhibition of Na<sup>+</sup>,K-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hiperargininemia. *Brain Res* 1999; 838(1-2):78–84.
- [34] Delwing-de Lima D, Wollinger LP, Casagrande ACM, Delwing F, da Cruz JG, Wyse AT, et al. Guanidino compounds inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities: Effect neuroprotector of vitamins E plus C. *Int J Dev Neurosci* 2010; 28(6): 465–473.
- [35] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142(2):231–255.
- [36] Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 1985; 8(6): 22–26.
- [37] Travacio M, Llesuy S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Ciênc cult* 1996; 48(1-2): 9–13.
- [38] Lipton SA, Choy YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364(6438): 626–632.
- [39] Romero N, Denicola A, Radi R. Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite. *IUBMB life* 2006; 58(10): 572–80.
- [40] Burton GW, Wronska U, Stone L, Foster DO, Ingold KU. Biokinetics of dietary RRR- $\alpha$ -tocopherol in the male guinea-pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. *Lipids* 1990; 25(4):199–210.

- [41] Halliwell B, Gutteridge JMC. Hydrogen peroxide. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (Eds.) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford 1999; 82–83.

### Legends to Figures

Figure 1. *In vitro* effect of increasing concentrations of homoarginine (1.0  $\mu$ M - 20.0  $\mu$ M) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A) and total sulfhydryl content (B) in plasma and on the activities of CAT (C), SOD (D) and GSH-Px (E) in the erythrocytes of rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\*P<0.001 and \*\*P<0.01, compared to control group (Duncan's multiple range tests).

Figure 2. *In vitro* effect of increasing concentrations of homoarginine (1.0  $\mu$ M - 20.0  $\mu$ M) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A), total sulfhydryl content (B) and on the activities of CAT (C), SOD (D) and GSH-Px (E) in the kidney (renal cortex and medulla) of rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01 and \*P<0.05, compared to control group (Duncan's multiple range tests).

Figure 3. *In vitro* effect of increasing concentrations of homoarginine (1.0  $\mu$ M - 20.0  $\mu$ M) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A), total sulfhydryl content (B) and on the activities of CAT (C), SOD (D) and GSH-Px (E) in the liver of rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate.

Figure 4. *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and L-NAME on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in the plasma (A) in the renal medulla (B), and on total

sulfhydryl content in the plasma (C) and in the renal cortex (D) of 60-day-old rats in the presence or absence of homoarginine. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control group (Duncan's multiple range tests). HA, homoarginine; Tro, trolox; AA, ascorbic acid.

Figure 5. *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and L-NAME on the activities of CAT (A) in the renal cortex, SOD in the renal cortex (B) and in the renal medulla (C); and on GSH-Px (D) in the renal cortex of 60-day-old rats in the presence or absence of homoarginine. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control group (Duncan's multiple range tests). HA, homoarginine; Tro, trolox; AA, ascorbic acid.

Figure 1

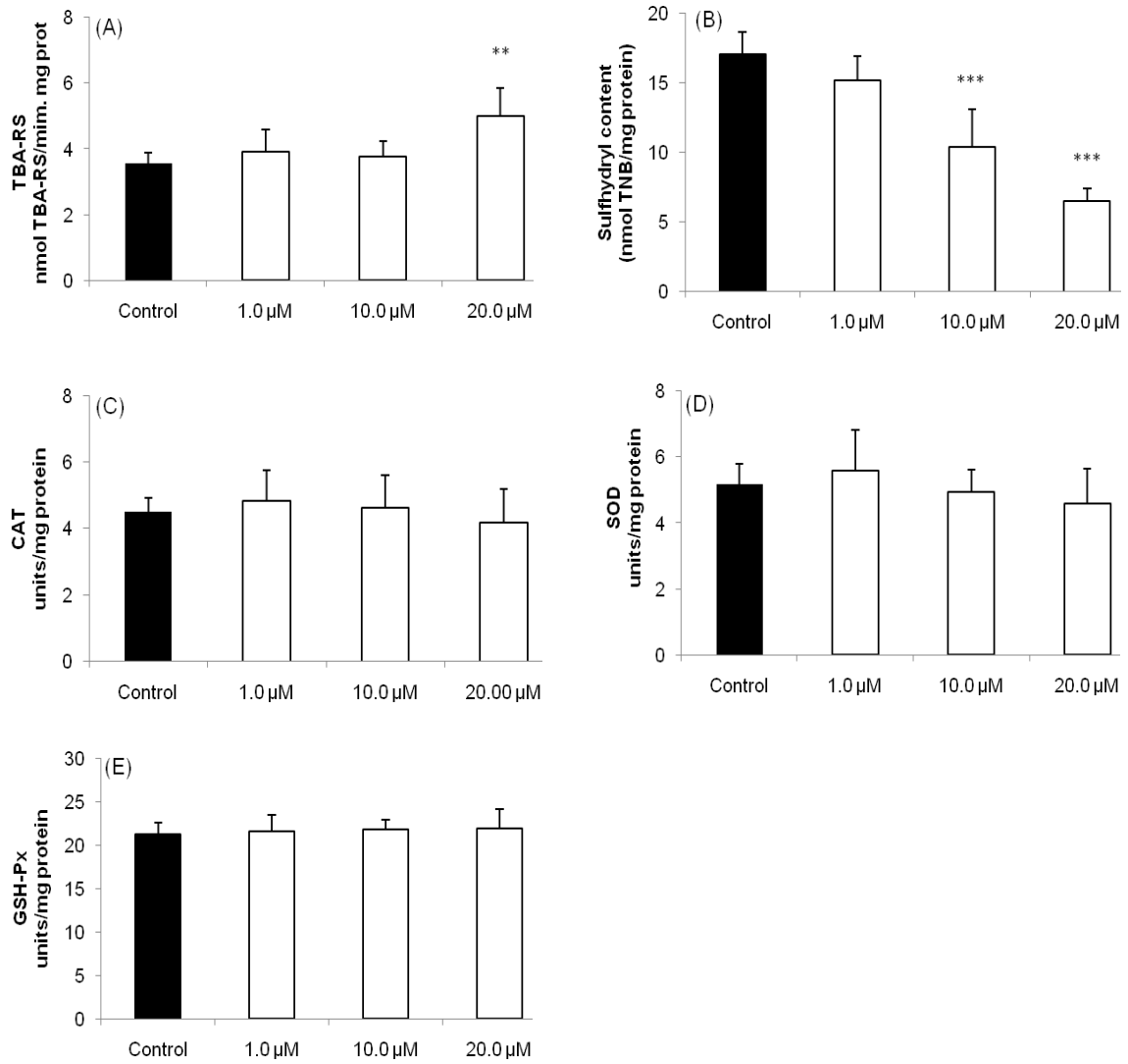
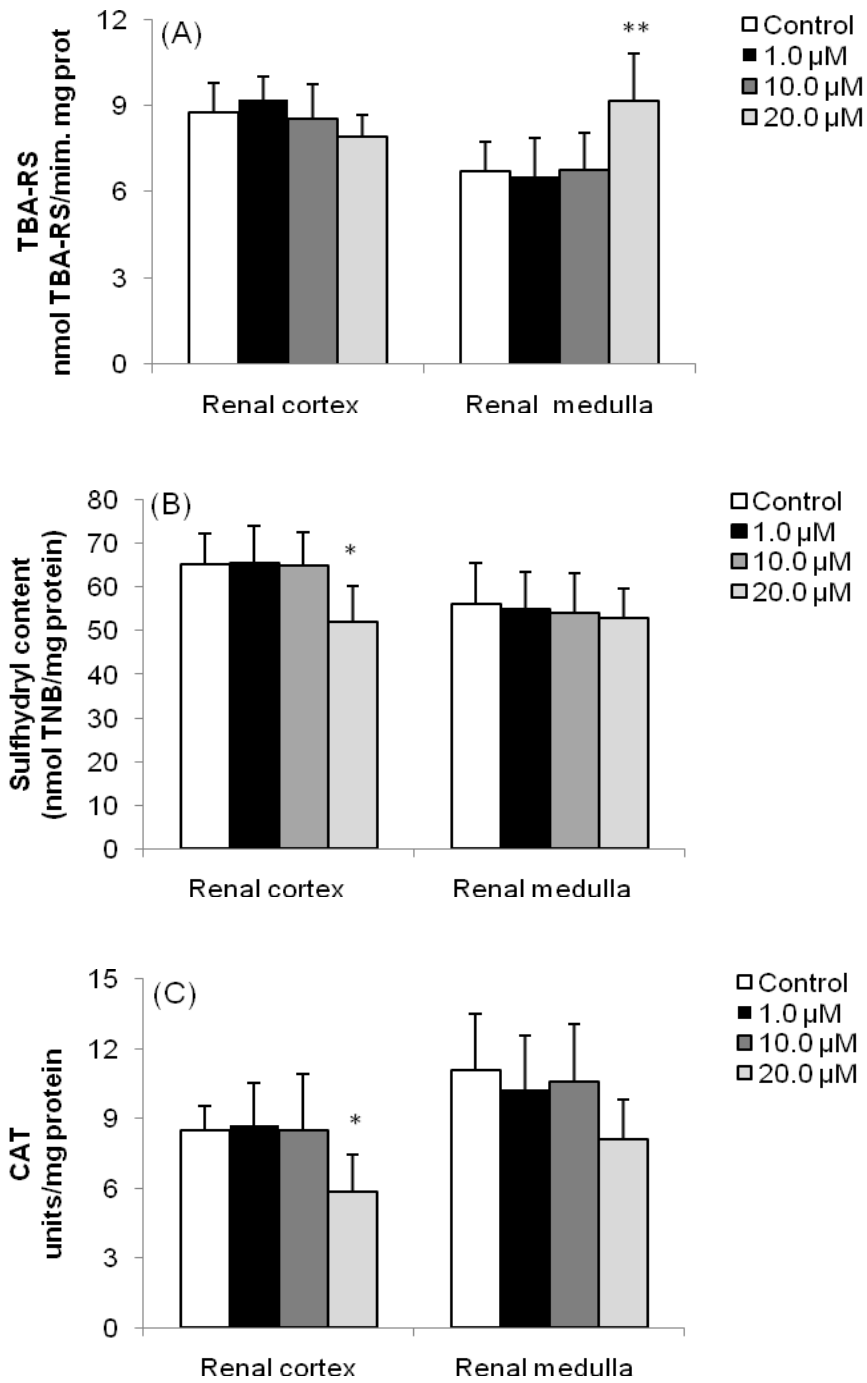




