

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia da UFRGS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estresse oxidativo e envelhecimento no encéfalo de ratos machos
reprodutores

Dissertação de Mestrado

Paulo Vinicius Gil Alabarse

Porto Alegre
2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Centro de Biotecnologia da UFRGS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biofísica
Laboratório de Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo e envelhecimento no encéfalo de ratos machos
reprodutores

Paulo Vinicius Gil Alabarse

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.

Professora Orientadora: Mara S. Benfato

Porto Alegre
2011

"Escuta e serás sábio. O começo
da sabedoria é o silêncio."
Pitágoras.

AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Estresse Oxidativo:.....	11
1.1.1. Defesas Antioxidantes:.....	14
1.1.1.1. Defesas Enzimáticas:	14
1.1.1.1.1. Superóxido Dismutase:	14
1.1.1.1.2. Glutaciona Peroxidase:.....	15
1.1.1.1.3. Catalase:.....	15
1.1.1.1.4. Glutaciona S-Transferase:	16
1.1.1.2. Defesas Não-Enzimáticas:.....	16
1.1.1.2.1. Glutaciona:.....	16
1.1.1.2.2. Vitamina C:.....	16
1.1.1.2.3. Vitamina E:.....	18
1.1.2. Dano Oxidativo:.....	18
1.1.2.1. Peroxidação Lipídica:	19
1.1.2.2. Dano em Proteínas:.....	20
1.1.2.2.1. Carbonilação:.....	20
1.1.2.2.2. Nitração e Nitrosilação:	21
1.1.2.2.3. Inativação Enzimática:	21
1.2. Reprodução:	23
1.2.1. Reprodução e Estresse Oxidativo:.....	23
1.2.3. Reprodução, Regulação Hormonal e Estresse Oxidativo:	24
1.3. Envelhecimento:	25
1.4. Encéfalo:.....	26
1.4.1. Encéfalo e Reprodução:.....	26
1.4.2. Encéfalo, Reprodução e Estresse Oxidativo:.....	27
2. OBJETIVO.....	31
2.1. Objetivos Específicos:.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1. Artigo Científico:.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTARES	42
4.1. Detalhamento da Criação dos Animais:.....	42
4.2. Ensaio Complementares:.....	43
4.2.1. Ensaio da Capacidade Oxidante Total no Encéfalo:	43
4.2.2. Ensaio de Vit E no Encéfalo:.....	43
4.2.3. Padronização:	43
4.3. Análise Estatística:.....	44
5. RESULTADOS COMPLEMENTARES	45
5.1. TOS no Encéfalo:.....	45
5.2. Vit E no Encéfalo:	45
5.3. Correlações:	46
6. DISCUSSÃO COMPLEMENTAR	48
6.1. Hormônios Sexuais Esteróides:.....	48
6.1.1. Envelhecimento:.....	48
6.1.2. Atividade das Enzimas Antioxidantes:.....	50
6.2. Metabolismo:	51
6.2.1. Metabolismo Elevado Gerador de EROs:	53

6.3. Antioxidantes Não-Enzimáticos:	55
6.3.1. Vitamina C:.....	55
6.3.2. Glutathiona:.....	55
6.3.3. Vitamina E:.....	55
6.4. Dano Oxidativo:	56
6.4.1. NO ₂ &NO ₃ :	57
6.4.1.1. NO [•] e Peroxidação Lipídica:.....	57
6.4.2. Carbonil e Envelhecimento:.....	58
6.4.3. Ativação da GST:	59
6.5. Envelhecimento e Reprodução:.....	59
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
8. PERSPECTIVAS	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
10. ANEXO 1 Tabela Complementar 1.....	74
11. ANEXO 2 Currículo Vitae	76
12. ANEXO 3 Parecer do Comitê de Ética:	83

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Mara Benfato, pela oportunidade oferecida desde a graduação, pela experiência aplicada, pela confiança e pelos 5 anos de dedicação.

Aos meus colegas de laboratório, pelo auxílio desde a parte prática até a vida pessoal, tanto os que passaram – Max, Marcus, Paula, Valentina, Marina, e tantos outros que merecem agradecimento –, quanto os que permanecem – Fernanda, Tássia, Ártur, Cleber, Giordana, Gabriela, Tiago.

Aos meus professores, que moldaram a minha formação, trouxeram sabedoria e me capacitaram; em especial aos professores: Tarso Kist, Guido Lenz, Jorge Quillfeldt e Célia Carlini.

A Fernanda Stanisçuaski, que fez excelentes colocações após a correção da minha redação.

Aos laboratórios que abriram as portas – LPBNC, LAPROTOX, LAPEP, LABSINAL, Laboratório de Fisiologia Vegetal, LIASA –, os chefes e orientados destes laboratórios, pelo benefício direto, desde o empréstimo de um reagente até a dedicação e ensino, a oferecer precioso tempo sem nada solicitar em retorno.

Aos laboratórios que fecharam suas portas, pelo aprendizado de que nem tudo pode estar ao meu alcance e que a vida não é tão fácil.

Aos meus amigos do CLJ, em especial o meu irmão em Cristo Jin, a Anna, a Letícia, a Hanna, a Kali, o Felipe, a Vanessa, por acompanhar minha formação espiritual, filosófica e intelectual, exigiram o máximo de minha dedicação, e puseram à prova muitas de minhas escolhas.

Aos meus amigos da graduação, em especial a Vivian, que ajudou na correção da minha redação, ao Rafael, e todos os outros, que me deram todo o apoio em cada etapa, trouxeram momentos essenciais de conhecimento e descontração.

Aos meus amigos do kung fu, o Mestre Rafael, o Roberto, o Rafael, o Pedro e todos os colegas de treino, e a prática deste em si, que me deram as pancadas necessárias para manter a cabeça no lugar, mantiveram o desenvolvimento saudável do meu corpo em equilíbrio com o desenvolvimento de minha mente, e quebrou minha rotina semanal.

