

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Estresse oxidativo em rins de ratas reprodutoras e não reprodutoras ao longo do  
envelhecimento.

ANA CAROLINA ALMEIDA DA SILVA

PORTO ALEGRE

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Estresse oxidativo em rins de ratas reprodutoras e não reprodutoras ao longo do  
envelhecimento.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia  
Celular e Molecular.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mara da Silveira Benfato

“E aprendi que se depende sempre,  
De tanta, muita diferente gente,  
Cada pessoa sempre é as marcas,  
Das lições diárias de tantas outras pessoas...”

Dedico este trabalho à minha família, Jonei, Ângela e João.

## Sumário

AGRADECIMENTOS .....	6
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1. Envelhecimento .....	10
1.1.1. Teoria dos Radicais Livres do Envelhecimento .....	10
1.2. Estresse Oxidativo .....	11
1.2.1. Espécies reativas e radicais livres .....	11
1.2.2. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes .....	13
1.3. Reprodução, hormônios sexuais e ciclo estral .....	16
1.4. Rins e envelhecimento .....	17
1.5. Hormônios sexuais e estresse oxidativo .....	18
2. OBJETIVO .....	20
2.1. Objetivos específicos .....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
Artigo científico submetido à revista <i>Biogerontology</i> .....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTAR .....	42
5. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR .....	43
6. CONCLUSÃO .....	49
7. PERSPECTIVAS .....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
9. ANEXOS .....	57

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Mara Benfato pela oportunidade de realização do trabalho e pelo apoio, paciência e ensinamentos ao longo deste.

Aos colegas de laboratório: Alexey Andrade, Artur Schüller, Camila Mahl, Camile Behling, Cléber Verona, Fernanda Hackenhaar, Fernanda Heemann, Giordana Sousa, Jordana Putti, Mélangy Natuane, Paulo Alabarse, Tássia Medeiros e Tiago Salomon pela amizade, alegria e ajuda nestes dois anos.

Aos professores integrantes da comissão de acompanhamento, Prof. Dr. Itabajara Vaz e Prof. Dr. Arthur Fett Neto, pelas colocações ao longo do trabalho e pelo empréstimo de seus laboratórios para realização de ensaios.

Ao professor Dr. Diego Bonatto pelas colocações na correção do artigo científico para submissão.

Aos professores que compõem a banca de defesa, pelas contribuições.

Às farmacêuticas Angela Merckel e Juliana Zart pelo auxílio durante o período em que trabalhei, pelos ensinamentos e flexibilização de horários.

Aos meus amigos de Caxias do Sul, em especial a Paula Bianchi, Caroline Bianchi e Jerusa Mocelin, pela torcida, amizade e acolhimento.

Ao Diego, pelo amor, compreensão, paciência, ajuda e convivência nestes dois anos, além da ajuda na formatação do trabalho.

Aos meus pais, Ângela e Jonei, e meu irmão João, pelos valores ensinados, pelo apoio, amor e suporte incondicionais em toda minha vida.

## RESUMO

A reprodução é um processo dispendioso da vida, e o investimento reprodutivo parece ser maior para fêmeas do que para os machos em muitas espécies. Neste trabalho analisamos os efeitos do investimento reprodutivo durante o envelhecimento com relação aos parâmetros de estresse oxidativo em rins de ratas Wistar. Medimos a atividade da glutathiona peroxidase, glutathiona S-transferase, superóxido dismutase e aconitase. O consumo de peróxido de hidrogênio, a carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica, nitrito e nitrato, os níveis de vitamina C e E e de hormônios sexuais foram também mensurados. Traçamos o perfil oxidativo nas idades de 3, 6, 12 e 24 meses. Os animais foram agrupados de acordo com a experiência reprodutiva: em reprodutores e não reprodutores. Os animais não reprodutores exibiram um aumento nos parâmetros estudados aos 6 e 24 meses, enquanto que os animais reprodutores exibiram um perfil semelhante aos 3 e 12 meses. Aos seis meses de idade, durante o período que representa o pico reprodutivo, os animais não reprodutores apresentaram maiores níveis de MDA, vitamina C, consumo de peróxido de hidrogênio e atividades de GPx, aconitase e SOD. Em ratos idosos não reprodutores, observou-se um aumento nos marcadores de dano oxidativo e um aumento nas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, com a exceção do consumo de peróxido de hidrogênio e vitamina C. Em longo prazo, pode-se inferir que o investimento reprodutivo não foi suficiente para interferir com a capacidade antioxidante, e não contribuiu para o dano oxidativo em rins de ratas Wistar.

Palavras-chave: Reprodução, envelhecimento, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, rins.

## ABSTRACT

Reproduction is a costly life process, and the reproductive investment by females appears to be greater than males in many species. We have analyzed the effects of reproductive investment during aging with respect to oxidative stress parameters in kidneys of female Wistar rats. We measured the activity glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, consumption of hydrogen peroxide, protein carbonylation, lipid peroxidation, nitrite and nitrate levels, and vitamin C and E levels. We traced oxidative profiles at ages 3, 6, 12, and 24 months. Animals were grouped according to reproductive experience: experienced or naïve with respect to reproductive activity. We measured aconitase activity and sex hormone levels. The naïve animals exhibited an increase in the parameters studied at 6 and 24 months, whereas experienced animals exhibited a similar increase at 3 and 12 months. At six months of age, during the period that would represent peak reproductive activity, naïve animals showed higher levels of MDA, Vitamin C, consumption of hydrogen peroxide and GPx, aconitase, and SOD activities. In naïve elderly rats, we observed an increase in oxidative damage markers and an increase in enzymatic and non-enzymatic antioxidants, with the exception of consumption of hydrogen peroxide and vitamin C. In the long term, the reproductive investment was not sufficient to interfere with antioxidant capacity, and did not contribute to oxidative damage in kidneys of female Wistar rats.

Keywords: Reproduction, aging, antioxidant enzymes, oxidative stress, kidneys.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

8OHdG – 8-oxo-7,8-dehidro-2'-deoxiguanosina

ACO – Aconitase

ACORE – Aconitase reativada

BSA – Albumina sérica bovina

CAT - Catalase

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

DNPH - Dinitrofenilhidrazona

GPx – Se-glutationa peroxidase

GR – Glutationa Redutase

GSH – Glutationa

GST – Glutationa S-transferase

HPLC - "High Performance Liquid Chromatography" - Cromatografia líquida de alta eficiência

IRE – Elemento responsivo ao ferro/ *Iron response element*

IRP – Proteína reguladora de ferro/ *Iron regulatory protein*

MAP-cinase – Proteína-cinases ativadas por mitógenos

MDA – Malondialdeído

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NF- $\kappa$ B – Fator nuclear kappa beta

Prxs - Peroxirredoxinas

SOD - Superóxido dismutase

TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico

VIT. C – Ácido ascórbico/vitamina C

VIT. E – Alfa-tocoferol/vitamina E

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Envelhecimento**

O envelhecimento ou senescência pode ser definido como um declínio da fertilidade individual e da probabilidade de sobrevivência ao fim da vida (Partridge e Barton, 1993). Além disso, é acompanhado por uma progressiva perda de função dos organismos, sendo assim claramente negativo do ponto de vista individual. O envelhecimento é um fenômeno amplamente distribuído filogeneticamente, contudo não é intrínseco à todos os organismos vivos. É um processo complexo, de difícil entendimento e definição e existem várias teorias tentando elucidar por que e como ele acontece (Kirkwood e Austad, 2000).

Uma das teorias que explica o porquê do envelhecimento é chamada teoria da velocidade de vida e postula que o envelhecimento é causado pelo acúmulo de danos irreparáveis às células e aos tecidos e que todos os organismos foram selecionados para resistir e reparar esses danos fisiologicamente o máximo possível. Propõe que as populações não têm variabilidade genética para responder à seleção natural contra o envelhecimento. Partindo desse pressuposto, pode-se dizer que, como os danos celulares são causados, em grande parte, pelos subprodutos do metabolismo, a taxa de envelhecimento deve estar relacionada à taxa metabólica (Austad e Fischer, 1991).

#### **1.1.1. Teoria dos Radicais Livres do Envelhecimento**

A teoria dos radicais livres do envelhecimento (Harman, 1956) define que o envelhecimento resulta de um acúmulo de dano causado por espécies reativas (ERs) ao longo do tempo, levando à disfunção celular e aumento da mortalidade. Assim, de acordo com essa teoria, fatores que aumentam a produção de ERs deveriam acelerar o envelhecimento, enquanto que fatores que protegem contra ERs, como as enzimas antioxidantes, deveriam retardá-lo. Recentemente, esta teoria vem sendo refutada pela comunidade científica, mas, embora a contribuição das espécies reativas para o envelhecimento pareça controversa, a toxicidade de altos níveis de ERs nos organismos é inegável (Van Raamsdonk, Hekimi, 2012). Uma teoria mais recente, e que englobaria a teoria de Harman, é a chamada “Green Theory”

(esquemática na figura 1). Esta teoria considera que embora seja inegável que altos níveis de EROs causem danos moleculares que acelerem o envelhecimento, não só o oxigênio e seus subprodutos são responsáveis pelo acúmulo de danos que levaria a este processo (Gems, McElwee, 2005).

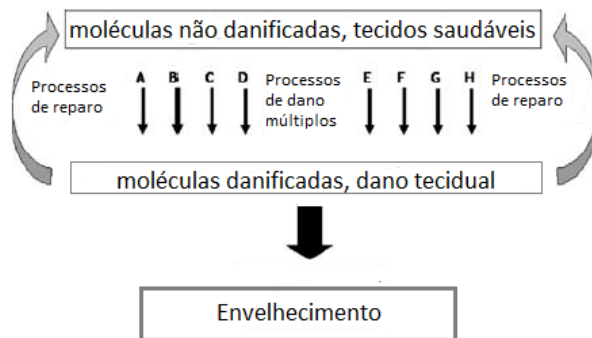


Fig.1. Esquema simplificado da “Teoria Verde” do envelhecimento. Envelhecimento resulta de uma falha progressiva nos sistemas de detoxificação de um amplo espectro de moléculas danosas geradas pelo metabolismo endobiótico e xenobiótico (A,B,C,D etc.) (Iqbal, Piper *et al.*, 2009)

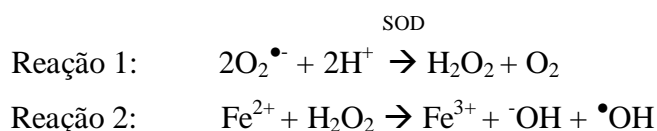
## 1.2. Estresse Oxidativo

### 1.2.1. Espécies reativas e radicais livres

Nos organismos aeróbicos, ERs são produzidas como um subproduto do metabolismo normal devido ao vazamento de elétrons do oxigênio durante sua passagem pela cadeia respiratória. As espécies reativas de oxigênio (EROs) mais importantes biologicamente são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), peroxil ( $ROO^{\bullet}$ ), alcoxil ( $RO^{\bullet}$ ) e hidropoxil ( $HO_2^{\bullet}$ ) (Rizzo, Roscino *et al.*, 2012). O  $O_2^{\bullet-}$  é o primeiro intermediário da reação de redução do oxigênio à água, e a partir dele serão formadas as outras EROs. Além da cadeia transportadora de elétrons outros sistemas enzimáticos são responsáveis pela formação de ERs dentro da célula, tais como enzimas do citocromo P450 e a NADPH oxidase. Espécie reativa é um termo amplo, que inclui os radicais livres e outros derivados não-radicalares como o ozônio e o peróxido de hidrogênio. Radical livre é qualquer espécie química (átomo, íon ou molécula) que possui um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita mais

externa. A presença de um elétron desemparelhado aumenta sua reatividade. Embora o termo mais difundido na biologia seja “espécies reativas de oxigênio” (EROs), muitos são os tipos de espécies reativas que podem ser formadas nos sistemas vivos. Radicais de carbono são intermediários da peroxidação lipídica, moléculas contendo nitrogênio podem formar espécies reativas de nitrogênio (ERN) como o óxido nítrico (NO•), além de outros elementos, como cloro (ERC), bromo (ERB) e enxofre (ERE) (Halliwell and Gutteridge, 2007).

O ânion radical superóxido é um radical que possui baixa reatividade com a maioria das moléculas biológicas, mas apresenta uma reatividade maior com grupamentos tiol e com metais, como cobre, manganês e ferro. Este radical é capaz de interagir com grupamentos ferro-enxofre de proteínas, e.g. aconitase, inativando-as (Abreu e Cabelli, 2010). A dismutação do superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD) leva a formação de peróxido de hidrogênio (reação 1), espécie reativa com alta capacidade de se difundir pelos tecidos, que reage com metais, principalmente ferro, na chamada reação de Fenton (reação 2):



Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico (NO•) tem grande importância biológica, pois pode atravessar membranas e se difundir rapidamente dentro das células. Seu papel fisiológico principal é atuar como vasodilatador, pois sendo sintetizado nas células endoteliais vasculares liga-se à guanilato ciclase, ativando-a. Assim mais GMP cíclico é produzido, diminuindo as concentrações de Ca<sup>2+</sup> livre e relaxando o músculo endotelial, dilatando os vasos sanguíneos e diminuindo a pressão sanguínea (Halliwell e Gutteridge 2007).

O óxido nítrico é sintetizado nos seres vivos pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a qual converte L-arginina em NO• e L-citrulina. O NO• reage com o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (reação 3) produzindo o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), principal espécie reativa de nitrogênio com importância biológica (Halliwell e Gutteridge 2007).



Espécies reativas de nitrogênio podem causar dano em moléculas biológicas através de dois tipos de reação, a nitração e a nitrosilação. A nitração acontece pelo ataque de um grupo

tiol ou metal por um grupamento nitroso (NO) e essa reação é normalmente reversível. A nitrosilação acontece através do ataque por um grupamento nitro (-NO<sub>2</sub>) a um composto biológico. Esta reação é irreversível.

### 1.2.2. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante total do organismo. O dano oxidativo pode ser definido como qualquer modificação molecular, reversível ou não, com efeito deletério, causado por espécies reativas a moléculas biológicas, como lipídios, proteínas e DNA. Porém as células, em condições aeróbicas, desenvolveram um sistema de defesa contra as ERs, conhecido como sistema de defesa antioxidante (Speakman e Selman, 2011). Halliwell and Gutteridge, 2007, definem antioxidante como: “qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo”. Esse sistema é composto basicamente por vitaminas (como a vitamina C e E), metais como o selênio e o zinco, que atuam em conjunto com enzimas, a glutathione, que é o principal antioxidante não enzimático da célula e também enzimas específicas, as chamadas defesas antioxidantes enzimáticas. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione s-transferase (GST) e a glutathione redutase (GR) (Beguel, Huvet *et al.*, 2013). Além destas enzimas, existem famílias de proteínas que exercem importante papel na sinalização redox na célula: as peroxirredoxinas, glutarredoxinas e tiorredoxinas.