Figure 2



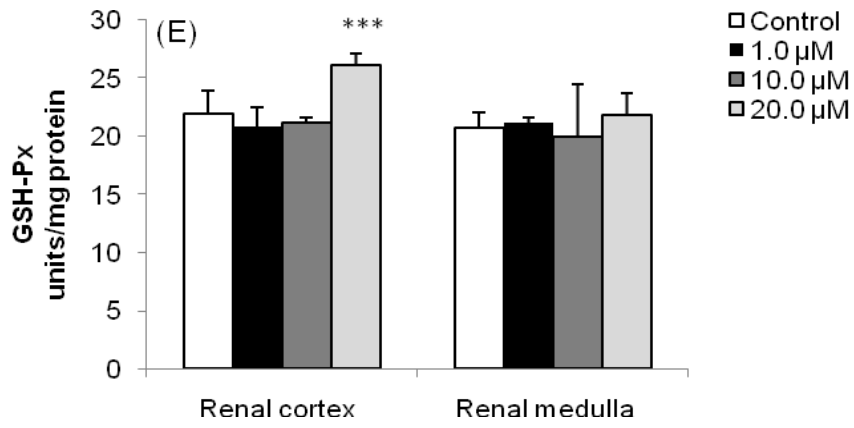
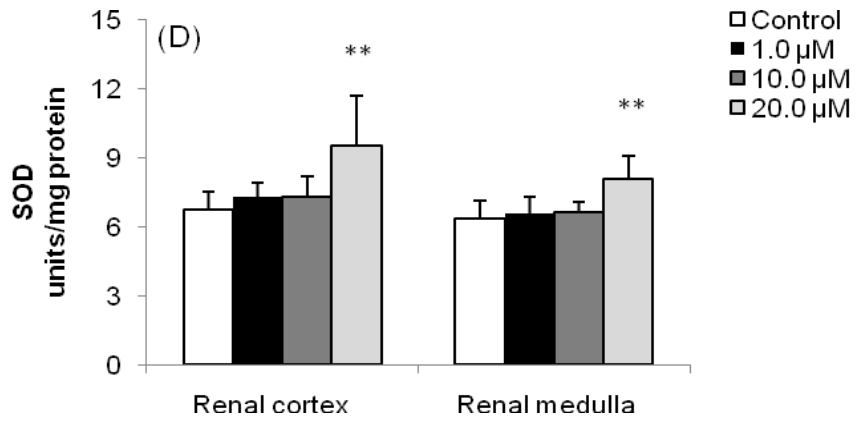