Aos meus amigos da Dança, que partilharam momentos de estresse e a oportunidade única de partilhar os palcos, a facilitar ainda mais minha desenvoltura em público, e também quebrou minha rotina semanal.

Aos meus amigos da “rua”, da redenção e remanescentes do colégio Santa Rosa de Lima, que me deram todo o apoio para a formação que decidi conquistar.

E, por último, a minha família, por tudo que foram e são, por tudo que sou e serei, pelo apoio e educação direcionados a uma formação completa, sem nunca colocar empecilhos, e sempre me amando.

LISTA DE ABREVIATURAS

Absorbância – comprimento de onda	$A_{\text{no. nm}}$
Ácido ascórbico/vitamina C	Vit C
Aconitase	ACO
Mitocondrial	mACO
Citosólica	cACO
Alfa-tocoferol/vitamina E	Vit E
Cadeia transportadora de elétrons	CTE
Capacidade oxidante total	TOS
Catalase	CAT
Elemento responsivo ao ferro	IRE
Elemento responsivo antioxidante	ARE
Espécies reativas de oxigênio	EROs
Glutathiona	GSH
Glutathiona conjugada à proteína inativa	GS-Pi
Glutathiona oxidada	GSSG
Glutathiona peroxidase	GPx
Glutathiona S-transferase	GST
Glutathiona total	GSht
Gulonolactona	GLL
Gulonolactona oxidase	GLx
Lactato desidrogenase	LDH
Malondialdeído	MDA
NAD(P)H Oxidoreductase	NOX
Nitratos e nitritos	$\text{NO}_2\&\text{NO}_3$

Proteína		P	
Proteína inativa		Pi	
Proteína transportadora de alfa-tocoferol		α -TTP	
Proteína transportadora de fosfolípidos		PLTP	
Radical ascorbil		Vit C [•]	
Radical glutationa		GS [•]	
Radical tocoferil		Vit E [•]	
Receptor de Antioxidantes classe B tipo I		SR-BI	
Receptor de transferrina		TfR	
Receptor de vitamina E		rVE	
Superóxido dismutase		SOD	
	Cobre/Zinco	SOD1	CuZnSOD
	Extracelular	SOD3	EC-SOD
	Manganês	SOD2	MnSOD
Sistema nervoso central		SNC	
Transportador de vitamina C sódio-dependente		SVCT	

RESUMO

Título: Estresse oxidativo e envelhecimento no encéfalo de ratos machos reprodutores.

A reprodução é capaz de alterar muitos parâmetros relacionados à fisiologia, ao comportamento e à morfologia em vertebrados machos. Trabalhos apresentam relação entre reprodução ou envelhecimento com estresse oxidativo, não havendo trabalho relacionando estresse oxidativo, reprodução e envelhecimento simultaneamente em mamíferos. Para avaliar o estresse oxidativo no encéfalo de ratos machos decorrente da atividade reprodutiva e ao longo do envelhecimento (3, 6, 12 e 24 meses) comparado a animais sem atividade reprodutiva (n = 10 por grupo e por idade), avaliou-se a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, glutathione S-transferase); os níveis de moléculas antioxidantes (glutathione oxidada e reduzida, vitamina C e E); os marcadores de dano oxidativo (peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, nitritos e nitratos), bem como o *status* oxidante total e a atividade da enzima metabólica aconitase no encéfalo, e os níveis de testosterona e estradiol no soro. ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey, foi utilizado para avaliar a diferença estatística entre os grupos. Correlação de Spearman e Regressão Linear (método *stepwise*) foram utilizadas para avaliar alterações relacionadas entre os parâmetros. Os animais machos com atividade reprodutiva apresentaram elevada concentração de testosterona e atividade da aconitase, sugerindo um metabolismo mais elevado que os sem atividade reprodutiva. A atividade das enzimas antioxidantes e a quantidade de moléculas antioxidantes também foram mais elevadas em diversos grupos de animais reprodutores, mas o dano oxidativo mais elevado também foi observado nesses grupos de animais reprodutores. Alterações relacionadas ao envelhecimento foram observadas em ambos os grupos, não havendo padrão. Observou-se elevada atividade das enzimas antioxidantes, bem como maiores danos, no grupo dos animais reprodutores de 6 meses. Nos animais mais velhos (24 meses), observam-se similares níveis dos marcadores de dano oxidativo, atividade de algumas enzimas antioxidantes e de moléculas antioxidantes entre os grupos. Do complexo emaranhado de correlações e regressões observado nesse sistema, destaca-se a influência do envelhecimento nos níveis de testosterona, nitritos e nitratos e na atividade das enzimas aconitase, catalase e glutathione S-transferase (coeficiente padronizado B = -0,53; -0,31; -0,39; -0,78 e 0,23, respectivamente). Os níveis de testosterona se correlacionaram positivamente com diversos parâmetros: catalase 73%, superóxido dismutase 71%, peroxidação lipídica 43%, nitritos e nitratos 50%, aconitase 46% e aconitase reativada 47%. Sugere-se que a atividade reprodutiva eleva o metabolismo, tanto por estímulo hormonal quanto por outras alterações, e.g. alteração comportamental, levando a elevada produção de espécies reativas, causando dano oxidativo e elevando a atividade e a quantidade das defesas antioxidantes. Esses resultados auxiliam na compreensão das alterações causadas pela reprodução relacionadas ao envelhecimento em nível de estresse oxidativo, e sugere bases para explicar os custos relacionados à reprodução.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes, dano oxidativo, reprodução.

ABSTRACT

Title: Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging.