Peroxirredoxinas (Prxs) são uma família de proteínas extremamente eficazes na eliminação de peróxidos. Prxs apresentam uma série de propriedades intrigantes que as distinguem de antioxidantes convencionais, incluindo a susceptibilidade à inativação por hiperoxidação na presença de peróxido em excesso e a capacidade de formar complexos de estruturas oligoméricas. Estas propriedades, em conjunto com uma elevada abundância celular e reatividade com peróxido de hidrogênio, levaram à especulação de que Prxs teriam uma função como sensores redox, transmitindo sinais como parte da resposta celular ao estresse oxidativo. Organismos multicelulares expressam várias Prxs diferentes que podem ser categorizadas por sua distribuição intracelular. Nos mamíferos, Prx3 e Prx5 são direcionadas para a matriz mitocondrial. A mitocôndria é a principal fonte de peróxido de hidrogênio e esta espécie reativa está implicada em danos associados ao envelhecimento. O

peróxido de hidrogênio também pode atuar como um segundo mensageiro, e está ligado com eventos de sinalização na mitocôndria, incluindo a indução de apoptose. Pela abundância com que é encontrada, Prx3 é responsável por cerca de 90% da detoxificação do peróxido de hidrogênio na matriz mitocondrial (Cox, Winterbourn *et al.*, 2010).

As superóxido dismutases são metaloenzimas altamente eficientes na remoção catalítica do  $O_2^{\bullet-}$  (Halliwell and Gutteridge 2007). Em mamíferos existem três tipos desta enzima: a CuZnSOD - citosólica, descoberta por McCord e Fridovich, em 1969, a qual contém em seu sítio ativo um átomo de cobre (McCord e Fridovic, 1969). A MnSOD – mitocondrial, enzima de estrutura tetramérica que contém um átomo de manganês em seu sítio ativo (Keele, McCord *et al.*, 1970). E mais recentemente, Marklund, em 1982, descobriu uma forma extracelular da enzima, conhecida como EC-SOD ou SOD3, a qual também contém um átomo de cobre em seu sítio ativo (Marklund, Holme *et al.*, 1982). Essas três formas da enzima catalisam a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em oxigênio e peróxido de hidrogênio.

O  $H_2O_2$  pode ser então removido pela enzima CAT, localizada no interior dos peroxissomos, que catalisa a decomposição direta do  $H_2O_2$  a  $O_2$ . Em algumas condições pode ocorrer vazamento da enzima para o citosol, provavelmente por lise do peroxissomo, que possui uma membrana frágil. A CAT é uma enzima tetramérica que contém um grupamento  $Fe_{III}$ -heme em seu sítio ativo (Halliwell and Gutteridge 2007).

As glutatona peroxidases (GPx) são uma família de enzimas capazes de remover o  $H_2O_2$  e outros peróxidos através do acoplamento da redução do peróxido a  $H_2O$  à oxidação da glutatona reduzida (GSH) (Reação 4) (Halliwell and Gutteridge 2007).



Em tecidos de mamíferos existem quatro isoenzimas de GPx selênio-dependentes: (a) GPx 1 ou GPx clássica, encontrada em hemácias, pulmão, fígado e rins; (b) GPx 2 ou GPx gastrointestinal; (c) GPx plasmática ou GPx3, encontrada em fluidos extracelulares de vários órgãos como rins, pulmão, epidídimo, vias deferentes, coração, placenta e músculo e (d) GPx fosfolipídica ou GPx4, a qual é amplamente distribuída em diferentes tecidos. GPx 1, 2 e 3 atuam como homo tetrâmeros, enquanto GPx4 é ativa como monômero. GPx também possui localizações subcelulares distintas. GPx 1 é encontrada no citosol, núcleo e mitocôndria; GPx2 no citosol e núcleo; GPx3 é uma proteína secretada presente no citosol enquanto que GPx4 é

encontrada no núcleo, citosol, mitocôndria e ligada à membranas. GPx5 e GPx6 são muito relacionadas à GPx3, no entanto GPx5 não possui uma selenocisteína em seu sítio ativo e é secretada no epididímo. GPx6 foi identificada em humanos e porcos e é uma seleno-dependente GPx encontrada no epitélio olfatório (Margis, Dunand *et al.*, 2008).

A molécula de glutathiona (GSH) também pode estar envolvida no metabolismo de xenobióticos através da conjugação com a enzima detoxificadora GST. Outra função da GST é a degradação de peróxidos orgânicos, porém diferencia-se das outras peroxidases por não possuir atividade sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell and Gutteridge 2007) .

Além disso, a glutathiona é o principal antioxidante não enzimático endógeno intracelular, estando presente em concentrações semelhantes a da glicose em hepatócitos (Vina, Hems *et al.*, 1978). É um sequestrador de radicais livres em condições fisiológicas além de participar na regeneração dos antioxidantes ácido ascórbico e tocoferol (Monostori, Wittmann *et al.*, 2009). A figura 2 apresenta de forma resumida os mecanismos relacionados ao estresse oxidativo aqui apresentados.

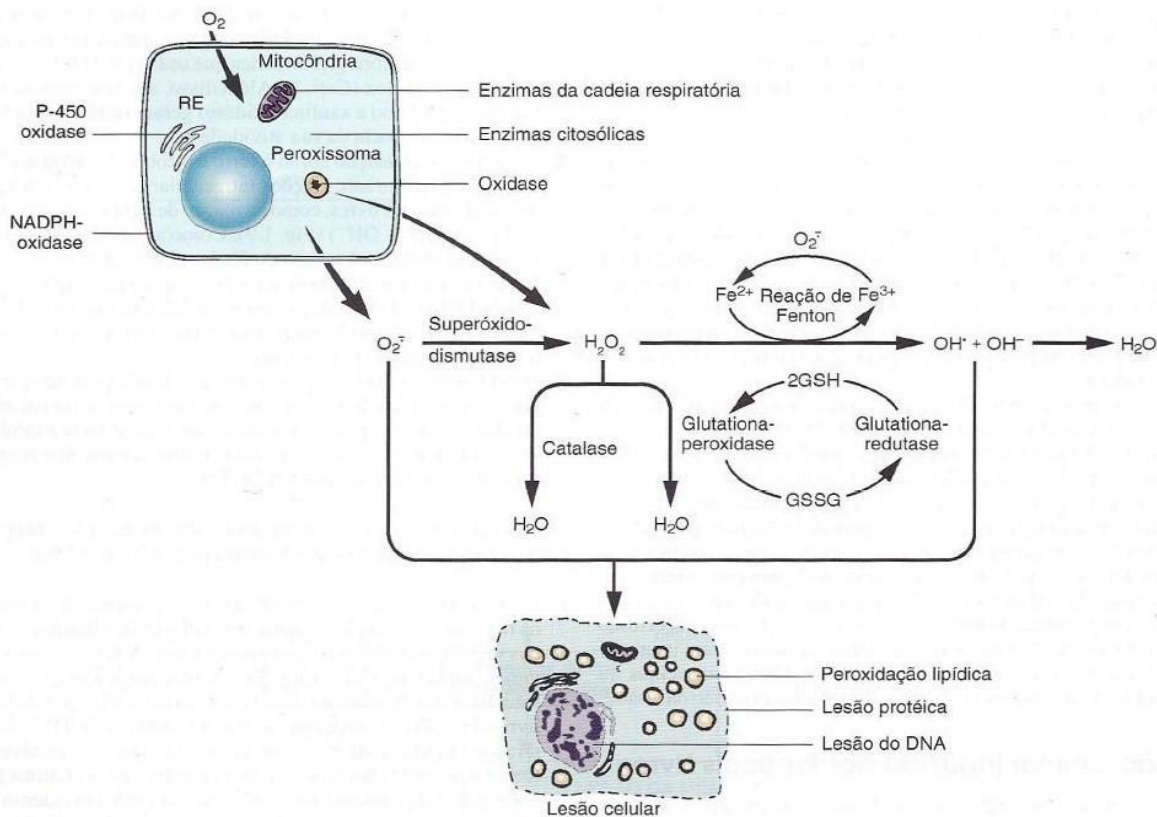


Fig. 2. Representação esquemática resumida da formação dos radicais livres e ação dos antioxidantes nos sistemas biológicos (Kumar, Abbas, 2005).

### 1.3. Reprodução, hormônios sexuais e ciclo estral

Produzir descendência viável requer um aumento da aptidão que é inevitavelmente associado a custos. Aumento de investimento atual em reprodução diminui reprodução futura através de efeitos diretos sobre o desempenho reprodutivo futuro ou através dos efeitos sobre a longevidade dos progenitores. Este *trade-off* negativo é um dos pressupostos fundamentais da teoria das histórias de vida mas a sua base fisiológica ainda não é bem compreendida (Oldakowski, Piotrowska *et al.*, 2012).

O ciclo sexual ou estral de ratas compõe um meio natural e competitivo para estudar as variações dos hormônios esteroides e suas ações fisiológicas. Muito do conhecimento que há sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos que possuem ovulação espontânea é baseado em estudos sobre o controle do ciclo estral da rata. Esse ciclo tem uma duração de 4 a 5 dias, se repete durante o ano inteiro e é composto por quatro fases: diestro (55 a 57 h), proestro (12 a 14h), estro (25 a 27h) e metaestro (6 a 8h). Cada uma das fases do ciclo caracteriza-se por expressar mudanças no útero e cérvix uterino, detectadas por características do epitélio vaginal, como a presença predominante de leucócitos (diestro), de células epiteliais nucleadas (proestro), de células epiteliais cornificadas (estro) ou de uma mistura homogênea de todos os tipos já citados (metaestro). As fases mudam conforme as variações nas concentrações de gonadotrofinas, e conseqüentemente de esteroides gonadais. Na fase do proestro o estradiol chega á sua máxima concentração, de forma a desencadear um *feedback* positivo o qual promove a liberação do GnRH um requisito para a ovulação (Smith, Freeman *et al.*, 1975). A figura 3 ilustra as alterações hormonais observadas durante o ciclo estral de ratas.

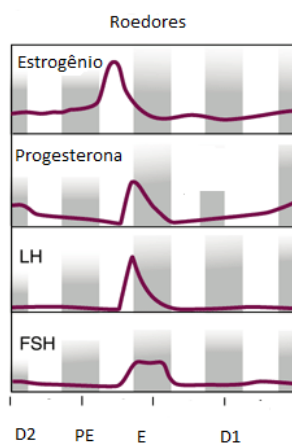




Fig. 3: Níveis hormonais nas diferentes fases do ciclo estral regular de 4-5 dias em roedores. Barras cinza representam o período noturno (D2-diestro, PE-proestro, E-estro, D1-metaestro). Adaptado e traduzido de Staley e Scharfman (2005).

Como acontece com os seres humanos, ratas passam por um processo de senescência reprodutiva (estropausa) que é caracterizada pela perda de ciclicidade hormonal gonadal. A estropausa no rato começa em torno de 9 - 12 meses de idade, altura em que o ciclo se torna irregular e tanto pode continuar ao longo deste curso ou pode parar completamente (Ehrenbrink, Hakenhaar *et al.*, 2006). A figura 4 demonstra a frequência de ciclos irregulares em ratas.

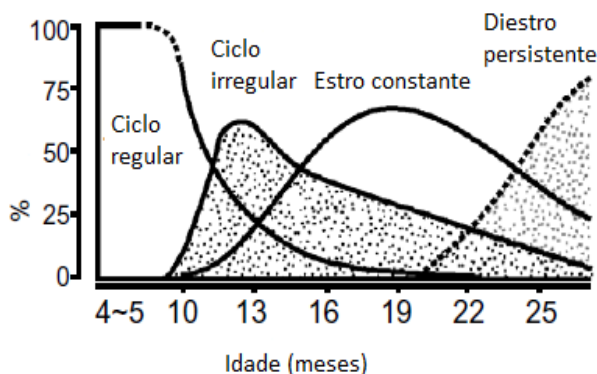


Fig. 4: Incidência de ciclos irregulares ao longo do envelhecimento em ratas. Traduzido de (Berkley, Mcallister *et al.*, 2007).

#### 1.4. Rins e envelhecimento

Uma explicação racional para a importância da função renal no estado de saúde geral, e em outras funções físicas pode ser que a presença de função renal adequada seja essencial para a manutenção dos níveis de fatores estressores no corpo em níveis não tóxicos. Função renal insuficiente, por sua vez, faz com que a carga de estresse no corpo aumente e posteriormente, promove um aumento na inflamação e / ou estresse oxidativo, levando a maiores danos estruturais e funcionais nos sistemas de órgãos (Li, Chen *et al.*, 2012).

O envelhecimento renal é um assunto de grande importância porque o aumento da incidência de nefropatias, favorecido pelo aumento da expectativa de vida e a predisposição do rim envelhecido à danos, é um problema em termos de saúde pública e custos de tratamento apropriado (Buemi, Nostro *et al.*, 2005).

A senescência nos rins é caracterizada por características histológicas típicas como diminuição da massa cortical com correspondente aumento da glomerulosclerose, fibrose

instersticial, atrofia tubular e arteriosclerose. As mudanças na função renal em indivíduos idosos incluem resistência vascular renal aumentada, fluxo plasmático renal reduzido e fração de filtração aumentada (Yang e Fogo, 2010).

A falência renal é associada a um aumento das espécies reativas de oxigênio, e também ao estresse oxidativo, produzindo um desequilíbrio entre os níveis celulares de antioxidantes como CAT, SOD, GSH e outras enzimas. Por outro lado, tem sido observado que a prevalência de doenças renais e cardiovasculares depende de fatores como idade, gênero e níveis sanguíneos de hormônios sexuais. Estudo conduzido por Pérez-Torres, em 2009, investigou a associação entre nefropatias e estresse oxidativo e concluiu que os hormônios sexuais modulam a atividade das enzimas antioxidantes, uma vez que ratas fêmeas ovariectomizadas demonstraram uma diminuição na proteção ao estresse oxidativo, enquanto que com os machos castrados acontece o contrário (Perez-Torres, Roque *et al.*, 2009).