Figure 3

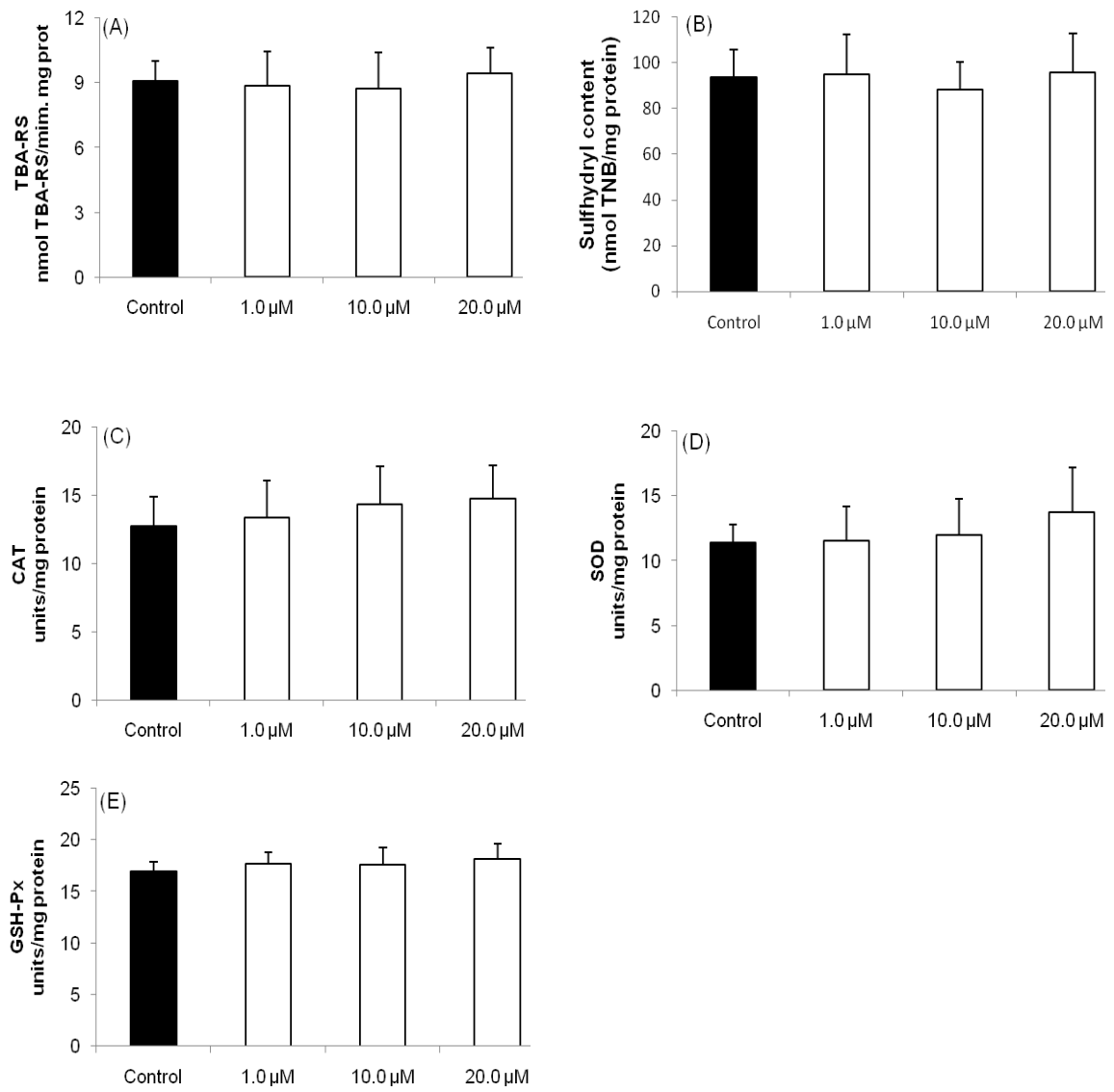
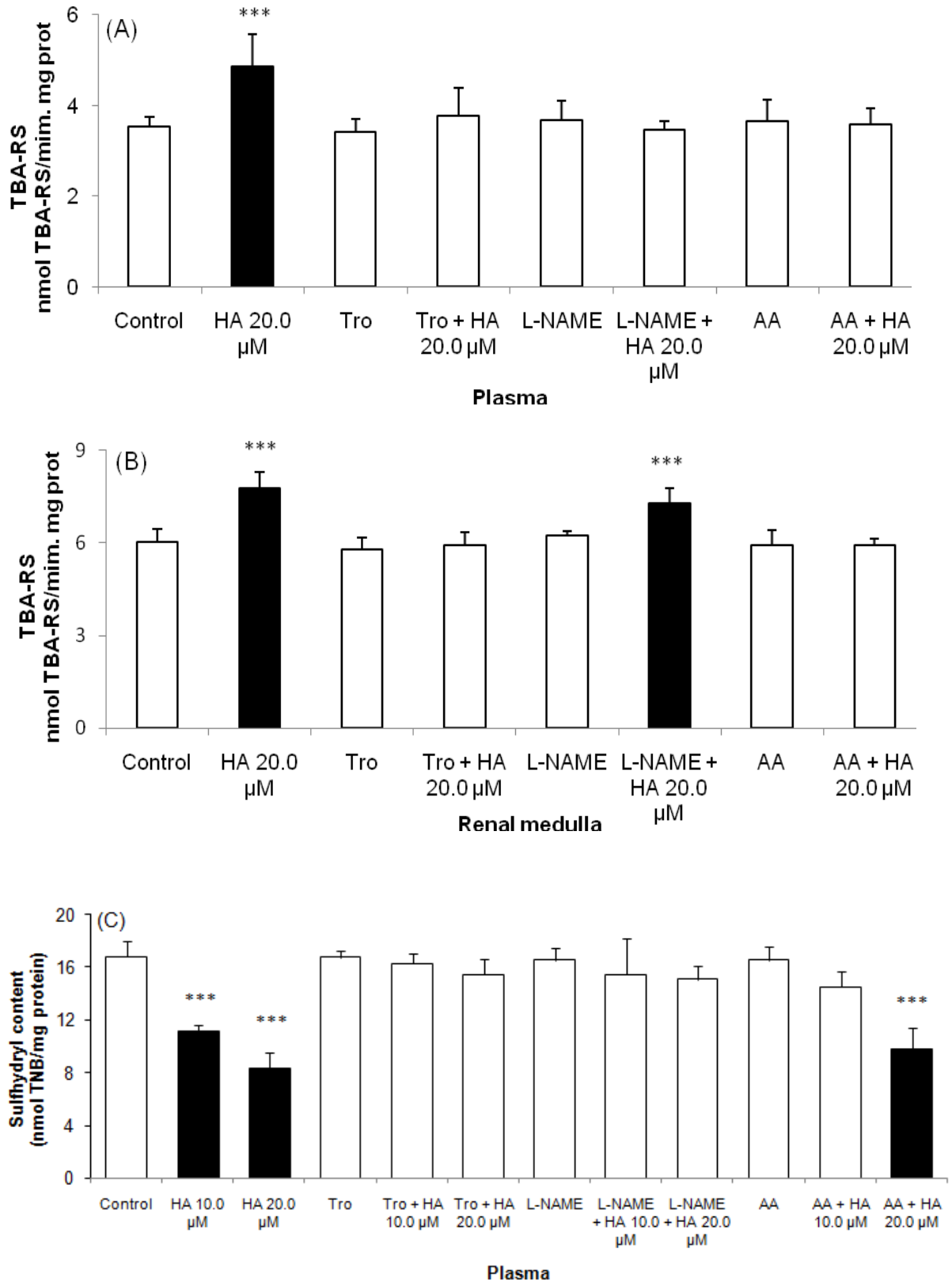