Reproduction causes changes in male vertebrates, including morphological, behavioral, and physiological alterations. Reproduction and aging may alter oxidative stress, but there is no research concerning oxidative stress and reproduction during aging in mammals. We performed a comprehensive study to examine oxidative stress in the brains of male rats with (experienced) or without (naïve) reproductive activity during aging (3, 6, 12, and 24 months of age). Oxidative stress was assessed by measuring the antioxidant enzymes activity (catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase), the amount of non-enzymatic compounds (reduced and oxidized glutathione, vitamin C and E), the levels of oxidative damage markers (lipid peroxidation, protein carbonylation, nitrite and nitrate) as well as total oxidant status, and the aconitase metabolic enzyme activity in brain, and the levels of testosterone and estradiol in serum. ANOVA, followed by Tukey *post hoc*, was used to analyze statistical differences among groups. Spearman Correlation and Linear Regression (stepwise method) were used to analyze relation among parameters. Reproductively active animals exhibited increased testosterone levels and aconitase activity, suggesting an increased metabolism. Despite the increased antioxidant enzyme activities and increased levels of antioxidant compounds were observed, damage to biomolecules was also observed in experienced rats. During aging changes in oxidative stress were observed in all groups, but no pattern was observed. We found higher activities of antioxidant enzymes, higher amounts of antioxidants, contrasting with higher damage at six months of age between experienced than naïve animals. Some similarities were found in antioxidant activities and levels, and damage between the groups at twenty-four months of age. Correlations and regressions show a very complex web of interactions among the parameters. Aging exerted influence in testosterone, nitrites and nitrates levels, in the aconitase, catalase, and glutathione S-transferase activities (adjusted B value of = -0.53; -0.31; -0.39; -0.78; and 0.23, respectively). Testosterone levels positively correlated with: catalase 73%, superoxide dismutase 71%, lipid peroxidation 43%, nitrites and nitrates 50%, aconitase 46%, and reactivated aconitase 47%. We suggest that reproductive activity increases metabolism, by hormonal stimuli as by others factors, e.g. behavioral change, and this changes lead to increased production of reactive species, which lead to oxidative damage and increases the antioxidant enzymes activity and non-enzymatic amount. These results add comprehensive data regarding changes in oxidative stress during aging, and suggest an explanation for the costs of reproduction.

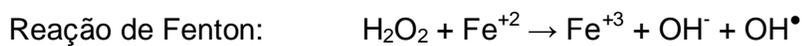
Key-words: Antioxidant enzymes, oxidative damage, reproduction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse Oxidativo:

Da complexidade de reações químicas possíveis aos seres vivos, algumas reações são indesejáveis ao consumir reagentes importantes e/ou dar origem a produtos que podem ser inutilizáveis, tóxicos ou neutros. Uma série de reações de oxidação e redução é considerada prejudicial por causar alterações físico-químicas a moléculas importantes, alterando a funcionalidade original.

A formação e reação de espécies reativas são amplamente estudadas, muitas vezes equivocadamente ditas como prejudiciais ao apresentar importante papel na sinalização (RUBBO & RADI, 2008). As mais comuns espécies reativas são relacionadas ao oxigênio e ao nitrogênio. O radical mais reativo é o radical hidroxila (OH^\bullet ; potencial de redução de 2,31V a pH 7), geralmente formado pela Reação de Fenton (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007):



O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reage com ferro e há a abstração de um elétron deste, decompondo o H_2O_2 em ânion hidroxila (OH^-) e radical hidroxila (OH^\bullet). A formação de radicais livres pela Reação de Fenton pode ocorrer principalmente com ferro e cobre, mas também ocorre com níquel, cromo e cádmio (MUSCI *et al.*, 2006).

O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é um radical que possui baixa reatividade com a maioria das moléculas biológicas, mas uma reatividade maior com grupamentos tiol e muito elevada com metais, e.g. cobre, ferro e manganês

(ABREU & CABELLI, 2010). Geralmente é gerado na Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) da mitocôndria, por vazamento de elétrons (HALLIVEL & GUTTERIDGE, 2007). Este radical é capaz de reagir com grupamento ferro-enxofre de enzimas, e.g. aconitase (ACO), inativando-as (ABREU & CABELLI, 2010).

O $O_2^{\bullet-}$ pode dar origem ao H_2O_2 , que é uma espécie reativa de oxigênio muito estável, capaz de se difundir com grande facilidade, e possui papel na sinalização e oxidação (LINNANE *et al.*, 2007). Estudos recentes sugerem que o H_2O_2 só pode se difundir através das membranas por poros similares às aquaporinas (BIENERT *et al.*, 2007), ainda sendo controverso.

O óxido nítrico (NO^{\bullet}) é um radical que possui capacidade de difusão através de membranas e possui longa vida biológica. A enzima óxido nítrico sintetase é uma das principais fontes deste radical, produzindo-o a partir da arginina. O peroxinitrito ($ONOO^-$; Reação 2) é a espécie reativa de nitrogênio de maior importância biológica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007):



O NO^{\bullet} reage com o $O_2^{\bullet-}$ formando o $ONOO^-$. Sugere-se que essa reação ocorra no interior da mitocôndria e que esta seja o principal alvo de modificações por essa espécie (RUBBO & RADI, 2008).

Nitração e nitrosilação são reações relacionadas a espécies reativas de nitrogênio (HALLIVEL & GUTTERIDGE, 2007; RUBBO & RADI, 2008). A nitração ocorre quando um NO_2 (nitro) reage irreversivelmente com alguma molécula; já a nitrosilação, quando um NO (nitroso) reage de forma reversível com grupamentos tiol ou metais (HALLIVEL & GUTTERIDGE, 2007).

O papel do NO• na sinalização do sistema nervoso foi descoberto em 1988 (GARTHWAITE *et al.*, 1988). Uma vez que este possui facilidade de difusão tanto no meio aquoso quanto através de membranas, é amplamente estudado (GARTHWAITE & BOULTON, 1995).