Diferenças no desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares e danos renais entre machos e fêmeas ao longo do envelhecimento são evidentes, tanto em modelos animais quanto em humanos. Acredita-se que a base para essa diferença está nos complexos efeitos dos hormônios esteroides e seus metabólitos nos múltiplos sistemas regulatórios da pressão arterial (Chappell, Westwood *et al.*, 2008). Os benefícios terapêuticos do estrogênio são bem conhecidos, e a incidência de doenças cardiovasculares são praticamente raras em mulheres pré-menopausa comparada com homens em idade semelhante. Esse efeito protetor acontece provavelmente devido a influencia positiva do estrogênio sobre a eNOS, aumentando assim a produção de óxido nítrico (White, Shelton *et al.*, 1997).

### **1.5. Hormônios sexuais e estresse oxidativo**

Na maioria dos países desenvolvidos, as mulheres vivem mais do que os homens e isso acontece também com a maioria das espécies de mamíferos. Em ratos, a expectativa média para machos é de 24 meses, enquanto que para fêmeas é de 29 meses (Figura 5). A maioria dos estudos até o momento aponta a testosterona como pró-oxidante e o estradiol como antioxidante. Homens castrados vivem mais e mulheres na pré-menopausa produzem uma menor quantidade de 8-oxo-7,8-dehidro-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) do que os homens. Os hormônios sexuais femininos, estradiol, estrona e estriol podem inibir a peroxidação lipídica *in vitro* por possuírem grupos fenólicos que agem como antioxidantes. Além disso,

fêmeas de ratos apresentam maiores níveis de antioxidantes enzimáticos como MnSOD e GPx1 (Halliwell and Gutteridge 2007).

A taxa de produção de oxidantes pela mitocôndria é menor em fêmeas de ratos do que em machos. Mitocôndrias de fêmeas produzem a metade de peróxido de hidrogênio que mitocôndrias de machos e os níveis de 8-OHdG são quatro vezes menores em fêmeas do que em machos. Ainda, os níveis de glutathiona reduzida em fêmeas são 50% maiores, o que pressupõe que além da produção de radicais livres ser maior nos machos, estes também estão menos protegidos ao dano oxidativo com relação às fêmeas (Vina, Borras *et al.*, 2006). Embora a estrutura química do estrogênio favoreça sua ação antioxidante *in vitro* os efeitos benéficos *in vivo* do mesmo acontecem devido à indução da expressão de genes de enzimas antioxidantes, como SOD e GPx, através da ligação do estrógeno ao seu receptor por cascatas de sinalização que envolvem a MAP-cinase e o NF- $\kappa$ B (Vina, Borras *et al.*, 2005; Vina, Sastre *et al.*, 2006).

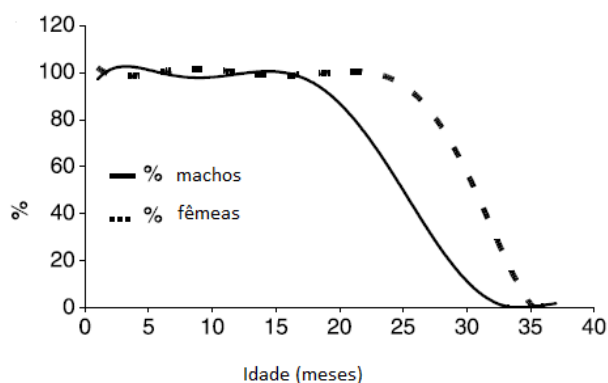


Figura 5: Expectativa de vida em ratos (n=70) criados em condições padrão. Traduzido de (Vina, Sastre *et al.*, 2006)

## 2. OBJETIVO

Avaliar as alterações no perfil oxidativo em rins e níveis hormonais em soro de ratas reprodutoras e comparar com animais sem atividade reprodutiva ao longo do envelhecimento.

### 2.1. Objetivos específicos

- Acompanhar as alterações ao longo do envelhecimento dos animais nas idades de 3, 6 12 e 24 meses.
  - Nos rins:
    - Medir a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase e o consumo de peróxido de hidrogênio;
    - Medir a atividade da enzima metabólica aconitase e de sua forma reativada;
    - Determinar os níveis dos marcadores de dano oxidativo, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e níveis de nitritos e nitratos;
    - Quantificar os antioxidantes não-enzimáticos, vitaminas C e E.
  - No soro:
    - Determinar os níveis hormonais de progesterona e estradiol.

**3. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**Artigo científico aceito para publicação na revista *Biogerontology* (*in press*).**

## Oxidative stress in the kidney of reproductive female rats during aging

**Ana Carolina A. da Silva<sup>a,b</sup>, Tiago B. Salomon<sup>a,b</sup>, Camile Saul Behling<sup>a,b</sup>, Jordana Putti<sup>b</sup>,  
Fernanda S. Hackenhaar<sup>a,b</sup>, Paulo V. G. Alabarse<sup>b</sup>, Artur K. Schüller<sup>b</sup>, Mara S.  
Benfato<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Correspondence: Dr. Mara Silveira Benfato, Departamento de Biofísica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500 prédio 43431, Porto Alegre, RS, Brazil, 91501-970 - Tel: (55-51) 33087603 - Fax: (55-51) 33087003 - E-mail: [mara.benfato@ufrgs.br](mailto:mara.benfato@ufrgs.br)

### Abstract

Reproduction is a costly life process, and the reproductive investment by females appears to be greater than males in many species. We have analyzed the effects of reproductive investment during aging with respect to oxidative stress parameters in female Wistar rats. We measured the activity glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, consumption of hydrogen peroxide, protein carbonylation, lipid peroxidation, nitrite and nitrate levels, and vitamin C and E levels. We traced oxidative profiles at ages 3, 6, 12, and 24 months. Animals were grouped according to reproductive experience: experienced or naïve with respect to reproductive activity. We measured aconitase activity and sex hormone levels. The naïve animals exhibited an increase in the parameters studied at 6 and 24 months, whereas experienced animals exhibited a similar increase at 3 and 12 months. At six months of age, during the period that would represent peak reproductive activity, naïve animals showed higher levels of MDA, Vitamin C, consumption of hydrogen peroxide and GPx, aconitase, and SOD activities. In naïve elderly rats, we observed an increase in oxidative damage markers and an increase in enzymatic and non-enzymatic antioxidants, with the exception of consumption of hydrogen peroxide and vitamin C. In the long term, the reproductive investment was not sufficient to interfere with antioxidant capacity, and did not contribute to oxidative damage in kidneys of female Wistar rats.

Keywords: Reproduction, aging, antioxidant enzymes, oxidative stress, kidneys.

## 1. INTRODUCTION

Reproduction is the most energetically demanding process of a mammal's life, particularly for females (Garratt, Vasilaki *et al.*, 2011). The high metabolic effort associated with reproduction increases the production of damaging reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) that escape from metabolic processes (Bergeron, Careau *et al.*, 2011). Although these reactive species play an important role in a wide range of physiological processes including sex and reproduction (Rizzo, Roscino *et al.*, 2012), they also cause damage to biomolecules such as proteins, lipids and DNA (Halliwell and Gutteridge 2007).

The hypothesis that reproduction is more energetically costly for females is sustained by several factors: the production of eggs; harassment by males; the cyclic production of oocytes over time; and the fact that gestation and lactation can lead to oxidative stress due to increased mitochondrial activity and consequent ROS formation (Metcalf e Alonso-Alvarez, 2010). On the other hand, the combined high fecundity and longevity of queen bees and ants versus those of the workers, who are their sisters, is a solid counterargument against the generalization that “reproduction is costly” (De Loof, 2011). However these species have no parental care as observed in mammals, reproductive and cost can also be associated with parental care.

Currently, among numerous theories of aging, the free radical theory of aging still receives widespread attention. This theory posits that the aging phenomenon is the result of the accumulation of molecular lesions caused by reactive species, leading to loss of function and to disease with increasing age (Harman, 1956). Aging is characterized by a decline in renal function, and it is thought that post-mitotic tissues such as brain, muscle, and kidney are more vulnerable to age related diseases (Aydin, Yanar *et al.*, 2012).

It is well established that females live longer than males and have a major protection against chronic diseases related to aging. Its occurs due to the protective action of estradiol, which exerts a regulating transcription of genes related to oxidative stress (Vina, Borrás *et al.*, 2006), moreover estrogens may promote a protection against progression of chronic renal disease, probably due to the stimulation of NO production (Baylis, 2009).

Although interest in the association between the costs of reproduction and oxidative stress has been growing, there are no reports that relate these two parameters during aging in female mammals. We have demonstrated previously that reproductive experience alters the

oxidative profile in kidneys of male rats during aging (Alabarse, Salomon *et al.*, 2011). The aim of this study is to examine how reproductive experience alters the oxidative profile in kidneys of female rats during aging.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Animals**

All animal studies were approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. This study employed 80 Wistar female rats (*Rattus norvegicus*) aged three, six, twelve, and twenty-four months. At one month of age, rats were divided into two groups: with (experienced) or without (naïve) reproductive activity (n=10 for each age and group). Experienced rats were maintained in a box with a single male of the same age (1 male and 1 female per box). Naïve rats were grouped with other female rats without any contact with males (5 per box). Reproduction was considered to have occurred when the females gave birth to litters. Pups were separated from the couple at 21 days of age, i.e., before the initiation of the pubertal stage, which corresponds to an age of 30–70 days for males and 33–42 days for females (Krinke 2000). Litter size ranged from 3 to 11 pups, and each couple had 8 to 12 litters. The females had litters until 12 months of age, and one had a litter at 15 months. The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle at a temperature of  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , and animals were provided with standard lab chow and drinking water *ad libitum*. Vaginal smears were performed periodically to monitor the estrous cycle, and all females were sacrificed at the proestrus stage.

### **2.2. Kidneys dissection and processing**

Animals were sacrificed according to the experimental protocol when they reached three, six, twelve, or twenty-four months of age. All animals were anesthetized using a mixture of ketamine and xylazine (i.p., 75 mg/Kg and 10 mg/Kg, respectively), and body weight and length (without tail) were measured. After perfusion using a saline infusion, the kidneys were removed, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen for later analysis.

For analysis, both kidneys of each animal were processed together with manual maceration. The samples were sonicated in buffer (30 mmol/L phosphate 120 mmol/L KCl,



100 mmol/L PMSF, pH 7.4) and centrifuged for 10 min at 3,500 g. The supernatant was transferred to a fresh tube, and a second centrifugation was performed for 10 min at 15,800 g. The supernatant from the second centrifugation was used for all assays.

### **2.3. Obtaining blood**

Before perfusion, blood was quickly collected by puncturing the left ventricle of the heart. Fresh blood was centrifuged for 4 min at 320 g, and the serum was separated for subsequent radioimmunoassay.

### **2.4. Hormonal level measurements**

Levels of progesterone and 17 $\beta$ -estradiol in serum were estimated by solid phase radioimmunoassay using Progesterone and Estradiol Coat-a-Count DPC kits (Diagnostic Products Corporation/USA).

### **2.5. Assays for enzyme activities in kidney tissue**

Glutathione peroxidase (GPx) activity was evaluated by measuring the oxidation of NADPH (using absorbance at 340 nm) in the presence of reduced glutathione, glutathione reductase, and tert-butyl hydroperoxide (Pinto e Bartley, 1969). GPx activity was expressed as U/mg of protein; 1 U was defined as the capacity of the enzyme to oxidize 1  $\mu$ mol NADPH/min.

The consumption of hydrogen peroxide was evaluated by measuring the rate of hydrogen peroxide consumption via absorbance at 240 nm (Aebi, 1984). The activity was expressed as U/mg of protein; 1 U was defined as the capacity to consume 1  $\mu$ mol of hydrogen peroxide/min. We call consumption of hydrogen peroxide for having more than one mechanism of detoxification of this reactive species (mainly catalase and peroxiredoxins) and the test is not specific for any of them.

Glutathione S-transferase (GST) activity was measured by the GST-catalyzed reaction of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with reduced glutathione using absorbance at 340 nm (Tsuchida,2000). GST activity was expressed as U/mg of protein; 1 U was defined as the capacity of the enzyme to produce 1  $\mu$ mol of GS-DNB per minute.

Total superoxide dismutase (SOD) activity was based on a spectrophotometric method that monitors the inhibition of epinephrine autoxidation using absorbance at 480 nm (Misra e Fridovic.I, 1972). SOD activity was expressed as U/mg of protein; 1 U was defined as the capacity of the enzyme to inhibit 50% of the epinephrine autoxidation.

Aconitase (ACO) activity was measured at 25°C using absorbance at 340 nm over time as citrate was converted to alpha-ketoglutarate using NADP<sup>+</sup> by 2 units/mL of isocitrate dehydrogenase (Ramara, Duckles *et al.*, 2007). ACO was fully reactivated (ACORE) by incubation of the samples for 5 min with dithiothreitol, ferrous ammonium sulfate, and reduced glutathione (Teixeira, Schumacher *et al.*, 1998; Ramara, Duckles *et al.*, 2007). ACO and ACORE activity was expressed as U/mg of protein; 1 U was defined as the amount catalyzing the formation of 1 nmol of isocitrate per minute.

All results were normalized against total protein concentration using BSA as a standard (Bradford, 1976). All assays were independently performed in triplicate.

## **2.6. Assays for antioxidant molecules in kidney tissue**

Vitamin C (Vit. C) levels were assayed by HPLC employing a reverse-phase SUPERCOSIL™ LC-18-DB HPLC Column (15 cm x 4.6 mm, 5 µm), using a mobile phase (30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol in a ratio of 82.5:17.5 (v/v)) flow rate of 1 ml/min, and a sample size of 20 µL. The absorbance of the column effluent was monitored at 250 nm (Karatepe, 2004). Under these conditions, the retention time of Vit. C was 3.0 min. The Vit. C level was expressed as µmol of Vitamin C/mg of protein.

The amount of vitamin E was measured by HPLC using a 15 cm X 4.6mm column (Nucleosil 120 C-18) with continuous flow of 2 mL per minute 93.5:3.5 (v/v) methanol:water. Detection was carried out by fluorescence (295 nm excitation and 350 nm emission). The retention time of Vitamin E was 5 minutes. The amount of Vit. E was expressed as nmol of vitamin E/mg protein calculated from an alpha-tocopherol standard (Barbas, Castro *et al.*, 1997).