Figure 4



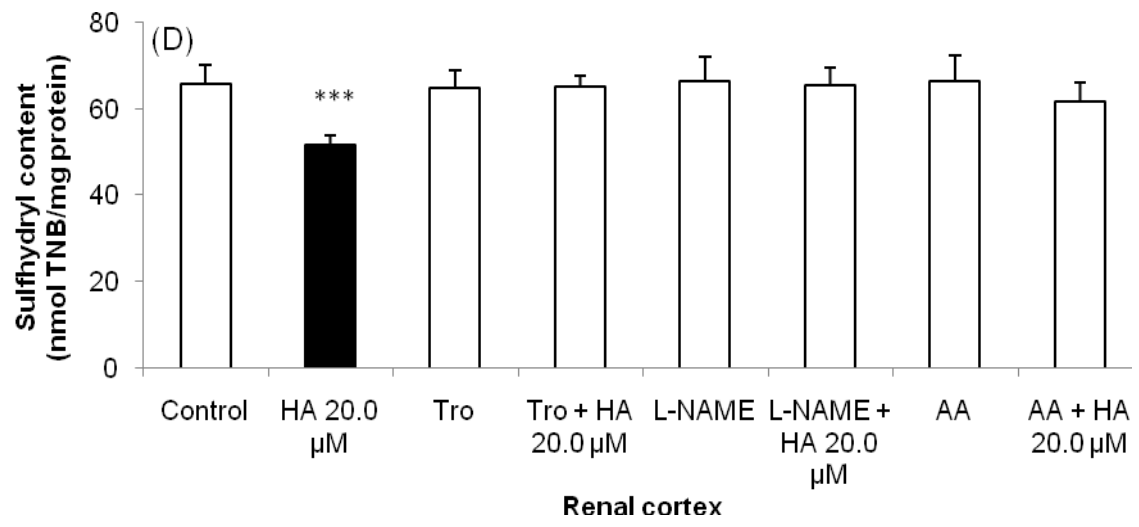
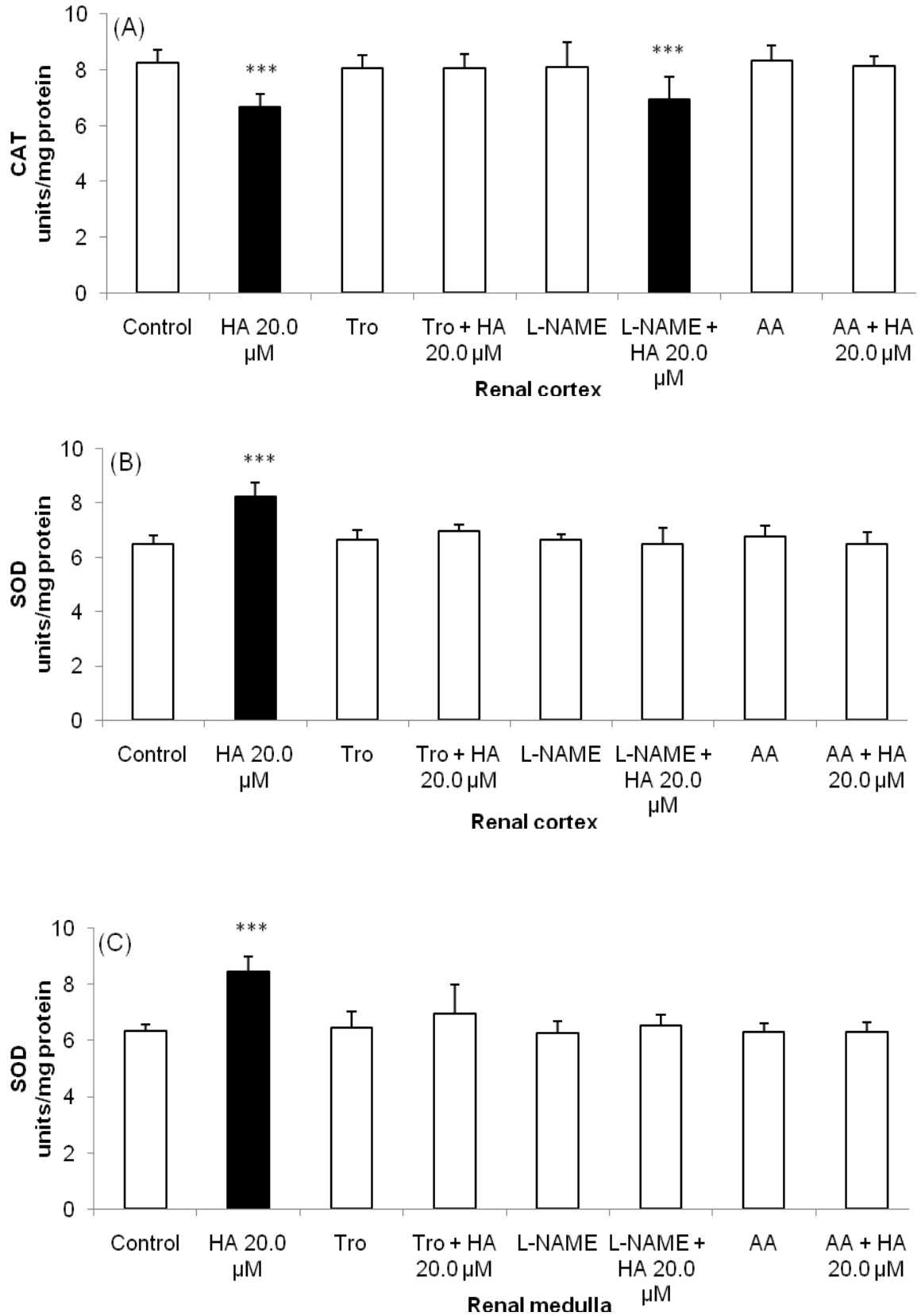
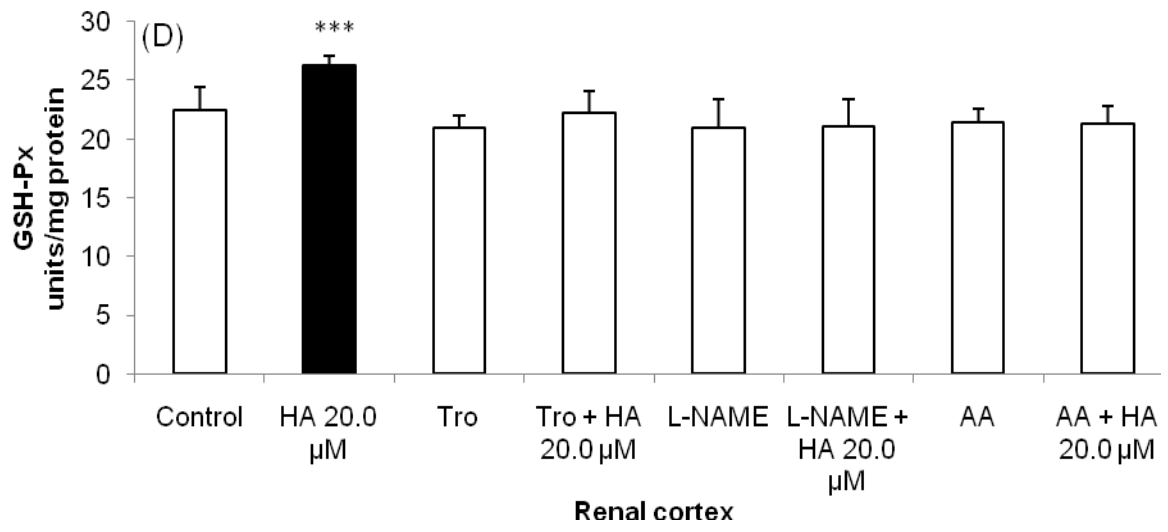


Figure 5





## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que os pacientes hiperargininêmicos apresentam níveis elevados dos compostos guanidínicos N- $\alpha$ -acetilarginina, ácido argínico e homoarginina no plasma e no fluido cérebro espinhal (HALLIWELL, 1996); que além dos compostos guanidínicos, também foi sugerido que o óxido nítrico poderia ter um papel na fisiopatologia da doença (MORI *et al.* 1998), uma vez que o excesso de arginina presente na hiperargininemia poderia servir de substrato para a síntese de óxido nítrico; que a arginina induziu o estresse oxidativo cerebral e sanguíneo (WYSE *et al.* 2001a; DELWING *et al.* 2002; DELWING *et al.* 2008; DE LIMA *et al.* 2012); e que os compostos guanidínicos induziram o estresse oxidativo cerebral (WYSE *et al.* 2001b); nesse estudo investigamos os efeitos *in vitro* dos compostos guanidínicos (N- $\alpha$ -acetilarginina e homoarginina) e a influência dos antioxidantes trolox ( $\alpha$ -tocoferol) e ácido ascórbico e do L-NAME sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em sangue, rim e fígado de ratos de 60 dias de idade.

Nossos resultados mostraram que o composto guanidínico N- $\alpha$ -acetilarginina na concentração de 5 $\mu$ M diminuiu a atividade da CAT em eritrócitos, aumentou os níveis de TBA-RS em córtex renal, diminuiu a atividade da CAT e da SOD em medula renal, diminuiu a atividade da CAT em fígado e aumentou a atividade da SOD e da GSH-Px em fígado de ratos de 60 dias de idade, quando comparado aos grupos controle.

Quanto a prevenção com antioxidantes e L-NAME dos efeitos causados pelo composto guanidínico N- $\alpha$ -acetilarginina sobre os parâmetros de estresse oxidativo estudados os resultados mostraram que o ácido ascórbico e o L-NAME preveniram a diminuição da atividade da CAT em eritrócitos, porém o trolox não foi capaz de prevenir essa alteração. Os antioxidantes e o L-NAME preveniram o aumento dos níveis de TBA-RS em córtex renal; a diminuição da atividade da CAT e da SOD em medula renal, a diminuição da atividade da CAT em fígado e o aumento da atividade da SOD e da GSH-Px em fígado de ratos.

O composto guanidínico homoarginina na concentração de 10.0 $\mu$ M diminuiu o conteúdo total de sulfidrilas em plasma e na concentração de 20.0 $\mu$ M diminuiu o conteúdo total de sulfidrilas e aumentou os níveis de TBA-RS em plasma, diminuiu o conteúdo total de sulfidrilas e a atividade da CAT em córtex renal, aumentou a



atividade da SOD e da GSH-Px em córtex renal e aumentou os níveis de TBA-RS e a atividade da SOD em medula renal de ratos de 60 dias de idade, quando comparado aos grupos controle.

Com relação a prevenção com trolox, ácido ascórbico e L-NAME das alterações causadas pelo composto guanidínico homoarginina os resultados mostraram que os antioxidantes e o L-NAME preveniram a diminuição do conteúdo total de sulfidrilas causada pela homoarginina na concentração de 10  $\mu\text{M}$  em plasma de ratos. Considerando os efeitos causados pela homoarginina na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , os resultados mostraram que o trolox e o L-NAME preveniram a diminuição do conteúdo total de sulfidrilas em plasma, porém o ácido ascórbico não preveniu esta alteração; os antioxidantes e o L-NAME preveniram o aumento dos níveis de TBA-RS em plasma, a diminuição do conteúdo total de sulfidrilas em córtex renal, o aumento da atividade da SOD e da GSH-PX em córtex renal e o aumento da atividade da SOD em medula renal. Os antioxidantes também preveniram a diminuição na atividade da CAT em córtex renal e o aumento dos níveis de TBA-RS em medula renal, porém o L-NAME não foi capaz de prevenir a alteração da CAT e nos níveis de TBA-RS nestas estruturas.