Enzimas de vias de oxidação e redução evoluíram para defender o organismo e controlar a quantidade de espécies reativas, realizando a manutenção das possíveis modificações químicas iniciadas por estas moléculas (McINTYRE *et al.*, 1999). Em meios biológicos, as modificações químicas relacionadas à sinalização são aquelas que iniciam uma resposta celular, direta ou indireta, a partir da formação de uma molécula ligada a este radical (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007; RUBBO & RAD, 2008).

Passamos a considerar, então, dano oxidativo como todo o tipo de modificação molecular, reversível ou não, com importância biológica deletéria que possa: desestruturar proteínas, modificando sua função; desestruturar enzimas, alterando sua atividade; modificar bases nitrogenadas e seus compostos, e.g. DNA e RNA, alterando significativamente a informação codificada; alteração de outras moléculas, como fosfolipídios de membrana, desestruturando organelas, membrana plasmática, etc.; e outros. Esse conceito de dano está fortemente relacionado à quantidade, por passar do nível de modificação para sinalização para as desestruturações e/ou formação de aglomerados moleculares, podendo levar à morte celular programada ou até necrose tissular (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007; RUBBO & RAD, 2008). Uma molécula aqui definida como modificada, ainda pode servir na sinalização.

A partir das defesas e danos oxidativo, pode-se compreender o que seria o estresse oxidativo, como algo tênue e sensível, que se altera com o

tempo, com o estado biológico e com influências externas, podendo-se simplificar como a quebra dinâmica do equilíbrio entre as defesas antioxidantes e as diferentes espécies reativas.

1.1.1. Defesas Antioxidantes:

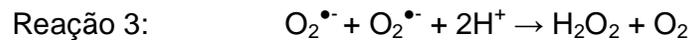
Muitas são as defesas antioxidantes dos organismos, sendo separados em dois grandes grupos: as defesas enzimáticas e as não-enzimáticas. Das defesas enzimáticas, as mais estudadas são: a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST); já as defesas não-enzimáticas são: a glutathione (GSH), o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol, e outras vitaminas.

1.1.1.1. Defesas Enzimáticas:

1.1.1.1.1. Superóxido Dismutase:

A função da enzima SOD foi definida por McCord e Fridovich, em 1969, sendo uma enzima capaz de catalisar a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em oxigênio e H_2O_2 (Reação 3) utilizando um átomo de cobre em seu sítio ativo (SOD cobre-zinco; McCORD & FRIDOVICH, 1969). Esta enzima é encontrada em mamíferos distribuída em meio intra- e extracelular. No meio intracelular, há a enzima SOD nas mitocôndrias e no citosol. A SOD mitocondrial é uma enzima tetramérica contendo um átomo de Manganês em seu sítio ativo (conhecida como SOD2 ou MnSOD), inicialmente descoberta por Keele, em 1970 (KEELE *et al.*, 1970). A enzima SOD citosólica é uma enzima dimérica que possui um íon Cobre e um íon Zinco em seu sítio ativo (conhecida como SOD1 ou CuZnSOD). No meio extracelular há apenas um tipo de enzima SOD, sendo

uma enzima tetramérica similar a CuZnSOD (conhecida como SOD3 ou EC-SOD), descoberta por Marklund, em 1982 (MARKLUND, 1982).



1.1.1.1.2. Glutathione Peroxidase:

A enzima GPx em mamíferos representa uma família de enzimas de mesma função e é distinta para diferentes órgãos. A GPx1 se encontra no interior celular e é a forma encontrada no encéfalo. A família da enzima GPx possui um átomo de selênio em seu sítio ativo e possui a capacidade de degradar peróxidos no organismo (Reação 4; HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007):



O peróxido ligado a um grupamento (R) pode ser degradado via GPx utilizando duas moléculas de glutathione reduzida (GSH), oxidando em glutathione oxidada (GSSG). A GSSG pode ser reduzida pela enzima glutathione reductase (Reação 5; HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007):



1.1.1.1.3. Catalase:

A enzima CAT é especializada em decompor o H_2O_2 (Reação 6). A CAT é uma enzima tetramérica que possui um grupo heme no sítio ativo de cada subunidade e um íon ferro em cada heme. Ela se localiza no interior do peroxissomo, degradando apenas o H_2O_2 produzido nesta organela e podendo haver vazamento desta molécula para o citosol (HALLIWEL, 1974).



1.1.1.1.4. Glutathione S-Transferase:

A enzima GST pode possuir duas principais funções: como enzima detoxificadora de segunda ordem agindo sobre xenobióticos e como enzima GPx degradando peróxidos orgânicos, utilizando GSH. Sua atividade como GPx se diferencia das outras peroxidases por não possuir atividade sobre o H₂O₂ (MATSUMOTO *et al.*, 2000; HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007). Existem muitas famílias que codificam as GSTs em animais (sendo: α, ζ, μ, π, ω, σ e θ), geralmente estruturada como uma proteína dimérica codificada com duas subunidades da mesma família (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007).

1.1.1.2. Defesas Não-Enzimáticas:

1.1.1.2.1. Glutathione:

A glutathione é um tri peptídeo formado por glicina, cisteína e ácido glutâmico. A síntese ocorre no citoplasma pelas enzimas glutamato-cisteína ligase e pela glutathione sintetase. Essa molécula encontra-se em altas concentrações nos órgãos (2 mM no encéfalo, 8 mM no fígado), sendo considerada a defesa antioxidante não-enzimática celular de maior importância (potencial de redução biológico de aproximadamente -250 V). O grupamento tiol da cisteína é capaz de reagir degradando diversas moléculas oxidantes (Fig. 1).