All results were normalized against the total protein concentration using Bradford method (Bradford, 1976). All assays were independently performed in triplicate.

## 2.7. Assays for oxidative damage in kidney tissue

As an index of protein damage, carbonyl levels were measured using absorbance at 370 nm (Levine, Garland *et al.*, 1990). Briefly, tissue extract aliquots (50  $\mu\text{L}$ ) were added with either 2 mol/L HCl or 10 mmol/L 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/L HCl and incubated at 37°C for 90 min. Samples were centrifuged (8000 g, 10 min) and 75  $\mu\text{L}$  of 28% trichloroacetic acid was added. Samples were centrifuged again (8000 g, 10 min), and the excess DNPH was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1 (v/v). The samples were centrifuged again (8000 g, 10 min), and the protein was then dissolved by addition of 6 mol/L of guanidine hydrochloride. The carbonyl content was calculated using a millimolar extinction coefficient of hydrazone as (21,000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/mg of protein.

As an index of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) levels were measured by HPLC simultaneously with the Vitamin C assay (Karatepe, 2004). The retention time of MDA was 5.6 min. The MDA level was expressed as nmol of MDA/mg of protein, and was determined by comparison with an MDA standard solution purchased from Sigma-Aldrich.

Indirect nitric oxide (nitrite and nitrate –  $\text{NO}_2$ & $\text{NO}_3$ ) was measured via a spectrophotometric method using the Griess solution, which uses absorbance at 543 nm to determine total nitrate and nitrite levels (Grisham, Johnson *et al.*, 1996). The  $\text{NO}_2$ & $\text{NO}_3$  level was standardized by sodium nitrite and expressed as nmol of  $\text{NO}_2$ /mg of protein.

All results were normalized against total protein concentration using BSA as a standard (Bradford, 1976). All assays were independently performed in triplicate.

## 2.8. Statistical analysis

The results were analyzed using SPSS 18.0 statistical software. Because variance was heterogeneous ( $p$  value  $\leq 0.05$ ), the Kruskal-Wallis test was used. Spearman's correlation tests were used for correlation analyses. Statistical analysis was accomplished with the support of the Statistical Nucleus of the Federal University of Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS).

### 3. RESULTS

The body and kidney weight and length without tail increased as expected over time in both groups (Table 1).

**Table 1:** Body and kidney weight, and length (without tail) of animals aged three, six, twelve, and twenty-four months, grouped as naïve or experienced.

		Age <sup>a</sup>			
		3	6	12	24
Body weight <sup>b</sup>	N	202 ± 17.1	241.5 ± 21.2	260.6 ± 21.4	305.3 ± 32.0*
	E	211.5 ± 9.2*	263.2 ± 27.7	265.2 ± 22.4	292.2 ± 24.9
Kidney weight <sup>b</sup>	N	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1*
	E	1.7 ± 0.1*	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.3 <sup>#</sup>	2.3 ± 0.1
Length <sup>c</sup>	N	18.0 ± 0.7	18.0 ± 1.0	19.0 ± 0.7	20.0 ± 1.6*
	E	17.7 ± 0.4*	19.2 ± 0.5	20.0 ± 0.6	19.8 ± 1.3

a Age expressed in months.

b Kidney and body weight expressed in grams.

c Length (without tail) expressed in centimeters.

N = naïve

E = experienced

<sup>#</sup> Denotes significant difference between N (naïve) and E (experienced) at the same age;  $p \leq 0.05$ .

\* Denotes significant difference within the same group at different ages;  $p \leq 0.05$ .

Results are expressed as mean ± SD.

We found that MDA levels (lipid peroxidation indicative of oxidative damage) were higher in naïve animals than experienced animals at six months of age (Table 2). MDA levels were higher at six months also among animals of the same group. MDA levels were higher in naïve animals at twenty-four months than in experienced animals at the same age. MDA levels were higher in experienced rats at three and twelve months than in naïve rats at the same ages. Differences were not found between naïve animals during aging. Protein carbonylation was higher in naïve animals at twenty-four months of age, compared with younger naïve animals and with experienced animals at the same age. We also observed a significant decrease in protein carbonylation in naïve animals at twelve months in relation to other ages. At twelve months of age, experienced animals showed higher carbonyl levels. Among experienced animals at different ages, the highest amount of protein carbonylation was seen at six months of age. In naïve rats, we observed an increase in the  $\text{NO}_2$  &  $\text{NO}_3$  levels at 24 months of age; however, this increase was significant only compared to animals at 3 months of age. No significant differences were found in comparison to experienced animals. No significant differences were observed among experienced animals at different ages, but at 3 months  $\text{NO}_2$  &  $\text{NO}_3$  levels in experienced animals were higher than in naïve animals (Table 2).

**Table 2:** Parameters of oxidative damage in kidneys of rats naïve and experienced over aging.

		Age <sup>a</sup>			
		3	6	12	24
MDA <sup>b</sup>	N	0.65 (0.87)	29.52 (33.22)##*	1.33 (0.89)	4.59 (6.12)#
	E	1.89 (7.86)#	2.66 (11.76)	4.94 (16.10)#	0.94 (1.50)
Protein carbonylation <sup>c</sup>	N	19.76 (5.77)	34.97 (64.94)	2.39 (2.27)*	56.12 (138.97)#
	E	7.86 (9.52)	26.87 (16.64)*	6.59 (3.35)#	6.16 (2.94)
NO <sub>2</sub> &NO <sub>3</sub> levels <sup>d</sup>	N	0.02(0.03)	2.71 (3.26)	2.30 (1.96)	8.06 (6.28)*
	E	1.19 (0.81)#	1.03 (1.47)	1.98 (4.00)	2.58 (7.09)

a Age expressed in months.

b MDA (malondialdehyde levels) expressed as nmol of MDA/mg of protein.

c Protein carbonylation levels expressed as pmol of carbonyl/mg of protein.

d NO<sub>2</sub>&NO<sub>3</sub> levels expressed as nmol of NaNO<sub>2</sub>/mg of protein.

# Denotes significant difference between N (naïve) and E (experienced) at the same age; p<0.05.

\* Denotes significant difference within the same group at different ages; p<0.05.

Results are expressed as median (interquartile range; Q3-Q1).

Aconitase activity was measured as an indicator of mitochondrial function. Both ACO and ACOre activities were higher in naïve animals at six and twenty four months than at three or twelve months (Table 3). Both ACO and ACOre activities were higher in six month old naïve animals compared to experienced animals at the same age. Among the experienced animals, no significant differences were found between animals at different ages. Progesterone levels were higher in the experienced animals at twelve months of age compared with naïve animals at the same age. No significant differences were found between naïve rats at different ages. In naïve animals, estrogen levels were higher at twelve months of age than in younger animals, but no difference was found in relation to twenty four month old animals. Estrogen levels did not differ among experienced rats at different ages.

**Table 3:** Access to the metabolism by measuring aconitase enzyme (normal – ACO and reactivated - ACOre), and measures the levels of sex hormones.

		Age <sup>a</sup>			
		3	6	12	24
ACO <sup>b</sup>	N	107.99 (20.04)	434.44 (228.42)##*	69.77 (36.11)	407.00 (966.37)*
	E	152.49 (84.87)	163.73 (69.78)	172.95 (18.93)	187.52 (37.03)
ACOre <sup>b</sup>	N	107.33 (10.04)	437.88 (207.47)##*	73.58 (29.93)	440.79 (861.21)*
	E	124.39 (66.01)	174.09 (50.25)	164.85 (40.55)	197.48(123.06)
Estrogen <sup>c</sup>	N	16.70 (19.15)	29.90 (31.40)	62.40 (24.50)*	34.40 (41.40)
	E	2.30 (14.05)	36.05 (18.57)	41.10 (19.55)	21.00 (9.40)
Progesterone <sup>d</sup>	N	33.90 (22.00)	19.00 (2.45)	26.80 (12.85)	48.20 (46.50)
	E	25.90 (11.70)	12.15 (38.37)	100.00 (32.10)##*	13.70 (17.70)

a Age expressed in months.

b ACO and ACOre activity was expressed as U/mg of protein.

c Progesterone levels expressed in ng/ml.

d Estrogen levels expressed in pg/ml.

# Denotes significant difference between N (naïve) and E (experienced) at the same age; p<0.05.

\* Denotes significant difference within the same group at different ages; p<0.05.

Results are expressed as median (interquartile range; Q3-Q1).

With respect to antioxidant defenses, we found that consumption of hydrogen peroxide was higher in naïve animals at six months of age (Table 4) than in experienced animals at the same age, and was also higher than in naïve animals at other ages. Consumption of hydrogen peroxide was highest in experienced animals at twenty-four months of age, and was also higher than in naïve animals of the same age. SOD activity was higher at six and twenty-four months in naïve animals than in experienced animals or in naïve animals at three or twelve months. No significant differences in SOD were found among experienced animals of different ages. In naïve animals, GPx activity was higher at six months of age in comparison to other ages and to experienced animals at all ages. GST was higher in naïve animals at twenty-four months of age in comparison to younger animals and to experienced animals at the same age (Table 4).

**Table 4:** Activity of antioxidant enzymes: consumption of hydrogen peroxide, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST) in kidney of female rats.

		Age <sup>a</sup>			
		3	6	12	24
Consumption of hydrogen peroxide <sup>b</sup>	N	249.45 (113.89)	1434.63##* (1095.27)	316.35 (179.09)	854.73 (281.98)
	E	255.75 (80.75)	260.79 (243.96)	526.85 (258.23)	1610.97 (1505.79)##*
SOD <sup>b</sup>	N	23.22 (7.76)	346.37 (143.69)##*	27.93 (12.82)	201.08 (277.07)#
	E	28.05 (15.03)	32.27 (15.82)	24.62 (4.84)	36.54 (15.65)
GPx <sup>b</sup>	N	935.46 (73.99)	8797.16 (4259.73)##*	594.85 (253.17)	1804.04 (5276.59)
	E	1494.91 (1569.43)	2020.64 (1217.52)	1448.76 (305.30)#	2230.41 (1692.66)
GST <sup>b</sup>	N	0.19 (0.06)	0.25 (0.27)	0.22 (0.33)	0.41 (0.75)##*
	E	0.03 (0.37)	0.45 (0.23)	0.18 (0.25)	0.21 (0.28)

a Age expressed in months.

b Activity expressed in U/mg of protein.

# Denotes significant difference between N (naïve) and E (experienced) at the same age;  $p \leq 0.05$ .

\* Denotes significant difference within the same group at different ages;  $p \leq 0.05$ .

Results are expressed as median (interquartile range; Q3-Q1).

With respect to non-enzymatic defenses, we observed that Vitamin C levels were higher in six month old naïve animals than at other ages, although levels were also elevated at twenty-four months of age (Table 5). A similar biphasic profile was observed in experienced animals, but the highest levels were at twenty-four months of age. Levels of Vitamin C in experienced animals were higher at three and twelve months than in naïve animals at the same ages (Table 5). Vitamin E levels were higher in experienced animals than in naïve animals at three, six, and twelve months of age, but were higher in naïve animals at twenty-four months of age than in experienced animals at the same age. Among experienced animals the highest levels of vitamin E were observed at twelve months of age.

**Table 5:** Non-enzymatic antioxidant defenses in kidney of female rats.

		Age <sup>a</sup>			
		3	6	12	24
Vit. C <sup>b</sup>	N	0.54 (0.84)	21.53 (19.89)##	1.94 (2.79)	12.91 (16.80)*
	E	2.35 (3.01)#	10.33 (14.12)	3.21 (6.83)#	30.81 (19.29)##
Vit. E <sup>c</sup>	N	10.66 (16.04)	2.42 (6.24)	30.73 (173.80)	1094.11 (22415.47)
	E	293.61 (112.14)#	131.68 (288.28)#	1042.96 (3049.48)##	182.40 (437.36)

a Age expressed in months.

b Expressed in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  of protein.

c Expressed in  $\text{mmol}/\text{mg}$  of protein.

# Denotes significant difference among N (naïve) vs E (experienced) at the same age with  $p \leq 0.05$ .

\* Denotes significant difference in the same group at different ages with  $p \leq 0.05$ .

Presents as median (interquartile range: Q3-Q1).

Spearman Correlation analysis showed that in naïve animals ACO correlated with ACOre (98.5%), consumption of hydrogen peroxide (59.9%),  $\text{NO}_2\&\text{NO}_3$  levels (59.2%), protein carbonylation (69.7%), GST activity (46.4%), MDA levels (66.8%), vitamin C levels (76%), GPx activity (87.4%), and SOD activity (77.5%). Consumption of hydrogen peroxide correlated with  $\text{NO}_2\&\text{NO}_3$  levels (46.2%), protein carbonylation (76.1%), MDA levels (62.2%), Vitamin C levels (76.3%), GPx activity (84.6%), and SOD activity (90.1%).  $\text{NO}_2\&\text{NO}_3$  correlated with GST activity (47.8%), MDA levels (65.9%), Vitamin C levels (66.6%), and SOD activity (61.5%). Protein carbonylation correlated with MDA levels (46.3%), Vitamin C levels (62.85%), GPx activity (89.5%), and SOD activity (79.7%). Vitamin E correlated with GST activity (52.8%) and with progesterone levels (51.1%). MDA levels correlated with Vitamin C (82.8%), GPx activity (79.7%), SOD activity (84.1%), and progesterone (-45.4%). Vitamin C correlated with GPx (83.9%) and SOD (81.9%) activities. GPx correlated with SOD activity (79%).

With respect to experienced animals, ACO correlated with ACOre (70.3%), consumption of hydrogen peroxide (58.1%), GST activity (-50.1%), and SOD activity (73.2%). ACOre correlated with consumption of hydrogen peroxide (64.2%) and SOD (61.8%) activities. Consumption of hydrogen peroxide correlated with protein carbonylation (-53.4%), Vitamin C (51.2%), and SOD activity (60.6%). Vitamin E correlated with Vitamin C (-53.5%), GST activity (-67.8%), and protein carbonylation (-54.1%). Estradiol correlated with MDA levels (57.7%). Progesterone correlated with GPx activity (-62.3%). For all correlations,  $p \leq 0.05$  was considered significant.

#### 4. DISCUSSION

Our results demonstrate that there is a significant difference in oxidative profiles between experienced and naïve female rats. The observed differences support the idea that reproduction changes the parameters of oxidative stress in kidneys of female rats, as demonstrated previously in similar studies in males (Alabarse, Salomon *et al.*, 2011). During aging, there was a marked increase in some parameters at specific ages, which also is in agreement with results reported by previous studies in brain and lung of naïve female and male rats (Ehrenbrink, Hakenhaar *et al.*, 2006; Hakenhaar, Salomon *et al.*, 2009).