Os resultados indicam que os compostos guanidínicos N- $\alpha$ -acetilarginina e homoarginina induzem o estresse oxidativo em sangue, rim e fígado de ratos, pois alteram as defesas antioxidantes, causam peroxidação lipídica e dano às proteínas. Além disso, a presença de antioxidantes e do L-NAME, preveniram a maioria das alterações causadas pela administração *in vitro* da N- $\alpha$ -acetilarginina e da homoarginina.

Os resultados deste trabalho poderão contribuir para melhor entendimento dos sintomas observados nos pacientes hiperargininêmicos. Mesmo que seja difícil extrapolar nossos achados para humanos, poderíamos sugerir que o uso de antioxidantes deve ser considerado como uma estratégia terapêutica no tratamento da Hiperargininemia.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 302, p. 141-145, 2001.

ALIEV, G.; OBRENOVICH, M. E.; TABREZ, S.; JABIR, N. R.; REDDY, V. P.; LI, Y.; BURNSTOCK, G.; CACABELOS, R.; KAMAL, M. A. Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric Oxide-Dependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2013, Article ID 962984, 19 pages, 2013.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-40, 2007.

ARAUJO, A. P. Q. C. Psychiatric features of metabolic disorders. **Rev. Psiq. Clin.**, v. 31, n. 6, p. 285-9, 2004.

AVILEZ, I. M.; HORI, T. S. F.; ALMEIDA, L. C.; HACKBARTH, A.; BASTOS NETO, J. C.; BASTOS, V. L. F. C.; MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology Part C**, v. 148, n. 2, p. 136-142, 2008.

ASH, D. E.; SCOLNICK, L. R.; KANYO, Z. F.; VOCKLEY, J. G.; CEDERBAUM, S. D.; CHRISTIASON, D. W. Molecular basis of hyperargininemia: structure-function consequences of mutations in human liver arginase. **Mol. Genet. Metab.**, v. 64, n. 4, p. 243-249, 1998.

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**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROS, C. M.; BOCK, P. M. **Vitamina C na prevenção do envelhecimento cutâneo**. Disponível em <<http://www.crn2.org.br/pdf/artigos1277237393.pdf>> Acesso em: 15 de abril 2014. 2009.

BARROS, A.; NUMES, F. M.; GONÇALVES, B.; BENNETT, R. N.; SILVA, A. P. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*castanea sativa* Mill.) **Food Chemistry**. v. 128, n. 1, p. 165-72, 2011.

BATLOUNI, M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes Na Doença Arterial Coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 68, n. 1, p. 55-63, 1997.

BECKMAN, J. S.; CARSON, M.; SMITH, C. D.; KOPPENOL, W. H. ALS, SOD and peroxynitrite. **Nature**, v. 364, n. 6438, p. 584-584, 1993.

BECKMAN, J. S. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: LANCASTER, J. ed. **Nitric oxide: Principles and actions**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 1-83.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.**, v. 65, p. 1865-1874, 1999.

BERLINER, J. A.; HEINECKE, J. W. **Free Radical Biol. Med.** v. 20, p. 707-727, 1996.

BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. **Enzyme**, v. 38, n. 1-4, p. 14-26, 1987.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. **Treat. Endocrinol**, v. 3, n. 1, p. 41-52, 2004.

BRUSILOW, S. W.; HORWICH, A. L. Urea cycle enzymes. In SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. Eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 621-663.

BRUSILOW, S. W.; HORWICH, A. L. Urea cycle enzymes. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. Eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1909-1963.

BUTTERFIELD, D. A.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation processes in aging brain. **Adv. Cell. Aging Gerontol**, v. 2, p. 161-19, 1997.

CANTIN, A. M. Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 10, n. 6, p. 531-536, 2004.

CARR, A.; FREI, B. Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB J.**, v. 13, n. 9, p. 1007-1024, 1999.

CEDERBAUM, S. D.; SHAW, K. N. F.; VALENTE, M. Hyperargininemia. **J. Pediatr.**, v. 90, p. 569-573, 1977.

CEDERBAUM, S. D.; SHAW, K. N.; SPECTOR, E. B.; VERITY, M. A.; SNODGRASS, P. J.; SUGARMAN, G.I. Hyperargininemia with arginase deficiency. **Pediatr. Res.**, v. 13, n. 7, p. 827-33, 1979.

CEDERBAUM, S. D.; YU, H.; GRODY, W. W.; KERN, R. M.; YOO, P.; IYER, R. K. Arginases I and II: do their functions overlap? **Mol. Genet. Metab.**, v. 81, n. 1, p. 38-44, 2004.

CEDERBAUM, S.; CROMBEZ, E. A. Arginase Deficiency. In: PAGON, R. A.; ADAM, M.P.; ARDINGER, H.H. **Gene Reviews**. University of Washington, Seattle, p. 1993-2014, 2010.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A. A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 140, n. 3-4, p. 422-426, 2005.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

COLOMBO, J. P. **Argininemia: clinical and biochemical aspects**. In: De DEYN, P. P.; MARESCAU, B.; SATLON, V.; QUERSHI, I. A. eds. Guanidino Compounds in Biology & Medicine, John Libbery & Company Ltd., p. 343-348, 1992.

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

COMBS, J. R. G. **The Vitamins**. 4<sup>a</sup> ed. San Diego: Print Book, Academic Press; 2012.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 420, n. 6917, p. 860-7, 2002.

CROMBEZ, E. A.; CEDERBAUM, S. D. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. **Mol. Genet. Metab.**, v. 84, n. 3, p. 243-51, 2005.

DALVI, S. M.; PATIL, V. W.; RAMRAJE, N. N.; PHADTARE, J. M.; GUJARATHI, S. U. Nitric oxide, carbonyl protein, lipid peroxidation and correlation between antioxidant vitamins in different categories of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. **Malays J. Med. Sci.**, v. 20, n. 1, p. 21-30, 2013.

DAMODARAN, S. **Química de alimentos de Fennema**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

DARR, D.; COMBS, S.; PINNELL, S. Ascorbic acid and collagen synthesis: rethinking a role for lipid peroxidation. **Arch Biochem Biophys**. v. 307, n. 2, p. 331-5, 1993.

DE DEYN, P. P.; MARESCAU B.; QURESHI I. A Hyperargininemia: a treatable inborn error of metabolism? In: DE DEYN, P. P.; MARESCAU, B.; QURESHI I. A. (Eds.) **Guanidino Compounds in Biology and Medicine**. London, UK: John Libbey & Company Ltd., v. 2, n. 8, p. 53-69, 1997.

DE LIMA, D. D.; DELWING, F.; DA CRUZ, J. G.; WYSE, A. T.; DELWING-DAL MAGRO, D. Protective effect of antioxidants on blood oxidative stress caused by arginine **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 26, p. 250-258, 2012.

DELWING, D.; DELWING, D.; WANNAMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C. S.; WYSE, A. T. S. Arginine administration reduces catalase activity in midbrain of rats. **Neuro Report.**, v. 13, p. 1301-1304, 2002.

DELWING, D.; TAGLIARI, B.; STRECK, E. L.; WANNAMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. S. Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. **Brain Res.**, v. 983, p. 58-63, 2003.

DELWING, D.; TAGLIARI, B.; CHIARANI, F.; WANNMACHER, C. M.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. S.  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid administration prevents the impairment of brain energy metabolism of hyperargininemic rats. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 26, n. 2, p. 177-189, 2006.