1.1.1.2.2. Vitamina C:

A vitamina C (Vit C; ácido ascórbico) é um antioxidante que é sintetizado por maioria dos mamíferos, exceto humanos e cobaias, que a adquirem apenas pela dieta (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007). Tanto nas mitocôndrias como

no citosol, a Vit C é utilizada para degradar as espécies reativas de oxigênio (EROs; Fig. 2; KONDO *et al.*, 2008).

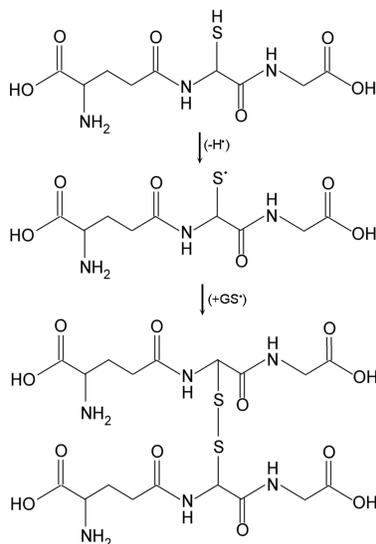


Fig. 1 – Estruturas e reações de oxidação da glutatona. A glutatona pode sofrer oxidação, pela abstração de um hidrogênio, formando o radical glutatona (GS^{\bullet}); tratando-se de um composto em grande concentração no citosol, torna-se provável o encontro e reação de dois radicais glutatona, formando glutatona oxidada, ou por via enzimática.

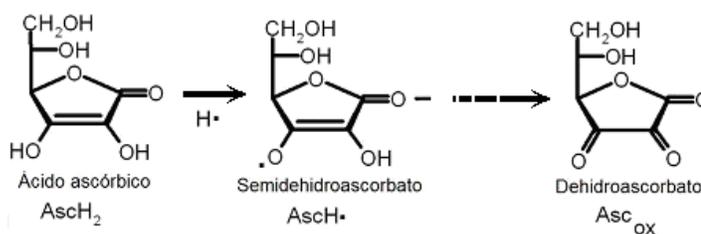


Fig. 2 – Estruturas e reações de oxidação da vitamina C. O ácido ascórbico pode sofrer reação com alguns radicais (como $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}), através da doação de um elétron, formando o composto semidehidroascorbato e um não-radical; apesar de pouco reativo, o composto semidehidroascorbato pode continuar a oxidar, formando o dehidroascorbato e produtos subsequentes.

Sua síntese e estocagem ocorrem principalmente no fígado. A liberação para a corrente sanguínea ocorre via Transportador de Vitamina C Sódio-dependente (“Sodium-dependent Vitamin C Transporter” – SVCT1) e a captação pelos órgãos e tecidos periféricos ocorre pelo seu homólogo SVCT2 (HARRISON *et al.*, 2010).

1.1.1.2.3. Vitamina E:

A vitamina E (Vit E) é um dos agentes antioxidantes de maior abundância encontradas em partes lipossolúveis das células de mamíferos superiores (Fig. 3; RIGOTTI, 2007). A Vit E corresponde a uma família que contém oito compostos lipofílicos que ocorrem naturalmente, sendo quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, designados como: alfa, beta, gama e delta (GOHIL *et al.*, 2008). O alfa-tocoferol é o representante da família da Vit E de maior relevância na fisiologia dos humanos, contando com maior concentração nos tecidos (RIGOTTI, 2007). O alfa-tocoferol é o que possui maior atividade biológica e o maior representante antioxidante com função de proteção dos ácidos graxos poliinsaturados contra a peroxidação lipídica (NISHIDA *et al.*, 2009).

1.1.2. Dano Oxidativo:

Há conhecidos marcadores de danos oxidativo que auxiliam no estudo de estresse oxidativo. Os radicais livres gerados no organismo podem danificar diversas moléculas e são capazes de inibir a atividade de enzimas. Algumas moléculas formadas pelo ataque direto dos radicais são instáveis e reagem até

formar moléculas mais estáveis e, estas, podem ser utilizadas como marcadores de dano oxidativo.

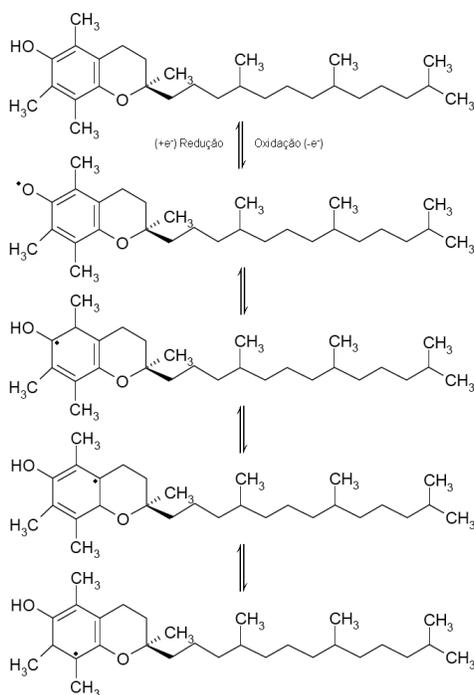


Fig. 3 – Estruturas e reações de oxidação da vitamina E. Na realidade, muitos são os enantiômeros englobados pelo nome usual “vitamina E”, sendo o RRR-alfa-Tocoferol o composto com maior relevância em termos biológicos que, quando oxidado, forma o radical tocoferil; este pode ser reciclado pela vitamina C, retornando a tocoferol.

1.1.2.1. Peroxidação Lipídica:

Danos em lipídeos são freqüentemente estudados, sendo iniciados a partir da cascata de peroxidação lipídica e formação de peróxido lipídico (Fig. 4; MONTINE *et al.*, 2002). Vários são os produtos da peroxidação lipídica, sendo os mais difusíveis os aldeídos como: malondialdeído (MDA), acroelína, 4-hidroxi-2-hexanal e o 4-hidroxi-2-nonanal (MONTINE *et al.*,2002).