Theoretically, reproduction is a costly life process, and the reproductive investment by females appears to be greater than males in many species. However, recent studies using mammalian females showed lower levels of markers of oxidative damage in experienced animals than in naïve animals. For example, levels of markers of oxidative damage to proteins and lipids in liver were lower in experienced females than in naïve females (Garratt, Vasilaki *et al.*, 2011). This same group also studied markers of oxidative damage in response to reproductive effort in males and found no significant evidence of increased oxidative damage in the liver and serum of these animals. However, in skeletal muscle, MDA levels were higher for breeding animals (Garratt, Mcardle *et al.*, 2012). Researchers studying female bank voles found higher levels of lipid peroxidation and protein damage in kidney, heart, and muscles of naïve bank voles compared to experienced animals (Oldakowski, Piotrowska *et al.*, 2012). Our group found higher MDA levels in kidneys of six month old experienced male rats compared to naïve rats at the same age (Alabarse, Salomon *et al.*, 2011), which is opposite to our results in females, in which lipid damage was greater in the naïve females than experienced females at six months. These results highlight the importance of analyzing both sexes independently with respect to the physiological mechanisms that mediate the relationship between oxidative stress and reproduction. Results of studies conducted by Garratt in female mice and Oldakowski using female voles at approximately 4-5 months of age regarding oxidative damage were similar to our findings in six month old female rats; however, these results should be interpreted with caution as different organs and different species were analyzed.

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in the presence of iron or other metals might be oxidized to super active hydroxyl radicals ( $\cdot OH$ ) through the well-known Fenton reaction. These species can oxidize a wide range of biomolecules including proteins, lipids, and nucleic acids (Berlett



e Stadtman, 1997). This would explain the correlation between the amount of consumption of hydrogen peroxide and markers of oxidative damage, MDA (62.2%) and carbonyl (76.1%), found in naïve females (Supplementary Table 1), because high levels of hydrogen peroxide probably induce detoxification mechanisms. On the other hand, in experienced rats, lower levels of consumption of hydrogen peroxide are associated with higher levels of carbonyl (-53.4%). This can be explained by the fact that in conditions where there are fewer available antioxidant defenses there will be greater concentrations of free radicals, and consequently, higher oxidative damage.

Oxidative stress has been noted as one of the factors influencing the decline of renal function over time (Del Vecchio, Locatelli *et al.*, 2011; Li, Chen *et al.*, 2012). Nitric oxide (NO) is a principal endothelial-derived relaxing factor, but it reacts with superoxide anion ( $O_2^-$ ) to yield peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), a powerful oxidant and nitrosating agent (Modlinger, Wilcox *et al.*, 2004). As was seen in male animals, our results demonstrate a significant increase in  $NO_2$ & $NO_3$  levels in naïve females at 24 months. This result can be explained by the fact that kidney function is responsible for clearance of NO, and a decline in renal function is expected with aging (Percy, Power *et al.*, 2008). Moreover, as was also observed in males, the activity of SOD was higher in the elderly naïve group compared to elderly experienced animals. SOD consumes superoxide anions and prevents peroxynitrite formation (Halliwell and Gutteridge 2007).

Vitamin C acts as a reducing agent and traps peroxy radicals and directly impedes the propagation of lipid-degradation chain reactions in cellular membranes (Kimura, Yamada *et al.*, 1992; Mladenov, Tanska *et al.*, 2008). Unlike humans, rats synthesize Vitamin C, a process that takes place in the liver (Gupta, Choudhury.Pk *et al.*, 1973). The levels of Vitamin C correlated with MDA in naïve female rats (82.8%); in experienced females we observed an increase in Vitamin C levels at twelve months compared to naïve animals, which is similar to results for MDA levels, indicating that Vitamin C was properly recruited into kidneys to combat lipid damage.

GST can be reversibly activated by nitrosylation, and can be irreversibly activated by nitration. As observed in male kidneys, the increased levels of  $NO_2$ & $NO_3$  in naïve animals may account for the increased GST activity at twenty-four months. The mechanisms by which nitric oxide drive increased GST production are thought to involve peroxynitrite and/or nitrosoglutathione (Imaizumi, Miyagi *et al.*, 2006; Musci, Persichini *et al.*, 2006). Vitamin E is a major lipophilic antioxidant, having an important role in protection against lipid

peroxidation, and is reduced by Vitamin C, resulting in recovery of its antioxidant activity. This may explain the negative correlation between these antioxidant molecules (-53.5%) in experienced rats. The process of recovering Vitamin E results in consumption of vitamin C (Halliwell and Gutteridge 2007).

The increase in production of reactive species that we believe occurred in older naïve rats due to higher levels of MDA and carbonyl probably induced protective higher SOD and GST activities, however, this increase is not sufficient to block oxidative damage.

Aconitase activity was greater at ages 6 and 24 months in naïve rats. This pattern is consistent with observation made in kidneys of naïve male rats (Alabarse, Salomon *et al.*, 2011). However, between naïve and experienced animals, we observed no difference in aconitase activity, except at six months of age, where there was increased activity in naïve animals. Reactivated aconitase was measured as an indirect measure of protein damage caused by superoxide. However, we found no significant difference between measurements of normal and reactivated aconitase, suggesting no such damage to this mitochondrial enzyme.

The protective role of sex hormones, estrogen and progesterone, is already well established in the literature. In Wistar rats, female mitochondria produced half as much  $H_2O_2$  as males, and the antioxidant action of estrogens is well established, either through activation of antioxidant enzyme genes, or through the direct chemical action of estrogen in scavenging free radicals (Borras, Sastre *et al.*, 2003; Vina, Borras *et al.*, 2005; Vina, Sastre *et al.*, 2006; Borras, Gambini *et al.*, 2010). This protection could explain the decrease in levels of oxidative damage observed in naïve animals at twelve months, at which age we observed a significant increase in estradiol. However, no correlation was found in estradiol levels and antioxidant enzymes suggesting the influence of several factors within the physiological context of each age. Moreover, contrary to what we found in males, contact with the other sex did not cause an increase in sex hormones (with the exception of progesterone at twelve months). This result suggests that a possible limitation of our study was the phase of the estrous cycle at which animals were analyzed. Analysis was performed at the proestrus phase, the phase at which levels of gonadal hormones are high; it precedes the estrus phase, where the female is receptive to the male, and is probably the most appropriate phase at which to consider the costs of reproduction (Westwood, 2008).

In most parameters studied, there was an increase in levels of enzymatic activity and damage in naïve females at six and twenty-four months of age. In experienced females we observed a significant increase compared with naïve females in various parameters at 3 and

12 months. In a study of free-ranging chipmunks, researchers found a relationship between higher litter size and higher oxidative damage (lipid peroxidation), and between higher litter size and higher daily energy expenditure (Bergeron, Careau *et al.*, 2011). This could explain why at twelve months the experienced rats had higher levels of markers of protein and lipid damage, unlike at six months, the peak reproductive age, because at twelve months the females probably gave birth to more offspring. Reproductive aging in female rats is characterized by a progressive loss of regular estrous cyclicity and an associated decline in fertility and fecundity, which starts to happen at about twelve months of age (Matt, Gilson *et al.*, 1998).

We suggest that at six months of age, during the period that would represent peak reproductive activity, metabolism would be altered in expectation of an investment in reproduction, which in naive animals does not happen; this may be responsible for higher levels of oxidative damage found at this age. In response to this increased damage, more antioxidant defenses may have been produced, which could explain the decrease in the levels of damage observed at twelve months.

These results do not support the hypothesis that reproduction is costly, at least with regard to oxidative stress. In the long term, as we can see by the results in twenty-four month old rats, reproductive investment was not sufficient to interfere with antioxidant capacity or susceptibility to oxidative damage in kidneys of female Wistar rats.

#### Acknowledgments

We thank Zelma Almeida for technical assistance. We thank the laboratories of professors Itabajara Vaz and Arthur Fett Neto for the loan of equipment. This research was supported by grants from CAPES — Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian agencies for research support).

## 5. REFERENCES

- Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105; 1984
- Alabarse, P.V.G.; Salomon, T.B.; Medeiros, T.M.; Hackenhaar, F.S.; Schueller, A.K.; Ehrenbrink, G.; Benfato, M.S. Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. *Experimental Gerontology*. 46; 2011
- Aydin, S.; Yanar, K.; Atukeren, P.; Dalo, E.; Sitar, M.E.; Uslu, E.; Caf, N.; Cakatay, U. Comparison of oxidative stress biomarkers in renal tissues of D-galactose induced, naturally aged and young rats. *Biogerontology*. 13; 2012
- Barbas, C.; Castro, M.; Bonet, B.; Viana, M.; Herrera, E. Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 778; 1997
- Baylis, C. Sexual dimorphism in the aging kidney: differences in the nitric oxide system. *Nature Reviews Nephrology*. 5; 2009
- Bergeron, P.; Careau, V.; Humphries, M.M.; Reale, D.; Speakman, J.R.; Garant, D. The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Functional Ecology*. 25; 2011
- Berlett, B.S.; Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 272; 1997
- Borras, C.; Gambini, J.; Lopez-Grueso, R.; Pallardo, F.V.; Vina, J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 1802; 2010
- Borras, C.; Sastre, J.; Garcia-Sala, D.; Lloret, A.; Pallardo, F.V.; Vina, J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine*. 34; 2003
- Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72; 1976
- De Loof, A. Longevity and aging in insects: Is reproduction costly; cheap; beneficial or irrelevant? A critical evaluation of the "trade-off" concept. *Journal of Insect Physiology*. 57; 2011
- Del Vecchio, L.; Locatelli, F.; Carini, M. What We Know About Oxidative Stress in Patients with Chronic Kidney Disease on Dialysis-Clinical Effects, Potential Treatment, and Prevention. *Seminars in Dialysis*. 24; 2011

- Ehrenbrink, G.; Hakenhaar, F.S.; Salomon, T.B.; Petrucci, A.P.; Sandri, M.R.; Benfato, M.S. Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. *Experimental Gerontology*. 41; 2006
- Garratt, M.; McArdle, F.; Stockley, P.; Vasilaki, A.; Beynon, R.J.; Jackson, M.J.; Hurst, J.L. Tissue-dependent changes in oxidative damage with male reproductive effort in house mice. *Functional Ecology*. 26; 2012
- Garratt, M.; Vasilaki, A.; Stockley, P.; McArdle, F.; Jackson, M.; Hurst, J.L. Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 278; 2011
- Grisham, M.B.; Johnson, G.G.; Lancaster, J.R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase*. 268; 1996
- Gupta, S.D.; Choudhur.Pk; Chatterj.Ib. Synthesis of l-ascorbic-acid from d-glucurono-1,4-lactone conjugates by different species of animals. *International Journal of Biochemistry*. 4; 1973
- Hackenhaar, F.S.; Salomon, T.B.; Gil Alabarse, P.V.; Ehrenbrink, G.; Benfato, M.S. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochemistry and Function*. 27; 2009
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford.
- Harman, D. Aging - a theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journals of Gerontology*. 11; 1956
- Imaizumi, N.; Miyagi, S.; Aniya, Y. Reactive nitrogen species derived activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase. *Life Sciences*. 78; 2006
- Karatepe, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America*; 2004
- Kimura, H.; Yamada, Y.; Morita, Y.; Ikeda, H.; Matsuo, T. Dietary ascorbic-acid depresses plasma and low-density-lipoprotein lipid-peroxidation in genetically scorbutic rats. *Journal of Nutrition*. 122; 1992
- Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186; 1990

- Li, G.; Chen, Y.; Hu, H.; Liu, L.; Hu, X.; Wang, J.; Shi, W.; Yin, D. Association Between Age-Related Decline of Kidney Function and Plasma Malondialdehyde. *Rejuvenation Research*. 15; 2012
- Matt, D.W.; Gilson, M.P.; Sales, T.E.; Krieg, R.J.; Kerbeshian, M.C.; Veldhuis, J.D.; Evans, W.S. Characterization of attenuated proestrous luteinizing hormone surges in middle-aged rats by deconvolution analysis. *Biology of Reproduction*. 59; 1998
- Metcalf, N.B.; Alonso-Alvarez, C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology*. 24; 2010
- Misra, H.P.; Fridovic, I. Role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 247; 1972
- Mladenov, M.; Tanska, V.; Vitkovska, T.; Gjorgoski, I.; Dinevska-Kofkarovska, S.; Stafilov, T.; Hristov, K.; Duridanova, D. Evidence for the influence of vitamin C on age- and heat exposure-dependent deterioration of biochemical function in rat's liver and kidney. *Journal of Thermal Biology*. 33; 2008
- Modlinger, P.S.; Wilcox, C.S.; Aslam, S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Seminars in Nephrology*. 24:354-365; 2004
- Musci, G.; Persichini, T.; Casadei, M.; Mazzone, V.; Venturini, G.; Polticelli, F.; Colasanti, M. Nitrosative/oxidative modifications and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. 127; 2006
- Oldakowski, L.; Piotrowska, Z.; Chrzascik, K.M.; Sadowska, E.T.; Koteja, P.; Taylor, J.R.E. Is reproduction costly? No increase of oxidative damage in breeding bank voles. *Journal of Experimental Biology*. 215; 2012
- Percy, C.J.; Power, D.; Lobe, G.C. Renal ageing: Changes in the cellular mechanism of energy metabolism and oxidant handling. *Nephrology*. 13; 2008
- Pinto, R.E.; Bartley, W. Effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochemical Journal*. 112; 1969
- Ramara, A.; Duckles, S.P.; Krause, D.N.; Procaccio, V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Research*. 1176; 2007
- Rizzo, A.; Roscino, M.T.; Binetti, F.; Sciorsci, R.L. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*. 47; 2012

- Teixeira, H.D.; Schumacher, R.I.; Meneghini, R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95; 1998
- Vina, J.; Borras, C.; Gambini, J.; Sastre, J.; Pallardo, F.V. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *Febs Letters*. 579; 2005
- Vina, J.; Borras, C.; Gomez-Cabrera, M.C.; Orr, W.C. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression - Role of reactive oxygen species and (phyto)estrogens in the modulation of adaptive response to stress. *Free Radical Research*. 40; 2006a
- Vina, J.; Sastre, J.; Pallardo, F.V.; Gambini, J.; Borras, C. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. *Free Radical Research*. 40; 2006b
- Westwood, F.R. *The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging*. *Toxicologic Pathology*. 36; 2008
- Yarian, C.S.; Toroser, D.; Sohal, R.S. Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 127; 2006

Supplementary table 1: Spearman's correlation found for naive animals

	Consumption of												
	Aco	AcoR	hydrogen peroxide	NO <sub>2</sub> &NO <sub>3</sub>	Carb	GST	MDA	VitC	VitE	Est	Prog	GPx	SOD
Aco	--	98.5	59.9	59.2	69.7	46.4	66.8	76.0				87.4	77.5
AcoR		--	58.1	62.1	66.0	50.4	69.7	78.1				88.1	77.5
Consumption of hydrogen peroxide			--	46.2	76.1		62.2	76.3				84.6	90.1
NO <sub>2</sub> &NO <sub>3</sub>				--		47.8	65.9	66.6					61.5
Carb					--		46.3	62.8				89.5	79.7
GST						--			52.8				
MDA							--	82.8			-	79.7	84.1
VitC								--				83.9	81.9
VitE									--		51.1		
Est										--			
Prog											--		
GPx												--	79.0
SOD													--

Aco: Aconitase; AcoR: Reactivated aconitase; NO<sub>2</sub>&NO<sub>3</sub>: Nitrite and nitrate; Carb: Carbonyl; GST: Glutathione S-transferase; MDA: Malondialdehyde; VitC: Vitamin C; VitE: Vitamin E; Est: Estrogen; Prog: Progesterone; GPx: Glutathione peroxidase; SOD: Superoxide dismutase.