DELWING, D.; CORNÉLIO, A. R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C. M.; WYSE, A. T. S. Arginine administration reduces creatine kinase activity in rat cerebellum. **Metab. Brain. Dis.**, v. 22, n. 1, p.13-23, 2007a.

DELWING, D.; STEFANELLO, F. M.; PERRY, M. L.; WYSE, A. T. S. Inhibition of CO(2) production from glucose by arginine in brain slices of rats. **Metab. Brain. Dis.**, v. 22, p. 145-155, 2007b.

DELWING, D.; DELWING, D.; BAVARESCO, C. S.; WYSE, A. T. S. Protective effect of nitric oxide synthase inhibition or antioxidants on brain oxidative damage caused by intracerebroventricular arginine administration. **Brain Res.**, v. 1193, p. 120-127, 2008.

DINCER, Y.; ERZIN, Y.; HIMMETOGLU, S.; GUNES, K. N.; BAL, K.; AKCAY, T. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, v. 52, n. 7, p. 1636-41, 2007.

DRÖGE W. Free Radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Ver.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DU, C.; ANDERSON, A.; LORTIE, M.; PARSONS, R.; BODNAR, A. Oxidative damage and cellular defense mechanisms in sea urchin models of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, n. 2, p. 254-263, 2013.

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. p. 178-203.

DUBNOFF, H.; BORSOOK, H. A micromethod for the determination of glycocyanime in biological fluids and tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 138, p. 381, 1941.

ESTERBAUER, H.; E CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FERRARI, R.; CECONI, C.; CURELLO, S.; GUARNIERI, C.; CALDARERA, M.; ALBERTINI, A.; VISIOLI, O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 17, p. 937-45, 1985.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERREIRA, A. G. K.; CUNHA, A. A.; MACHADO, F. R.; PEDERZOLLI, C. D.; DALAZEN, G. R.; ASSIS, A. M.; LAMERS, M. L.; SANTOS, M. F.; DUTRA-FILHO, C. S.; WYSE, A. T. S. Experimental Hyperprolinemia Induces Mild Oxidative Stress, Metabolic Changes, and Tissue Adaptation in Rat Liver. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 174-183, 2012.

FRANKEL, E. N. **Lipid oxidation**. 2ed. Bridgwater: Oily Press, v. 18, p. 391-405, 2005.

FREEMAN, B.; CRAPO, J. D. Biology of disease: **Free radicals and tissue injury**. Lab. Invest. v. 47, n. 5, p. 412-426, 1982.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costusspicatus***. 2005. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GEY, K. F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, Oxford, v.7, n.1/2, p.113-174, 1998.

GILL, S. S.; TUJETA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GIUGLIANI, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna**. v. 23, n. 1, p. 29-4, 1988.

GOTOH, T.; ARAKI, M.; MORI, M. Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 233, p. 487-491, 1997.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 110-8, 2004.

GU, J.; LI, Y.; XIE, L. ZHANG, R. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster *Pinctada fucata* exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 144, n. 2, p. 184-190, 2006.

GUERAUD, F.; ATALAY, M.; BRESGEN, N.; CIPAK, A.; ECKL, P. M.; HUC, L.; JOUANIN, I.; SIEMS, W.; UCHIDA, K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Radic. Res.**, v. 44, n. 10, p. 1098-124, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 24, n. 4, p. 1023-1027, 1996.

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. C. M. **Free radicals in biology and medicine**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford University Press Inc; 1999.

HALLIWELL, B. Vitamin C and genomic stability. **Mutat Res.**, v. 475, n. 1-2, p. 29-35, 2001.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 331-255, 2004.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J. Neurochem.**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev.**, v. 70, p. 257-65, 2012.

HAMMAD, L. A.; WU, G.; SALEH, M. M.; KLOUCKOVA, I.; DOBROLECKI, L. E.; HICKEY, R. J.; SCHNAPER, L.; NOVOTNY, M. V.; MECHREF, Y. Rapid Commun. **Mass Spectrom.**, v. 23, n. 6, p. 863-76, 2009.

HARA, H.; KATO, H.; KOGURE, K. Protective effect of  $\alpha$ -tocopherol on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. **Brain. Res.**, v. 510, n. 2, p. 335-338, 1990.



HELDT, H. W.; HELDT, F. The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. In: Heldt, H. W. (ed.) **Plant Biochemistry** (3 Ed), 2005. p. 165-193.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, p. 319-368, 2004.

HO, Y. S.; XIONG, Y.; MA, W.; SPECTOR, A.; HO, D. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. **Jornal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 31, p. 32804-32812, 2004.

HÖHN, A.; JUNG, T.; GRIMM, S.; GRUNE, T. Lipofuscinbound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. **Free Radic Biol Med**. v. 48, n. 8, p. 1100-8, 2010.

IMAI, Y.; KUBA, K.; NEELY, G. G.; YAGHUBIAN-MALHAMI, R.; PERKMANN, T.; VAN LOO, G.; ERMOLAEVA, M.; VELDHUIZEN, R.; LEUNG, Y. H.; WANG, H.; LIU, H.; SUN, Y.; PASPARAKIS, M.; KOPF, M.; MECH, C.; BAVARI, S.; PEIRIS, J. S.; SLUTSKY, A. S.; AKIRA, S.; HULTQVIST, M.; HOLMDAHL, R.; NICHOLLS, J.; JIANG, C.; BINDER, C. J.; PENNINGER, J. M. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. **Cell**. v. 133, n. 2, p. 235-49, 2008.

IYER, R.; JENKINSON, C. P.; VOCKLEY, J. G.; KERN, R. M.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. The human arginases and arginase deficiency. **J. Inher. Metab. Dis.**, v. 21, n. 1, p. 86-100, 1998.

JARDIM, L. B.; ASHTON-PROLLA, P. Erros inatos do metabolismo em crianças e recém-nascidos agudamente enfermos: guia para seu diagnóstico e manejo. **J Pediatr**. Rio de Janeiro. v. 72, n. 2, p. 63-70, 1996.

JAIN, S. K.; MC VIE, R.; SMITH, T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. **Diab. Care.**, v. 23, n. 9, p. 1389-1394, 2000.

JENKINS, R. R. Free radical chemistry relationship to exercise. **Sports Med**. v. 5, n. 3, p. 156-70, 1988.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 114, n. 1, p. 107-132, 1996.

JUNG, T.; HÖHN, A.; GRUNE, T. Lipofuscin: detection and quantification by microscopic techniques. **Methods Mol. Biol.**, v. 594, n. 2, p. 173-93, 2010.

KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**. v. 187, n. 1, p. 187:1, 2006.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**. v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013.

KOCHA, T.; YAMAGUCHI, M.; OHTAKI, H.; FUKUDA, T.; AOYAGI, T. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1337, n. 2, p. 319-326, 1997.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.**, v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

LAW, A.; GAUTHIER, S.; QUIRION, R. Say NO to Alzheimer's disease : the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. **Brain. Res.**, v. 35, n. 1, p. 73-96, 2001.

LING, J.; SÖLL, D. Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 107, n. 9, p. 4028-33, 2010.

LIPTON, S. A.; CHOI, Y. B.; PAN, Z. H.; LEI, S. Z.; CHEN, H. S. V.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. **Nature**, v. 364, n. 6438, p. 626-632, 1993.

LOPACZYNSKIA, W.; ZEISEL, S. H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutr. Res.**, v. 21, n. 1, p. 295-307, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, J. R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265–267, 1951.

LUSHCHAK, V. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J. A; TALCOTT, S. T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E, A. Total antioxidant activity and fiber content of select Floridagrown tropical fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 19, p. 7355-63, 2006.

MARESCAU, B.; LOWENTHAL, A.; TERHEGGEN, H. G.; ESMANS, E.; ALDERWEIRELDT, F. Guanidino compounds in hiperargininemia. In: LOWENTHAL, A.; MORI, A.; MARESCAU, B. Eds. **Urea Cycle Diseases**. Adv. Exper. Med. Biology, v. 153, p. 427-435, 1982.