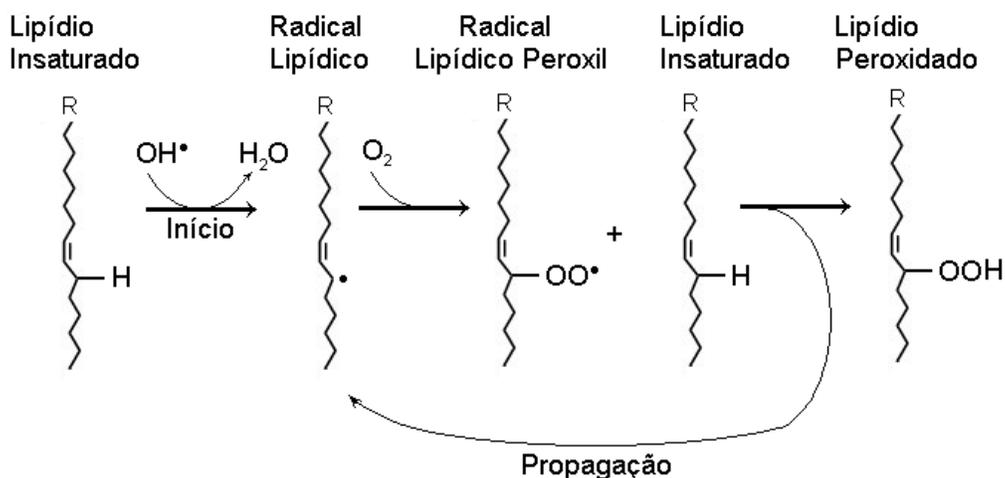


Fig. 4 – Reação da cascata de peroxidação lipídica. A reação de peroxidação lipídica inicia quando um lipídio insaturado reage com um OH^\bullet , formando um radical lipídico, e este pode reagir com oxigênio e formar um radical lipídico peroxil; a propagação da reação ocorre quando este radical lipídico peroxil reage com um lipídio insaturado formando um lipídio peroxidado e mais um radical lipídico. A reação de propagação pode terminar de diversas formas, e.g. ação de antioxidantes.

Peroxidação lipídica é uma consequência biológica importante em termos de dano oxidativo celular. As espécies reativas formadas possuem efeito citotóxico nos fosfolipídios de membrana, por alterar a permeabilidade de membranas, alterando a sua fluidez ou rigidez, e, em situações de maior estresse, pode haver ruptura de membrana (CEMEK *et al.*, 2010).

1.1.2.2. Dano em Proteínas:

1.1.2.2.1. Carbonilação:

A carbonilação é um dano comum que ocorre em alguns resíduos de aminoácidos de proteínas: L-arginina, L-lisina, L-prolina e L-treonina. Formação

e detecção de resíduos carbonilados em proteínas podem ocorrer alternativamente em resposta a produtos da peroxidação lipídica, e.g. 4-hidroxi-2-nonenal, que se ligam a proteínas, e detecção de ácidos sulfênicos como resíduos carbonilados (WONG *et al.*, 2010).

1.1.2.2.2. Nitração e Nitrosilação:

Espécies reativas de nitrogênio modificam proteínas e lipídeos por nitração e nitrosilação. A reação do ONOO⁻ com resíduos de tirosina de proteína é a mais fundamentada (BARTESAGHI *et al.*, 2007; RUBBO & RAD, 2008). Essa alteração é primariamente considerada um dano quando se observa a perda da função da proteína ou a inativação de uma enzima e, em lipídeos, é considerado um sinalizador celular e possui função tecido específica (BARTESAGHI *et al.*, 2007; RUBBOO & RAD, 2008).

1.1.2.2.3. Inativação Enzimática:

Diversas enzimas podem sofrer inativação via estresse oxidativo e por diferentes mecanismos. O complexo I da CTE, assim como a enzima SOD2, pode ser inativado por nitração (ANTUNES *et al.*, 2002; ANANTHARAMAN *et al.*, 2006). A ACO, assim como outras enzimas que possuem núcleo ferro-enxofre em seu sítio ativo, pode ser inativada por espécies reativas (BEINERT *et al.*, 1996; HAN *et al.*, 2005; TONG & ROUAULT, 2007).

A atividade da enzima ACO está ligada ao controle de processos oxidativos, principalmente no funcionamento mitocondrial, participando do ciclo de Krebs (MEDVEDEVA *et al.*, 2002). Na mitocôndria, a ACO faz a conversão do citrato em cis-aconitato e este para isocitrato (KREBS & HOLZACH, 1952).

Esta enzima possui um núcleo de ferro-enxofre [4Fe-4S], e é encontrada em dois compartimentos celulares: mitocôndria (mACO) e livre no citosol (cACO; TONG & ROUAULT, 2007). A mACO participa do ciclo do ácido cítrico, enquanto a cACO possui importância na regulação e sinalização de ferro na célula (Fig. 5a; TONG & ROUAULT, 2007). A atividade da enzima está intimamente relacionada com o estado redox do ferro em seu núcleo, se este estiver no estado Fe^{+3} a enzima está ativa, se estiver no estado Fe^{+2} , a enzima perde este ferro e está inativa (Fig. 5b; BEINERT *et al.*, 1996; HAN *et al.*, 2005; TONG & ROUAULT, 2007). A cACO inativa muda sua conformação e passa a possuir função de regulação e sinalização do ferro na célula (Fig. 5a; TONG & ROUAULT, 2007). O mecanismo proposto de inativação da ACO é via $\text{O}_2^{\bullet-}$ e explicado pela Reação 1.