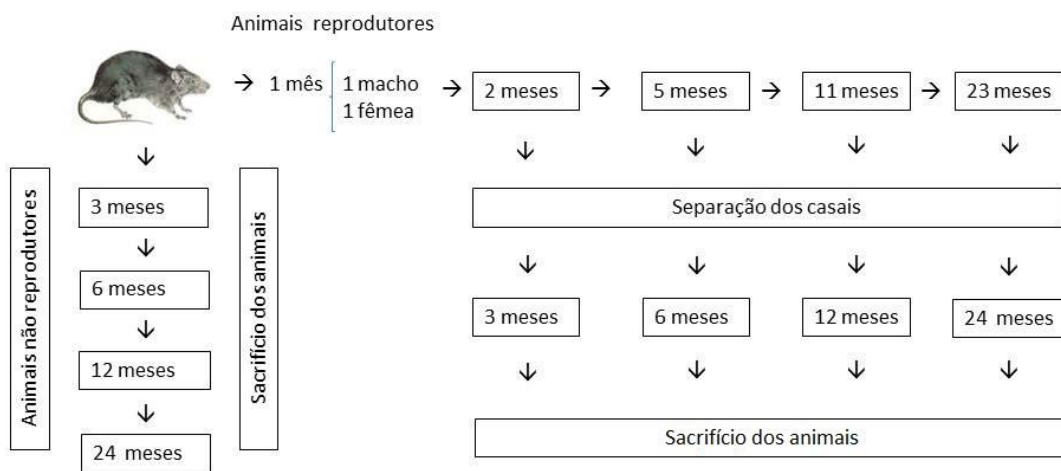
Supplementary table 2: Spearman's correlations found for experienced animals

	Aco	AcoR	Consumption of hydrogen peroxide	NO <sub>2</sub> &NO <sub>3</sub>	Carb	GST	MDA	VitC	VitE	Est	Prog	GPx	SOD
Aco	--	70.3	58.1			50.1							73.2
AcoR		--	64.2										61.8
Consumption of hydrogen peroxide			--		-53.4			51.2					60.6
NO <sub>2</sub> &NO <sub>3</sub>				--									
Carb					--				-54.1				
GST						--			-67.8				
MDA							--			57.7			
VitC								--	-53.5				
VitE									--				
Est										--			
Prog											--	-62.3	
GPx												--	
SOD													--

Aco: Aconitase; AcoR: Reactivated aconitase; NO<sub>2</sub>&NO<sub>3</sub>: Nitrite and nitrate; Carb: Carbonyl; GST: Glutathione S-transferase; MDA: Malondialdehyde; VitC: Vitamin C; VitE: Vitamin E; Est: Estrogen; Prog: Progesterone; GPx: Glutathione peroxidase; SOD: Superoxide dismutase.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTAR

Com a aprovação do Comitê de Ética da UFRGS (n° 2007831), 80 ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) foram separados em dois grupos e envelheceram conforme o esquema demonstrado na Figura 6. Foram controladas características de peso e pelo, procurando indicativos de saúde nestes animais. Caso algum dos animais demonstrasse sintomas de doença, como perda de pelo e/ou peso, seria eliminado da amostra. Os animais foram mantidos no Departamento de Biofísica da UFRGS.



**Figura 6:** Esquema de criação e separação dos animais reprodutores e não reprodutores, contendo 10 animais em cada grupo (n =80).

## 5. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR

Embora o estrogênio tenha reconhecido efeito protetor ao dano oxidativo, através da modulação da expressão de enzimas antioxidantes (Vina, Sastre *et al.*, 2006; Ramara, Duckles *et al.*, 2007; Borrás, Gambini *et al.*, 2010), neste trabalho nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de estradiol e a atividade enzimática. Todavia, nas ratas não reprodutoras aos doze meses de idade, observou-se um decréscimo nos níveis de carbonilação de proteínas, mesmo grupo onde é observado um aumento nas concentrações de estradiol. Essa relação sugere um possível efeito protetor do estradiol ao dano oxidativo em proteínas. Além disso, ao longo do envelhecimento, ao contrário do esperado, não foi observado decréscimo nos níveis dos hormônios sexuais.

Para os animais não reprodutores, percebe-se uma alta correlação entre a atividade das enzimas antioxidantes e os marcadores de dano oxidativo. Além disso, o aumento na atividade das enzimas antioxidantes também está correlacionado com o aumento da atividade da enzima aconitase.

Em eucariotos, existem duas isoformas da enzima aconitase, uma localizada na matriz da mitocôndria (m-aconitase) e outra no citosol (c-aconitase, também conhecida como proteína de regulação de ferro 1 – iron regulation protein 1 /IRP1). M-aconitase catalisa a isomerização reversível de citrato a isocitrato através da sua forma intermediária, cis-aconitato, no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Devido ao grupamento  $[4Fe-4S]_2^+$  que contém um átomo de ferro lábil e a sua proximidade com a mitocôndria, maior fonte geradora de ERs dentro da célula, é um candidato ideal para a inativação oxidativa (Cantu, Schaack *et al.*, 2009).

IRP-1s apresentam um elevado grau de identidade de aminoácidos entre as diferentes espécies. Por exemplo, IRP-1s de mamíferos são > 90% idênticas e são altamente homólogas a IRP-1s de outros organismos. Em contraste, IRP-1s de mamíferos apresentam apenas ~ 20% de identidade com aconitases mitocondriais, embora na maioria dos casos apresentem atividade de aconitase (Gourley, Parker *et al.*, 2003).

Proteínas de regulação de ferro controlam a expressão pós-transcricional dos genes moduladores da captação e estoque do ferro. Em condições de baixa quantidade de ferro intracelular, essas proteínas vão se ligar a estruturas não codificadoras do mRNA conhecidas como elementos responsivos ao ferro (IRE), que podem estar localizadas nas regiões não codificadoras 3' ou 5'. Quando os IREs estão localizados na extremidade 3', a ligação com o

IRP protege o mRNA da degradação e prossegue a síntese protéica. A ligação do IRP com o IRE localizado na extremidade 5' inibe a tradução do mRNA em proteína, diminuindo sua síntese. Por outro lado, em condições de excesso de ferro intracelular, as IRP seriam inativas por dois mecanismos distintos: a IRP1 é uma proteína citosólica bifuncional que contém um grupamento Fe-S. Na presença de ferro, a IRP1 age como uma aconitase (interconvertendo citrato e isocitrato) e na ausência de ferro liga-se com grande afinidade aos IREs de vários transcritos da homeostase do ferro. Por outro lado, a IRP2 é inativada por um mecanismo dependente de ferro e nas células repletas de ferro não ocorre a ligação IRP2-IRE. Os elementos IRE localizados próximos à região não codificadora 3', quando não ligados ao IRP permitem que haja a clivagem do mRNA e a síntese protéica é interrompida. A não ligação do IRP aos IRE localizados próximos à região 5' permite que o complexo de inicialização da tradução seja ativado, induzindo a síntese proteica (Gourley, Parker *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, mensuramos a atividade da enzima aconitase em extrato celular total, o que não nos possibilita utilizá-la para inferir o *status* do metabolismo mitocondrial.

A aconitase e a aconitase reativada apresentaram-se altamente correlacionadas, tanto nos animais reprodutores (70,3%) quanto nos não reprodutores (98,5%). Além disso, não encontramos diferença estatística entre os valores dessas medidas o que evidencia que não houve dano oxidativo ao grupamento ferro desta enzima.

O aumento da enzima SOD está correlacionado à atividade da aconitase nos animais reprodutores (73,2%) e não reprodutores (77,5%). O possível aumento da atividade da mitocôndria leva a um aumento na produção de  $O_2^{\bullet-}$  que estimularia o aumento da atividade da SOD. Da mesma forma, nos animais não reprodutores a enzima GPx está correlacionada com a atividade da aconitase (87,4%). Este aumento pode ser ocasionado pelo aumento nos níveis de  $H_2O_2$ , decorrente do possível aumento da atividade mitocondrial. Neste grupo a atividade da GPx também está correlacionada aos níveis de MDA (79,7%) e a carbonilação de proteínas (89,5%), o que pode ser explicado pelo fato desta enzima atuar na detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, e o aumento na concentração dos mesmos estimularia a atividade da GPx e de outros antioxidantes. Contudo, nos animais reprodutores não encontramos o mesmo perfil de correlação, demonstrando que a reprodução ou a ausência desta atividade, alteram o perfil oxidativo em ratas.

O consumo de peróxido de hidrogênio tem seu aumento correlacionado ao aumento de SOD e GPx nos animais não reprodutores. Também com relação à esse marcador é interessante analisar que nos animais não reprodutores seu aumento está diretamente

relacionado ao aumento nos níveis de carbonilação enquanto que nos animais reprodutores esta relação é inversamente proporcional.

Para medir o papel do dano oxidativo são necessárias ferramentas para medi-lo com acurácia. Macromoléculas reagem com espécies reativas gerando marcadores de dano oxidativo que podem ser mensurados. Produtos numerosos e complexos derivam da peroxidação lipídica os quais são classificados em primários (os hidroperóxidos lipídicos) e secundários, que derivam da  $\beta$ -ruptura dos hidroperóxidos lipídicos. O malondialdeído é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da  $\beta$ -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico. O MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em lipídios (Kadiiska, Gladen *et al.*, 2005). Os resultados obtidos demonstram não haver aumento, ao longo do envelhecimento nos níveis de MDA nos animais reprodutores. Já nos animais não reprodutores observa-se uma elevação neste marcador aos 6 meses de idade. Sugere-se que esta elevação aconteça devido ao estresse causado pelo fato destes animais estarem na idade de pico reprodutivo sendo, todavia, privados do contato com machos e da atividade reprodutiva. Comparando os animais reprodutores e não reprodutores, percebe-se que aos 3 e 12 meses, os níveis de MDA são significativamente maiores nos animais reprodutores, e aos 6 e 24 meses, maiores nos animais reprodutores.

A presença de grupamentos carbonil é indicativa de dano oxidativo em proteínas. Em condições de estresse oxidativo, estes grupamentos são formados diretamente pelo ataque de espécies reativas aos aminoácidos: arginina, lisina, prolina e treonina. Estudos demonstram que há um aumento progressivo nas concentrações de proteínas carboniladas com o envelhecimento (Levine e Stadtman, 2001; Cakatay, Telci *et al.*, 2003; Breusing, Arndt *et al.*, 2009). Os resultados observados contrapõem a literatura, uma vez que para os animais reprodutores a maior concentração de carbonil foi aos 6 meses e nos animais não reprodutores percebe-se um decréscimo significativo nos níveis deste marcador dos 6 aos 12 meses.

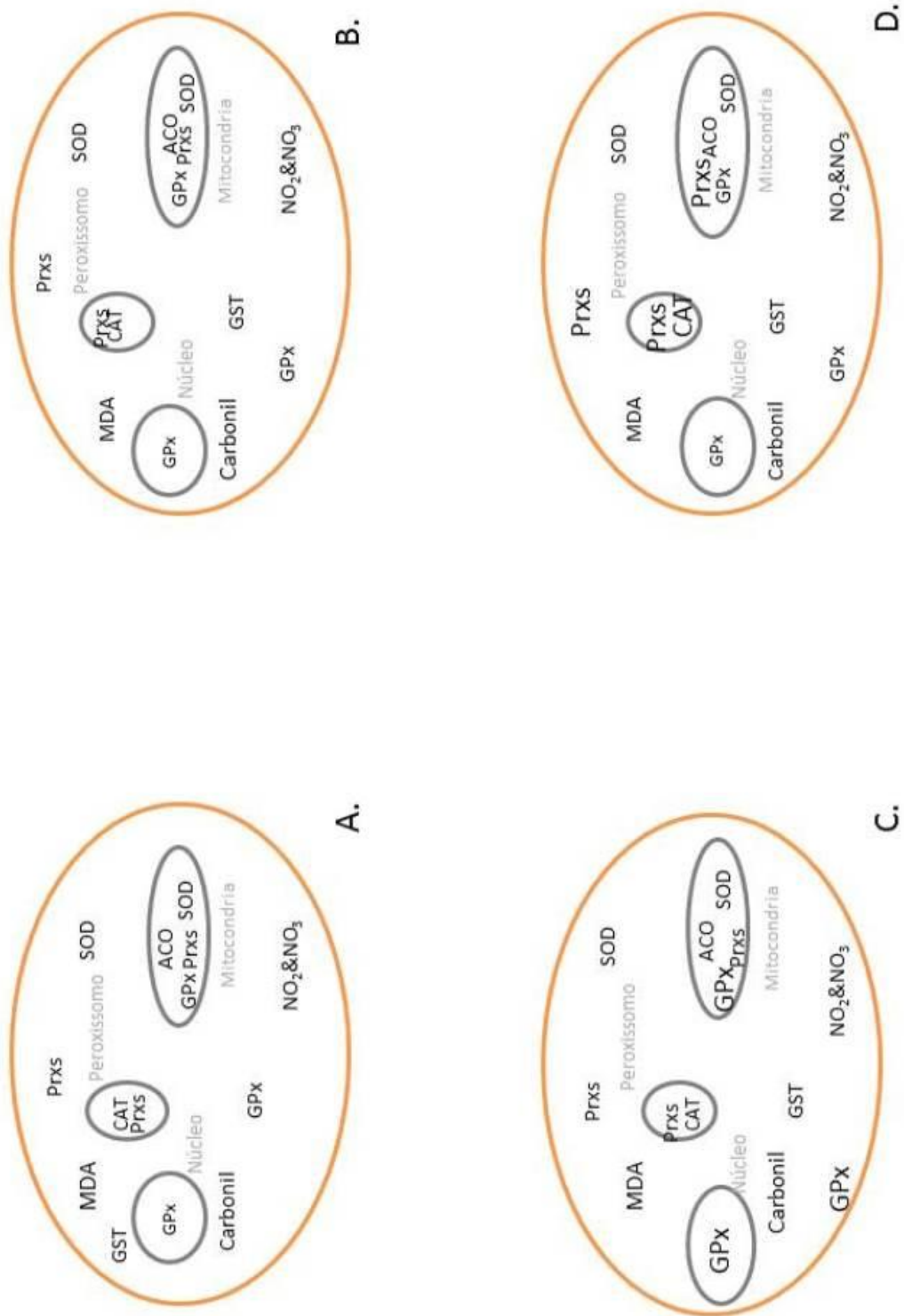
O óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) é rapidamente metabolizado a produtos estáveis, ou seja, nitrito e nitrato. Quando em presença de  $\text{O}_2$  forma  $\text{ONOO}^-$ , que promove a nitração das biomoléculas, incluindo resíduos de tirosina e tocoferol localizados nas membranas. Os níveis de  $\text{NO}^\bullet$  não variam ao longo do envelhecimento nos animais reprodutores, contudo nos animais não reprodutores há um aumento nos 24 meses. Nos animais não reprodutores também há uma correlação positiva desta medida com o MDA (65,9%). Durante a