MARESCAU, B.; DE DEYN, P. P.; LOWENTHAL, A.; QURESHI, I. A.; ANTONOZZI, I.; BACKMANN, C.; CEDERBAUM, S. D.; CERONE, N.; CHAMOLES, N.; COLOMBO, J. P.; HYLAND, K.; GATTI, R.; KANG, S. S.; LETARTE, L.; LAMBERT, M.; MINUTANI, N.; POSSEMIERS, I.; REZVANI, I.; SNYDERMAN, S. E.; TERHEGGEN, H. G.; YOSHINO, M. Guanidino compounds analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: followup of guanidine compounds levels during therapy. **Pediatr. Res.**, v. 27, n. 3, p. 297-303, 1990.

MARESCAU, B.; DE DEYN, P. P.; LOWENTHAL, A.; QURESHI, I. A.; ANTONOZZI, I.; BACKMANN, C.; CEDERBAUM, S. D.; M CERONE, N.; CHAMOLES, N.; COLOMBO, J. P.; HYLAND, K.; GATTI, R.; KANG, S. S.; LETARTE, L.; LAMBERT, M.; MINUTANI, N.; POSSEMIERS, I.; REZVANI, I.; MARESCAU, B.; DE DEYN, P. P.; QURESHI, I. A.; ANTONOZZI, I.; BACHMANN, C.; CEDERBAUM, S. D. Guanidino compounds in hyperargininemia. In: DE DEYN, P. P.; MARESCAU, B.; SATLON, V.; QURESHI, I. A. Eds. **Guanidino Compounds in Biology & Medicine**. John Libbey & Company Ltd, 1992. p. 363-371.

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (Eds.); **Handbook for oxygen radical research**. CRC press: Boca Raton, 1985, p. 243-247.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. Amino Acids Found in Proteins. In: **Basic Medical Biochemistry**, Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

MARSHALL, W. J.; BANGERT, S. K. Free Radicals. In: Metabolic and Clinical Aspects. **Clin. Biochem.**, p. 765-777, 1995.

MARTINS, A. M. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. **São Paulo Medical Journal.**, v. 117, n. 6, p. 251-265, 1999.

MARTINS, A. M.; MICHELETTI, C.; ALMEIDA, V.; FRANGIPANI, B. **Erros Inatos do Metabolismo – Abordagem Clínica.** 2ª ed. São Paulo, p. 3-34, 2003.

MATTOS, T. C. G. **Mecanismo da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro.** 2009. Dissertação de mestrado em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MIYASHITA, K. Oxidation of long-chain polyunsaturated fatty acids. In: KAMAL-ELDIN, A.; MIN, D. B., Eds. **Lipid oxidation pathways.** 2.ed. Urbana: AOCS Press, v.2, p. 55-76, 2008.

MIZUTANI, N.; HAYAKAWA, C.; OHYA, Y.; WATANABE, K.; WATANABE, Y.; MORI, A. Guanidino compounds in hyperargininemia. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 153, n.3, p. 197-205, 1987.

MÖLLER, I. M.; RASMUSSEN, A. G.; SIEDOW, J. J.; VANLERBERGHE, G. C. The product of the alternative oxidase is still H<sub>2</sub>O. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 495, n. 1, p. 93-4, 2010.

MONTINE, T. J.; MONTINE, K. S.; MCMAHAN, W.; MARKESBERY, W. R.; QUINN, J. F.; MORROW, J. D. F<sub>2</sub>-isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases. **Antioxid. Redox Signaling.** v. 7, n. 1-2, p. 269-75, 2005.

MORI, M.; GOTOH, T.; NAGASAKI, A.; TAKIGUCHI, M.; SONOKI, T. Regulation of the urea cycle enzyme genes in nitric oxide synthesis. **J. Inher. Metab. Dis.**, v. 21, n. 1, p. 59- 71, 1998.

NAM, T. G. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. **Toxicological research**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2011.

NATELSON, S.; SHERWIN, J. E. Proposed mechanisms for urea nitrogen reutilization: relationship between urea and proposed guanidine cycles. **Clin. Chem.**, v. 25, p. 1343- 1344, 1979.

NEDEL, D. R. **Antioxidantes x radicais livres: a influência das vitaminas antioxidantes no retardo do envelhecimento cutâneo.** 2005. 78f. Monografia-

Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2005.

NEOFYTOU, E.; TZORTZAKI, E. G.; CHATZIANTONIOU, A.; SIAFAKAS, N. M. DNA Damage Due to Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). **International journal of molecular sciences**. v. 13, n. 12, p. 16853-16864, 2012.

NONAS, S.; MILLER, I.; KAWKITINARONG, K.; CHATCHAVALVANICH, S.; GORSHKOVA, I.; BOCHKOV, V. N.; LEITINGER, N.; NATARAJAN, V.; GARCIA, J. G.; BIRUKOV, K. G. AM. J. Oxidized phospholipids reduce vascular leak and inflammation in rat model of acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 173, n. 10, 1130-8, 2006.

OAKLEY, A. E.; BREEN, K. M.; CLARKE, I. J.; KARSCH, F. J.; WAGENMAKER, E. R.; TILBROOK, A. J. Cortisol reduces gonadotrophin-releasing hormone pulse frequency in follicular phase ewes: influence of ovarian steroids. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 341-349, 2009.

ORRENIUS, S.; GOGCADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 143-183, 2007.

PISANO, J. A.; UNDERFRIEND, S. Biosynthesis and disposition of  $\gamma$ -guanidinobutyric acid in mammalian tissues. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 100, p. 323-329, 1963.

PIZZIMENTI, S.; CIAMPORCERO, E.; DAGA, M.; PETTAZZONI, P.; ARCARO, A.; CETRANGOLO, G.; MINELLI, R.; DIANZANI, C.; LEPORE, A.; GENTILE, F.; BARRERA, G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. **Frontiers in physiology**. v. 4, n. 4, p. 242, 2013.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

PORTER, F. D.; SCHERRER, D. E.; LANIER, M. H.; LANGMADE, S. J.; MOLUGU, V.; GALE, S. E.; OLZESKI, D.; SIDHU, R.; DIETZEN, D. J.; FU, R.; WASSIF, C. A.; YANJANIN, N. M.; MARSO, S. P.; HOUSE, J.; VITE, C.; SCHAFFER, J. E.; ORY, D. S. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. **Sci. Translational Med.** v. 2, n. 56, p. 56-81, 2010.

PRASAD, A. N.; BREEN, J. C.; AMPOLA, M. G.; ROSMAN, N. P. Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy: case reports and literature review. **J Child Neurol.**, v. 12, n. 5, p. 301-9, 1997.

QI, B.; YAMAGAMI, T.; NARUSE, Y.; SOKEJIMA, S.; KAGAMIMORI, S. Effect of taurine on depletion of erythrocyte membrane Na-K ATPase activity due to ozone exposure or cholesterol enrichment. **J Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 41, n. 6, p. 627-634, 1995.

REIS, E. A.; OLIVEIRA, L. S.; LAMERS, M. L.; NETTO, C. A.; WYSE, A. T. S. Arginine administration inhibits hippocampal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. **Brain Res.**, v. 951, n. 2, p. 151-157, 2002.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radic Biol Med.**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, 2010.

ROCHA, A. V.; COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. Vitamina C, in: COZZOLINO, S. M. F., COMINETTI, C. **Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença.** 1ª ed. Barueri: Manole, 2013.

ROESSNER, A.; KUESTER, D.; MALFERTHEINER, P.; SCHNEIDER-STOCK, R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathol Res. Pract.**, v. 204, n. 7, p. 511-24, 2008.

ROVER, J. R. L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova.** v. 24, n. 1, p. 112-9, 2001.

SCAGLIA, F.; LEE, B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. **Am J. Med. Genet. C Semin Med. Genet.**, v. 142C, n. 2, p. 113-20, 2006.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME.** v. 10, n. 10, p. 308-13, 2004.

SCRIVER, C. R., BEAUDET, A. L., SLY, W. S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** 8ª ed. New York: McGraw –Hill, 2001.