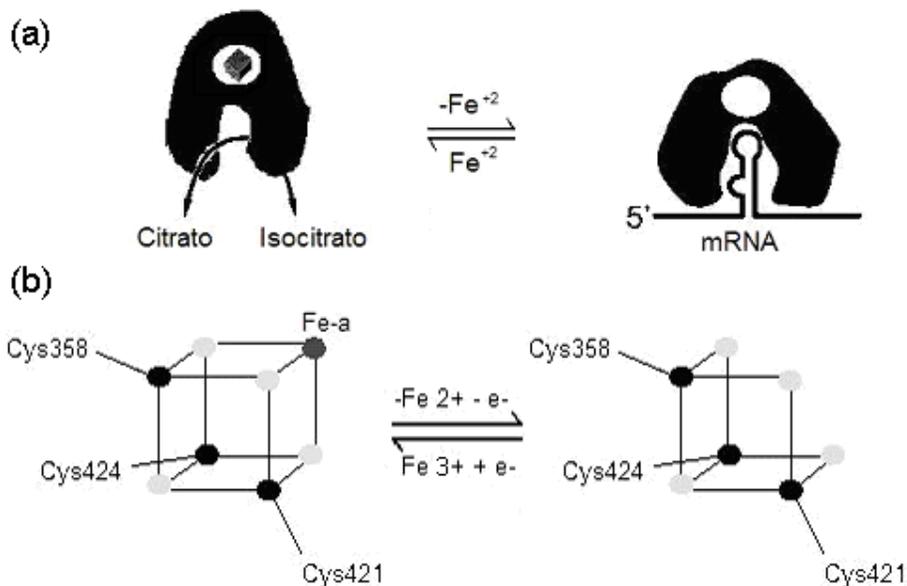


Fig. 5 – Representação esquemática (a) das duas funções da enzima ACO relacionada à presença de ferro em seu sítio ativo e (b) detalhe do sítio ativo. (a) A presença do ferro na enzima ACO resulta na função primária,¹

1.2. Reprodução:

Sob o ponto de vista evolutivo, a reprodução sexuada é um evento que se tornou natural e comum a diversas espécies, evoluindo em complexidade e se adaptando para garantir a passagem dos genes a gerações seguintes. As primeiras mudanças morfológicas em ratos machos iniciam a partir dos primeiros 30 dias de vida, em que o organismo passa por alterações no aparato genital, tornando-o sexualmente competente (KRINKE, 2000; ROMEO *et al.*, 2002; MATSUMOTO *et al.*, 2008). Posteriormente, a presença de uma fêmea no cio é de importância fundamental para alterações fisiológicas e comportamentais nos machos (HULL & DOMINGUEZ, 2007).

1.2.1. Reprodução e Estresse Oxidativo:

A reprodução exige alguns custos e estudos demonstram que reprodução está relacionada com estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2001; BARNES & PARTRIDGE, 2003; ALONSO-ALVAREZ *et al.*, 2004; HARSHMAN & ZERA, 2006).

¹**Cont. Fig. 5** – participando do ciclo de Krebs no interior da mitocôndria; a perda do ferro, no citosol, resulta em troca da função, tornando-a uma proteína com função reguladora de ferro em nível traducional. Figura adaptada de COMMICHAU & STÜLKE (2008). (b) Representação da conversão do grupo ferro-enxofre entre os estados [4Fe-4S] e [3Fe-4S]. A presença do quarto átomo de ferro é essencial para a atividade enzimática da ACO, identificado como Fe-a. Figura adaptada de BEINERT *et al.* (1996).

A avaliação das alterações e custos fisiológicos é foco de muitos estudos, havendo poucos que avaliam as relações dessas alterações para a reprodução, como apontado por HARSHMAN & ZERA (2006), que procuram quebrar o modelo ortodoxo em 'Y' (Fig. 6); e raras pesquisas relacionando reprodução e estresse oxidativo.

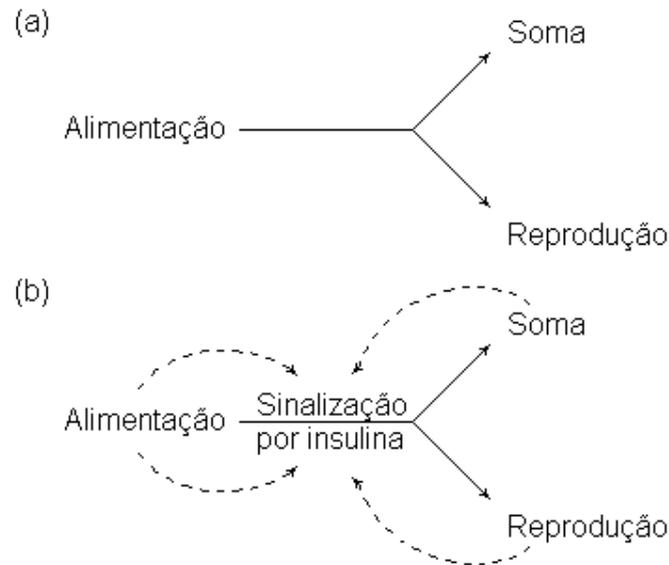


Fig. 6 - Modelo em 'Y' dos custos da reprodução. (a) modelo ortodoxo de aquisição e distribuição dos recursos, em que a aquisição se posiciona na base do 'Y' e a energia adquirida é distribuída entre reprodução e o corpo como um todo ("soma"). (b) modelo hipotético em que as extremidades do 'Y' influenciam diretamente na distribuição da energia adquirida entre reprodução e soma, apresentado pelas setas descontinuas na sinalização por insulina. Figura adaptada de HARSHMAN & ZERA (2006).