peroxidação lipídica o  $\text{NO}^\bullet$  pode reagir com os peróxidos interrompendo a reação em cadeia, formando um composto peroxinitroso ou um peroxinitrito orgânico. Estes podem formar compostos mais estáveis ou propagar a reação, desta forma o papel do  $\text{NO}^\bullet$  na peroxidação lipídica ainda é controverso (Hogg e Kalyanaraman, 1999).

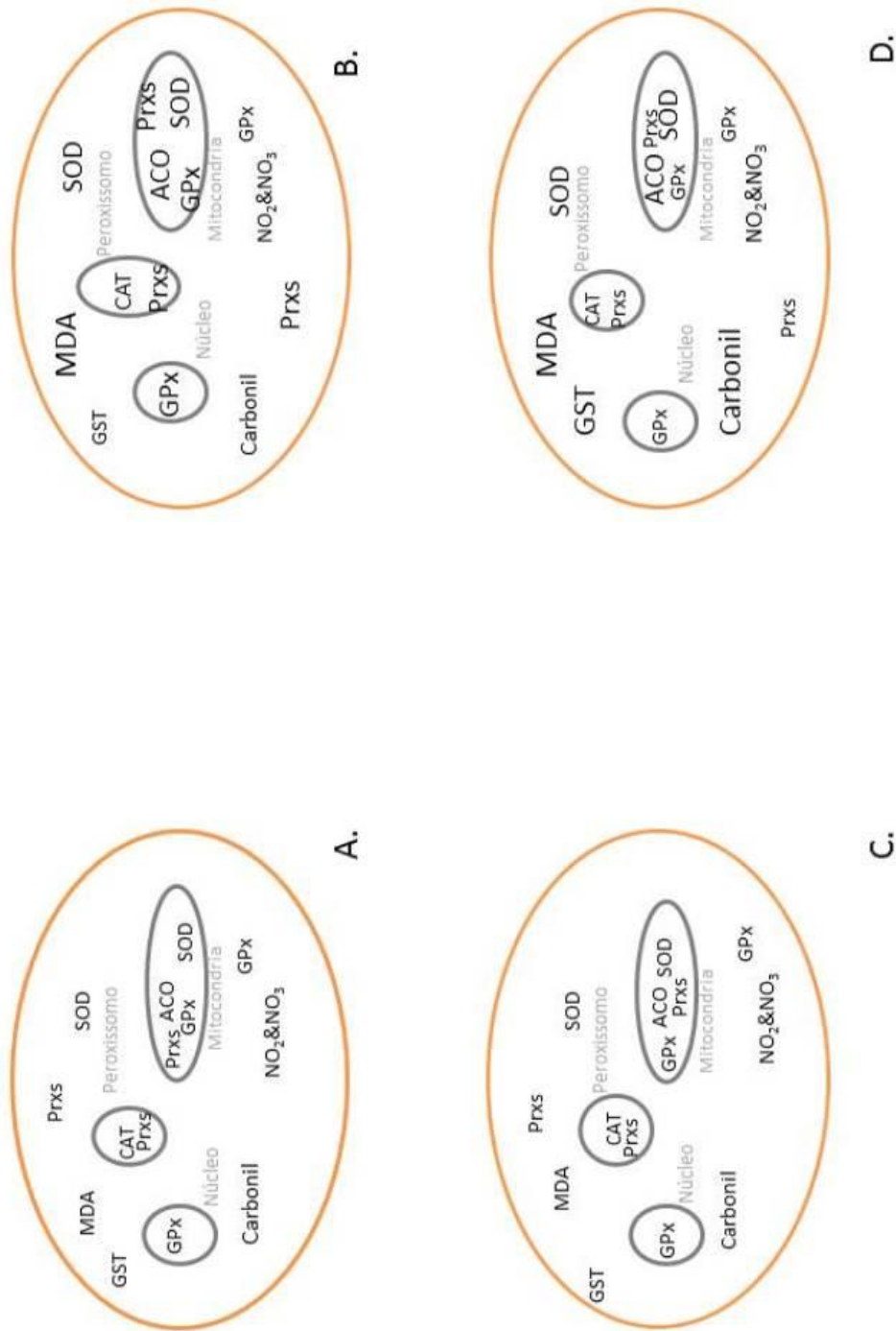
A vitamina E pode ser considerada o mais importante, embora não o único, inibidor da peroxidação lipídica *in vivo*. A vitamina E é essencial na dieta da maioria dos animais e o termo vitamina E é a designação nutricional comum de duas diferentes famílias de compostos que ocorrem na natureza: os tocoferóis e os tocotrienóis, que exibem, qualitativamente, a atividade biológica de vitamina E. Tocoferóis e tocotrienóis inibem a peroxidação lipídica através do sequestro do radical peroxila ( $\text{RO}_2$ ) formando o radical tocoferila, que será regenerado a tocoferol pelo ascorbato (Halliwell and Gutteridge 2007).

Ratos, ao contrário de humanos, sintetizam e armazenam Vitamina C no fígado (Gupta, Choudhur.Pk *et al.*, 1973). Em pH fisiológico (7,4) a maior parte da vitamina C encontra-se na forma de ascorbato, forma que atua como antioxidante. Em mamíferos o ascorbato atua como cofator para algumas enzimas, mas também atua como antioxidante de forma direta. A doação de um elétron pelo íon ascorbato resulta na formação do ânion radical ascorbila, pouco reativo. Além disso, atua em cooperação com a vitamina E, que atua como antioxidante lipofílico (Halliwell and Gutteridge 2007). Desta forma, estes dois antioxidantes não enzimáticos estão correlacionados negativamente nos animais reprodutores (-53,5%) sugerindo que a Vitamina C está sendo consumida para regenerar a Vitamina E, que por sua vez possivelmente está sendo recrutada para impedir a propagação da peroxidação lipídica.

De maneira geral, nossos resultados estão de acordo com dados recentes da literatura que demonstram que em fêmeas no pico da atividade reprodutiva animais não reprodutores apresentam maiores níveis de dano oxidativo do que os reprodutores (Garratt, Vasilaki *et al.*, 2011; Oldakowski, Piotrowska *et al.*, 2012). Esse resultado refuta a idéia de que a reprodução é custosa, ao menos do ponto de vista do estresse oxidativo, em fêmeas de mamíferos. Também é interessante ressaltar que os perfis encontrados diferem dos encontrados por nosso grupo em rins de ratos machos. Por exemplo, para os marcadores de dano oxidativo na idade de 6 meses, onde observou-se um aumento nos animais reprodutores, nas fêmeas o observado foi o oposto, aumento nos animais não reprodutores. As figuras 7 e 8 demonstram de forma ilustrativa as alterações que ocorrem nas células renais dos animais reprodutores e não reprodutores ao longo do envelhecimento respectivamente.



**Figura 7:** Representação esquemática das alterações observadas ao longo do envelhecimento nos rins de animais fêmeas reprodutoras: A. 3 meses, B. 6 meses, C. 12 meses e D. 24 meses. Letras maiores indicam aumento de atividade enzimática ou concentração dos marcadores



**Figura 8:** Representação esquemática das alterações observadas ao longo do envelhecimento nos rins de animais fêmeas não reprodutoras: A. 3 meses, B. 6 meses, C. 12 meses e D. 24 meses. Letras maiores indicam aumento de atividade enzimática ou concentração dos marcadores.



## **6. CONCLUSÃO**

Em longo prazo, como pode ser observado nos animais de 24 meses, a atividade reprodutiva não causa aumento nos marcadores de dano oxidativo em rins de ratas. As alterações nos perfis oxidativos encontradas não corroboram a ideia de que a reprodução é custosa para as fêmeas de mamíferos, ao menos no que diz respeito ao estresse oxidativo, em rins.

## 7. PERSPECTIVAS

A conclusão deste trabalho abre a possibilidade de que outros estudos sejam realizados para complementar o entendimento do impacto da atividade reprodutiva e do envelhecimento sobre o perfil oxidativo dos organismos. Entre estes podemos citar:

- ✓ Avaliar a longevidade associada à atividade reprodutiva em ratas fêmeas.
- ✓ Mensurar os marcadores de dano oxidativo e quantificar os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em diferentes partes do rim e em diferentes organelas.
- ✓ Estudar o estresse oxidativo, reprodução e envelhecimento em diferentes órgãos de ratos machos e fêmeas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. A.; CABELLI, D. E. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 263-274, Feb 2010. ISSN 1570-9639.

AEBI, H. CATALASE INVITRO. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126. 1984. ISSN 0076-6879.

ALABARSE, P. V. G. et al. Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 10, p. 773-780. Oct 2011. ISSN 0531-5565.

AUSTAD, S. N.; FISCHER, K. E. Mammalian aging, metabolism, and ecology - evidence from the bats and marsupials. **Journals of Gerontology**, v. 46, n. 2, p. 47-53. Mar 1991. ISSN 0022-1422.

AYDIN, S. et al. Comparison of oxidative stress biomarkers in renal tissues of D-galactose induced, naturally aged and young rats. **Biogerontology**, v. 13, n. 3, p.251-260. Jun 2012. ISSN 1389-5729.

BARBAS, C. et al. Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 1-2, p. 415-420. Aug 22 1997. ISSN 0021-9673.

BAYLIS, C. Sexual dimorphism in the aging kidney: differences in the nitric oxide system. **Nature Reviews Nephrology**, v. 5, n. 7, p. 384-396. Jul 2009. ISSN 1759-5061.

BEGUEL, J.-P. et al. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 63-71, Jan 2013. ISSN 1532-0456.

BERGERON, P. et al. The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. **Functional Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1063-1071. Oct 2011. ISSN 0269-8463.

BERKLEY, K. J. et al. Endometriosis-induced vaginal hyperalgesia in the rat: Effect of estropause, ovariectomy, and estradiol replacement. **Pain**, v. 132, Nov 2007. p. 150-159. ISSN 0304-3959.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 213-216. Aug 15 1997. ISSN 0021-9258.

BORRAS, C. et al. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 1,p. 205-211. Jan 2010. ISSN 0925-4439.

\_\_\_\_\_. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 248-254. Mar 1 2003. ISSN 0891-5849.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254. 1976. ISSN 0003-2697.

BREUSING, N. et al. Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 11-12, p. 748-753, Nov-Dec 2009. ISSN 0047-6374.

BUEMI, M. et al. Kidney aging: From phenotype to genetics. **Rejuvenation Research**, v. 8, n. 2, p. 101-109. 2005. ISSN 1549-1684.

CAKATAY, U. et al. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 51-55, Feb 2003. ISSN 0009-9120.

CANTU, D.; SCHAACK, J.; PATEL, M. Oxidative Inactivation of Mitochondrial Aconitase Results in Iron and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mediated Neurotoxicity in Rat Primary Mesencephalic Cultures. **Plos One**, v. 4, n. 9, Sep 18 2009. ISSN 1932-6203.

CHAPPELL, M. C.; WESTWOOD, B. M.; YAMALEYEVA, L. M. Differential effects of sex steroids in young and aged female mRen2.Lewis rats: A model of estrogen and salt-sensitive hypertension. **Gender Medicine**, v. 5, p. 65-75. 2008. ISSN 1550-8579.

COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. **Biochemical Journal**, v. 425, p. 313-325, Jan 15 2010. ISSN 0264-6021.

DE LOOF, A. Longevity and aging in insects: Is reproduction costly; cheap; beneficial or irrelevant? A critical evaluation of the "trade-off" concept. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 1, p. 1-11. Jan 2011. ISSN 0022-1910.

DEL VECCHIO, L.; LOCATELLI, F.; CARINI, M. What We Know About Oxidative Stress in Patients with Chronic Kidney Disease on Dialysis-Clinical Effects, Potential Treatment, and Prevention. **Seminars in Dialysis**, v. 24, n. 1, p. 56-64. Jan-Feb 2011. ISSN 0894-0959.

EHRENBRINK, G. et al. Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 4, p. 368-371. Apr 2006. ISSN 0531-5565.

GARRATT, M. et al. Tissue-dependent changes in oxidative damage with male reproductive effort in house mice. **Functional Ecology**, v. 26, n. 2, p. 423-433. Apr 2012. ISSN 0269-8463.

\_\_\_\_\_. Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 278, n. 1708, p. 1098-1106. Apr 7 2011. ISSN 0962-8452.

GOURLEY, B. L. et al. Cytosolic aconitase and ferritin are regulated by iron in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3227-3234, Jan 31 2003. ISSN 0021-9258.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase**, v. 268, p. 237-246. 1996. ISSN 0076-6879.