SENER, G.; SEHIRLI, A. O.; IPCI, Y.; CETINEL, S.; CIKLER, E.; GEDIK, N.; ALICAN, I.; Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 19, n. 2, p. 155–164, 2005.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug. Metab. Rev.**, v. 32, n. 3-4, p. 307-26, 2000.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Ver. Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.

SHINDE, U. A.; MEHTA, A. A.; GOYAL, R. K. Nitric oxide: a molecule of the millennium. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 38, n. 3, p. 201-210, 2000.

SILVA, C. G.; PAROLO, E.; STRECK, E. L.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C. M. D.; WYSE, A. T. S. In vitro inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidine compounds accumulating in hyperargininemia. **Brain Res.**, v. 838, n. 1-2, p. 78-84, 1999.

SILVA, C. G.; BUENO, A. R. F.; SCHUCK, P. F.; LEIPNITZ, G.; RIBEIRO, C. A.; ROSA, R. B.; DUTRA-FILHO, C. S.; WYSE, A. T.; WANNMACHER, C. M.; WAJNER, M. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. **Neurochem Int.**, v. 44, n. 1, p. 45–52, 2004.

SILVA, V. L.; COZZOLINO, S. M. F. Vitamina C (Ácido Ascórbico). In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3.ed. Barueri: Manole, Cap.13, p.354-373. 2009.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Cienc. Cult.**, v. 66, n. 1, São Paulo, 2014.

SILVERSTEIN, R. L.; FEBBRAIO, M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. **Sci. Signal.**, v. 2, n. 72, p. re3. 2009.

SIMONIAN, N. A.; COYLE, J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 83-106, 1996.

SNYDERMAN, S. E.; SANSARICQ, C.; CHEN, W. J.; NORTON, P. M.; PHNSALKAR, S. V. Argininemia. **J. Pediatr.**, v. 90, n. 4, p. 563-568, 1977.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, J. G. M.; AYRES, M. C.C.; COSTA, C. L. C.; ARAÚJO, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-5, 2007.

SOUZA, I. C. N. **Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento** 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

STAHL, W.; AUST, O.; SIES, H.; POLIDORI, M.C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and caro- tenoids. **J. Chromatogr.**, v. 936, n. 1-2, p. 83-93, 2001.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol. Rev.**, v. 84, n. 4, p. 1381-1478, 2004.

STRECK, E. L.; ZUGNO, A. I.; TAGLIARI, B.; FRANZON, R.; WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. Inhibition of rat brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. **Neurochem Res.**, v. 26, n. 11, p. 1195-1200, 2001.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, A. D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free radical biology & medicine**, v. 62, p. 157-169, 2013.

TEKMAN, B.; OZDEMIR, H.; SENTURK, M.; CIFTCI, M. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 148, n. 2, p. 117-121, 2008.

THÉRON, P.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; DAVIT-SPRAUL, A.; CONTI, M.; LEGRAND, A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 3, n. 5, p. 373-384, 2000.

TORRES, A.; GUINAND, J.; GUERRA MODERNELL, M. Propiedades nutricionales y estabilidad de los componentes de los alimentos. In: GUERRA MODERNELL, M. **Efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de los alimentos**. Caracas, Venezuela: CYTED, Cap.1, p. 1-18, 2003.

VALKO, M.; RHODES, C. J; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. **Chemico-Biological Interactions**. v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.



VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O.; FONSECA, J.; MOURA, B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nov.**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VINA, J.; LLORET, A.; ORTI, R.; ALONSO, D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. **Mol. Aspects Med.**, v. 25, n.1-2, p. 117-123, 2004.

WAJNER, M.; LATINI, A.; WYSE, A. T.; DUTRA-FILHO, C. S. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. **J. Inherit. Metab. Dis.**, v. 27, n. 4, p. 427-448, 2004.

WEI, T.; ZHAO, X.; HOU, J.; OGATA, K.; SAKAUE, T.; MORI, A.; XIN, W. The antioxidant ESeroS-GS inhibits NO production and prevents oxidative stress in astrocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 83-91, 2003.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Method Enzymol**, v. 77, p. 325–332, 1981.

WU, R. P.; HAYASHI, T.; COTTAM, H. B.; JIN, G.; YAO, S.; WU, C. C. N.; ROSENBAACH, M. D.; CORR, M.; SCHWAB, R. B.; CARSON, D. A. Proc. Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. **Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 107, n.16, p. 7479-7484, 2010.

WYSE, A. T. S.; BAVARESCO, C. S.; BANDINELLI, C.; STRECK, E. L.; FRANZON, R.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. **Neurochem. Res.**, v. 26, p. 515-520, 2001a.

WYSE, A. T. S.; BAVARESCO, C. S.; HAGEN, M. E. K.; DELWING, D.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M. In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hiperargininemia. **Brain Res.**, v. 923, p. 50-57, 2001b.

WYSE, A. T. S.; STEFANELLO, F. M.; CHIARANI, F.; DELWING, D.; WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M. Arginine administration decreases cerebral cortex acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase probably by oxidative stress induction. **Neurochem. Res.**, v. 29, p. 385-389, 2004.

YANG, L.; LATCHOUMYCANDANE, C.; MCMULLEN, M. R.; PRATT, B. T.; ZHANG, R.; PAPOUCHADO, B. G.; NAGY, L. E.; FELDSTEIN, A. E.; MCINTYRE, T. M. Chronic alcohol exposure increases circulating bioactive oxidized phospholipids. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 29, p. 22211-22220, 2010.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. **Chem. Rev.**, v. 111, p. 5944-5972, 2011.

YU, P. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.**, v. 74, n. 1, p. 139-62, 1994.

ZAMBO, V.; SIMON - SZABO, L.; SZELENYI, P.; KERESZTURI, E.; BANHEGYI, G.; CSALA, M. Lipotoxicity in the liver. **World journal of hepatology**, v. 5, n. 10, p. 550-557, 2013.

ZHANG, L.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 1-2, p. 33-41, 2006.

ZHANG, X. H. Regulation of protein function by residue oxidation. **Proteomics Insights**, v. 3, p. 17-24, 2010.

## **ANEXO 1. Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**

FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - FURJ  
UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE



Joinville, 21 de maio de 2013

OFÍCIO N.º 019/2013 - PRPPG/ CEP

Para Daniela Delwing de Lima  
Projeto de Pesquisa - Farmácia  
UNIVILLE

ASSUNTO: Parecer Processo nº 001/2013

O Projeto de pesquisa intitulado **"EFEITO DOS COMPOSTOS GUANIDÍNICOS ACUMULADOS NA HIPERARGINEMIA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RINS E SANGUE DE RATOS: PAPEL PROTETOR DAS VITAMINAS E E C E DO L-NAME"**, de sua responsabilidade, foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE, após ter sido analisado e verificado que atende plenamente aos parâmetros descritos na Lei 11794 de 08 de outubro de 2008 e Resolução 19/07 CEP/UNIVILLE, conforme parecer em anexo.

Lembramos que, ao finalizar a pesquisa, deverá ser encaminhado ao CEP/UNIVILLE o relatório final.

Atenciosamente,

Eleide Abril Gordon Findlay

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE

**Campus Joinville**  
Rua Paulo Maischitzki nº 10 - Zona Industrial  
CEP: 89219-710 - Joinville/SC  
Fone: (47) 3461-9000 - Fax: (47) 3473-0131  
[www.univille.br](http://www.univille.br)

**Unidade Centro - Joinville**  
Rua Ministro Calógeras, 437 - Centro  
CEP: 89202-207 - Joinville/SC  
Fone: (47) 3422-3021

**Unidade São Francisco do Sul**  
Rodovia Duque de Caxias Km 8 Poste 128 - Iperoba  
CEP: 89.240-000 - São Francisco do Sul/SC  
Telefone: (47) 3471-3800

**Campus São Bento do Sul**  
R. Norberto Eduardo Weisermann, 230 - Colonial  
Caixa Postal 41 - CEP: 89290-000 - São Bento do Sul/SC  
Telefone: (47) 3631-9100