GUPTA, S. D.; CHOUDHUR.PK; CHATTERJ.IB. Synthesis of l-ascorbic-acid from d-glucurono-1,4-lactone conjugates by different species of animals. **International Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 21, p. 309-314. 1973. ISSN 0020-711X.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4th ed.Oxford University Press, Oxford, 2007.

HACKENHAAR, F. S. et al. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 6, p. 378-382. Aug 2009. ISSN 0263-6484.

HARMAN, D. AGING - A theory based on free-radical and radiation-chemistry. **Journals of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300. 1956. ISSN 0022-1422.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1411, n. 2-3, p. 378-384, May 5 1999. ISSN 0005-2728.

IQBAL A, PIPER M, FARAGHER RG, NAUGHTON DP, PARTRIDGE L, OSTLER EL. Chemical changes in aging *Drosophila melanogaster*. **Age**. v. 31, n. 4, p. 343-51. Dec. 2009 doi: 10.1007/s11357-009-9105-4.

IMAIZUMI, N.; MIYAGI, S.; ANIYA, Y. Reactive nitrogen species derived activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase. **Life Sciences**, v. 78, n. 26, 2998-3006. May 22 2006. ISSN 0024-3205.

KADIISKA, M. B. et al. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl4 poisoning. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 6, p. 711-718, Mar 15 2005. ISSN 0891-5849.

KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. **Lc Gc North America**, v. 22, p. 362-365. Jun 2004. ISSN 1527-5949.

KEELE, B. B.; MCCORD, J. M.; FRIDOVIC.I. Superoxide dismutase from *escherichia-coli*-b - a new manganese-containing enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 22, p. 6176-6182, 1970. ISSN 0021-9258.

KIMURA, H. et al. Dietary ascorbic-acid depresses plasma and low-density-lipoprotein lipid-peroxidation in genetically scorbutic rats. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 9, p. 1904-1909. Sep 1992. ISSN 0022-3166.

KIRKWOOD, T. B. L.; AUSTAD, S. N. Why do we age? **Nature**, v. 408, n. 6809, p.233-238. Nov 9 2000. ISSN 0028-0836.

KUMAR, V; ABBAS, AK; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2005.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478. 1990. ISSN 0076-6879.

LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1495-1502, Sep 2001. ISSN 0531-5565.

LI, G. et al. Association Between Age-Related Decline of Kidney Function and Plasma Malondialdehyde. **Rejuvenation Research**, v. 15, n. 3, p. 257-264. Jun 2012. ISSN 1549-1684.

MARGIS R, DUNAND C, TEIXEIRA FK, MARGIS-PINHEIRO M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. **FEBS Journal**. v.275, n. 15, p. 3959-70. Aug. 2008 ISSN: 1742-4658

MARKLUND, S. L.; HOLME, E.; HELLNER, L. Superoxide-dismutase in extracellular fluids. **Clinica Chimica Acta**, v. 126, n. 1, p. 41-51, 1982. ISSN 0009-8981.

MATT, D. W. et al. Characterization of attenuated proestrous luteinizing hormone surges in middle-aged rats by deconvolution analysis. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1477-1482. Dec 1998. ISSN 0006-3363.

MCCORD, J. M.; FRIDOVIC.I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6054, 1969. ISSN 0021-9258.

METCALFE, N. B.; ALONSO-ALVAREZ, C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 984-996. Oct 2010. ISSN 0269-8463.

MISRA, H. P.; FRIDOVIC.I. role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175. 1972. ISSN 0021-9258.

MLADENOV, M. et al. Evidence for the influence of vitamin C on age- and heat exposure-dependent deterioration of biochemical function in rat's liver and kidney. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, n. 8, p. 431-436. Dec 2008. ISSN 0306-4565.

MODLINGER, P. S.; WILCOX, C. S.; ASLAM, S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. **Seminars in Nephrology**, v. 24, n. 4, p. 354-365, Jul 2004. ISSN 0270-9295.

MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in**

**the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 28, p. 3331-3346, Oct 15 2009. ISSN 1570-0232.

MUSCI, G. et al. Nitrosative/oxidative modifications and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 6, p. 544-551. Jun 2006. ISSN 0047-6374.

OLDAKOWSKI, L. et al. Is reproduction costly? No increase of oxidative damage in breeding bank voles. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 11, p. 1799-1805. Jun 2012. ISSN 0022-0949.

PARTRIDGE, L.; BARTON, N. H. Optimality, mutation and the evolution of aging. **Nature**, v. 362, n. 6418, p. 305-311. Mar 25 1993. ISSN 0028-0836.

PERCY, C. J.; POWER, D.; LOBE, G. C. Renal ageing: Changes in the cellular mechanism of energy metabolism and oxidant handling. **Nephrology**, v. 13, n. 2, p. 147-152. Mar 2008. ISSN 1320-5358.

PEREZ-TORRES, I. et al. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. **Free Radical Research**, v. 43, n. 8, p. 761-771. 2009. ISSN 1071-5762.

PINTO, R. E.; BARTLEY, W. Effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. **Biochemical Journal**, v. 112, n. 1, p. 109-115. 1969. ISSN 0264-6021.

RAMARA, A. et al. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. **Brain Research**, v. 1176, p. 71-81. Oct 24 2007. ISSN 0006-8993.

RIZZO, A. et al. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 344-452. Apr 2012. ISSN 0936-6768.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. Control of progesterone secretion during estrous-cycle and early pseudopregnancy in rat - prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of corpus-luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, 1975. ISSN 0013-7227.

SPEAKMAN, J. R.; SELMAN, C. The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. **Bioessays**, v. 33, n. 4, p. 255-259, Apr 2011. ISSN 0265-9247.

STALEY, K.; SCHARFMAN, H. A woman's prerogative. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 6, Jun 2005. ISSN 1097-6256.

TEIXEIRA, H. D.; SCHUMACHER, R. I.; MENEGHINI, R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, Jul 7 1998. ISSN 0027-8424.

VAN RAAMSDONK, J. M.; HEKIMI, S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 15, p. 5785-90. Apr 10 2012. ISSN 0027-8424.

VINA, J. et al. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. **Febs Letters**, v. 579, n. 12, p. 2541-2545. May 9 2005. ISSN 0014-5793.

\_\_\_\_\_. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression - Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 111-119. Feb 2006. ISSN 1071-5762.

VINA, J.; HEMS, R.; KREBS, H. A. Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. **Biochemical Journal**, v. 170, n. 3, p. 627-630, 1978. ISSN 0264-6021.

VINA, J. et al. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. **Free Radical Research**, v. 40, n. 12, p. 1359-1365. Dec 2006.

WESTWOOD, F. R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 375-384 Apr 2008. ISSN 0192-6233.

WHITE, C. R. et al. Estrogen restores endothelial cell function in an experimental model of vascular injury. **Circulation**, v. 96, n. 5, p. 1624-30. Sep 2 1997. ISSN 0009-7322.

YANG, H.; FOGO, A. B. Cell Senescence in the Aging Kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 9, p.2380-2388. Sep 2010. ISSN 1046-6673.



ANEXOS

Parecer do Comitê de ética da UFRGS



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CARTA DE APROVAÇÃO

proXpesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2007831

**Título :** Determinação das Defesas Antioxidantes e Dano Oxidativo em Ratos Reprodutores e Não Reprodutores

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
MARA DA SILVEIRA BENFATO	PESQ RESPONSÁVEL	mara.benfato@ufrgs.br	33087754
FERNANDA SCHÄFER HACKENHAAR	PESQUISADOR	fernanda.hackenhaar@ufrgs.br	
PAULO VINICIUS GIL ALABARSE	PESQUISADOR	00142030@ufrgs.br	
TIAGO BOEIRA SALOMON	PESQUISADOR	tbsalomon@hotmail.com	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 26 , ata nº 106 , de 8/5/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quarta-feira, 28 de maio de 2008

  
ILMA SIMONI BRUM DA SILVA  
Coordenador do CEP-UFRGS

## Curriculum Vitae

### Dados pessoais

**Nome** Ana Carolina Almeida da Silva  
**Filiação** José Jonei Reis da Silva e Ângela Margarete Almeida da Silva  
**Nascimento** 22/09/1987 - Caxias do Sul/RS - Brasil  
**Carteira de Identidade** 6099218131 sjs - RS - 20/11/2003  
**CPF** 013.294.960-19

**Endereço residencial** Josefina Corsetti  
Petrópolis - Caxias do Sul  
95070-640, RS - Brasil  
Telefone: 054 32123905  
Celular: 051 82830843

**Endereço profissional** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências  
Av. Bento Gonçalves, 9500  
Agronomia - Porto Alegre  
91501-970 RS - Brasil  
Telefone: 51 33087372

### Endereço eletrônico

E-mail para contato : a.carolina\_almeida@yahoo.com.br

### Formação acadêmica/titulação

**2011** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Estresse oxidativo e envelhecimento em ratos reprodutores e não reprodutores

Orientador: Mara Benfato

**2005 - 2010**      Graduação em Farmácia.  
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil  
Título: Anticorpos Monoclonais na Terapêutica da Psoríase  
Orientador: Ana Paula Franco Lambert

### **Formação complementar**

**2011 - 2011**      Curso de curta duração em Treinamento em: Operação do Sistema HPLC.  
Scientific Instruments Co., SINC, Brasil

**2011 - 2011**      Curso Intensivo de SPSS – Módulo Básico.  
Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brasil

**2009 - 2009**      Francês Básico I.  
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

**2009 - 2009**      Curso de curta duração em Técnicas de Laboratório de Análises Clínicas.  
Sociedade Incubadora Tecnológica de Caxias do Sul, ITEC, Caxias Do Sul,  
Brasil

**2008 - 2008**      Extensão universitária em Workshop de Hematologia.  
Hospital Universitário de Coimbra, HUC, Portugal

### **Atuação profissional**

**1.      Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS**

**Vínculo institucional**

**2011 - 2011** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Tutora a distância,  
Carga horária: 20, Regime: Parcial

**2. Panvel Farmácias - PANVEL**

**Vínculo institucional**

**2012 - 2012** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutica,  
Carga horária: 44, Regime: Integral

**3. Universidade do Porto - U.PORTO**

**Vínculo institucional**

**2009 - 2009** Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga  
horária: 30, Regime: Parcial

**4. Hospital Nossa Senhora da Conceição - GHC**

**Vínculo institucional**

**2010 - 2010** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga  
horária: 40, Regime: Integral

**5. Universidade de Caxias do Sul - UCS**

**Vínculo institucional**

- 2009 - 2010** Vínculo: Bolsa, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2006 - 2007** Vínculo: Bolsa, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Parcial

### **Áreas de atuação**

- 1.** Bioquímica
- 2.** Biologia Molecular
- 3.** Biofísica

### **Idiomas**

**Inglês** Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem

**Espanhol** Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

**Francês** Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

### **Produção**

#### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. SILVA, A. C. A., LAMBERT, A. P. F.

Anticorpos monoclonais na terapêutica da psoríase. Revista Eletrônica de Farmácia. , v.8, p.41 - 58, 2011.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. **SILVA, A.C.A.**, SALOMON T B, Hackenhaar F S, ALABARSE, P. V. G, Schuller A K , PUTTI, J S, BEHLING C S, BENFATO, M S Estresse Oxidativo em Rins de Ratas Reprodutoras ao Longo do Envelhecimento In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012, Porto Alegre. **Livro de Resumos-XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2012.

2. **SILVA, A.C.A.**, SALOMON T B, T M Medeiros, Hackenhaar F S, ALABARSE, P. V. G, Schuller A K , PUTTI, J.S., BEHLING, C.S., BENFATO, M S Estresse Oxidativo em Rins de Ratas Reprodutoras ao longo do Envelhecimento In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre. **Livro de Resumos-XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2011. p.09 - 09

3. **SILVA, A.C.A.**, ALABARSE, P. V. G, T M Medeiros, Hackenhaar F S, Schuller A K , EHRENBRINK G, BENFATO, M S Oxidative damage and non-enzymatic defences in the kidney of reproductive male rats during aging In: VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro. **Free Radicals Brazil 2011.** , 2011. p.82 - 83

### **Apresentação de trabalho e palestra**

1. PUTTI, J S, **SILVA, A.C.A.**, SALOMON T B, BEHLING C S **OXIDATIVE STRESS IN THE KIDNEY OF FEMALE RATS WITH OR WITHOUT REPRODUCTIVE ACTIVITY DURING AGING**, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. **SILVA, A.C.A., BENFATO, M S Tutoria a distância na disciplina de Biofísica para a Nutrição**, 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
  
3. **SILVA, A. C. A., ALABARSE, P. V. G, T M Medeiros, Hackenhaar F S, Schuller A K , EHRENBRINK G, BENFATO, M S Oxidative damage and non-enzymatic antioxidant defences in the kidney of reproductive male rats during aging**, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
  
4. **SILVA, A.C.A., Andrade, L.B., Echeverrigaray, S. Desinfestação e morfogênese in vitro das Begônias Híbrida (B. hydrocotilifolia x B. manicata) e Begonia rex cv Nuvem de Prata**, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
  
5. **SILVA, A.C.A. Toxicologia Forense: Perspectivas e Desafios Profissionais - Relato de experiência**, 2010. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
  
6. **SILVA, A. C. A., CARRAU, J. L. Prospecção de antagônicos ao patógeno Glomerella cingulata (rip-rot) em uvas da região serrana e da fronteira-oeste do Rio Grande do Sul**, 2007. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

#### **Educação e Popularização de C&T**

##### **Apresentação de trabalho e palestra**

1. **SILVA, A. C. A., ALABARSE, P. V. G, T M Medeiros, Hackenhaar F S, Schuller A K , EHRENBRINK G, BENFATO, M S Oxidative damage and non-enzymatic antioxidant defences in the kidney of reproductive male rats during aging**, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

#### **Eventos**

## **Eventos**

### **Participação em eventos**

1. **VII Meeting of the SFRBM South American Group**, 2011. (Congresso)
2. Apresentação de Poster / Painel no **XX Congresso Pan-americano de Farmacia**, 2010. (Congresso) Atividade antimicrobiana e avaliação fitoquímica de extratos de Begonia (*B. hydrocotylifolia* x *B. manicata*).
3. **Encontros Científicos de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Coimbra**, 2008. (Encontro)
4. **Semana Acadêmica de Farmácia**, 2005. (Seminário)