1.2.3. Reprodução, Regulação Hormonal e Estresse Oxidativo:

Alguns autores demonstram a influência de certos hormônios sobre o estresse oxidativo, estimulando defesas ou aumentando o dano oxidativo

(RAZMARA *et al.*, 2007; RAZMARA *et al.*, 2008). A avaliação da influência do estradiol sobre o estresse oxidativo demonstra que esse é capaz de induzir aumento na atividade de certas enzimas antioxidantes (VIÑA *et al.*, 2005). Já a testosterona demonstra que este é tecido-específico, capaz de influenciar as enzimas antioxidantes e os danos oxidativo (ALONSO-ALVAREZ *et al.*, 2007).

Outro grupo mostra a relação entre testosterona e estradiol, em que a testosterona pode ser convertida periféricamente a estradiol pela enzima aromatase em diversos tecidos, e.g. encéfalo, alterando o perfil redox do organismo via elementos responsivos a estes hormônios (HANDA *et al.*, 2009).

1.3. Envelhecimento:

A Teoria dos Radicais Livres relacionada ao envelhecimento foi postulada em 1956 por Harman e atualmente é muito aceita, também havendo relação com diversas doenças, e.g. Alzheimer e Parkinson (HARMAN, 1956; ZECCA *et al.*, 2004; RATTAN, 2006). Envelhecimento é um assunto de grande importância pela relação com a taxa elevada de morbidade, aumento da ocorrência de diversas doenças, e como problema em termos de saúde pública e custos (BUEMI *et al.*, 2005).

A queda na produção de energia da mitocôndria está relacionada ao envelhecimento. Como a ACO é continuamente inativada durante o envelhecimento, por se localizar perto do sítio de formação de EROs, ela está relacionada a essa perda de rendimento (BOTA & DAVIS, 2002; DELAVAL *et al.*, 2004; YARIAN *et al.*, 2006).

1.4. Encéfalo:

A origem da formação do encéfalo nos vertebrados ainda é controversa, sendo sugerida ou tunicados ou anfioxos (MURAKAMI *et al.*, 2005). O processo de evolução e aumento no tamanho encefálico resulta em um tecido extremamente dispendioso, requerendo maior energia por peso comparado a outros tecidos somáticos (ISLER & van SCHAIK, 2009). O maior problema relacionado com o aumento do tamanho encefálico é a necessidade de evitar a situação de jejum (ISLER & van SCHAIK, 2009). Este tecido consome altos níveis de oxigênio e possui a glicose como principal fonte de energia (GUEVARA *et al.*, 2009).

O encéfalo é composto por células muito diferenciadas, com baixa taxa de divisão e reposição celular. É um órgão de muita importância a ponto de classificar um organismo como vivo ou morto. Os neurônios possuem elevada síntese de membranas para formação de vesículas contendo neurotransmissores, cuja síntese já foi descrita no peroxissomo via oxidação de ácidos graxos (CIRIOLO *et al.*, 1997).

Muitas são as doenças desenvolvidas no encéfalo e há carência de conhecimento sobre sua manifestação inicial, diagnóstico precoce para prevenção e tratamento, e.g. Alzheimer e Parkinson (ZECCA *et al.*, 2004).

1.4.1. Encéfalo e Reprodução:

O sistema nervoso central (SNC) está envolvido diretamente nos eventos relacionados à maturação sexual e atividade reprodutiva. A regulação endócrina realizada pelo SNC influencia muitos órgãos, e.g. as gônadas, que

produzem outros hormônios em resposta ao estímulo (MILES, 2007; MATSUMOTO *et al.*, 2008).

Na presença de uma fêmea no cio, a alteração fisiológica do macho já foi relatada e está relacionada ao sistema olfativo (BODO, 2008). A presença de uma fêmea no cio é capaz de ativar Fos-IR na área pré-óptica medial de um macho, independente de estar apto ou não à reprodução. Após a puberdade, entretanto, essa exposição causa um aumento no metabólito da dopamina e alteração no comportamento sexual (ROMEO *et al.*, 1998; ROMEO *et al.*, 2002; SCHULZ *et al.*, 2003; SCHULZ *et al.*, 2004; HULL & DOMINGUEZ, 2007). Outro fator observado é o aumento dos níveis de testosterona circulantes em roedores adultos após uma hora de exposição ao feromônio vaginal de fêmeas, resultando em comportamento sexual mais ativo nos machos (ROMEO *et al.*, 1998).

Diversas regiões do encéfalo já foram descritas com expressão de receptores andrógenos em vários roedores, incluindo ratos. Apesar dos avanços nos estudos relacionando comportamento e sinalização, a complexidade nesse sistema torna difícil a avaliação de quais componentes específicos das vias neurais relacionadas aos sinais olfativos de um macho causa alterações via andrógenos (BODO, 2008).

1.4.2. Encéfalo, Reprodução e Estresse Oxidativo:

É conhecido que o encéfalo possui baixa atividade da maioria das enzimas antioxidantes, quando comparado a outros órgãos (HO *et al.*, 1997; CELIK *et al.*, 2006; SOHAL *et al.*, 2006; HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007; SANTIAGO *et al.*, 2008), não havendo estudos relacionando o perfil oxidativo

dos órgãos de mamíferos machos com atividade reprodutiva. Considerando essa baixa atividade para o encéfalo, este é mais susceptível a danos oxidativo (TIAN *et al.*, 1998; CELIK *et al.*, 2006; SOHAL *et al.*, 2006). Outro agravante é que o encéfalo possui alta atividade metabólica, consumindo cerca de 20% do oxigênio inspirado em situação de repouso, enquanto representa cerca de apenas 0,5-2% do peso do corpo (GUEVARA *et al.*, 2009).

Como o encéfalo possui como fonte primária de energia a glicose, pela via glicolítica e Ciclo de Krebs, sugere-se alta produção de EROs através da mitocôndria (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007). Dada a quantidade de membrana em uma célula do sistema nervoso, a constante síntese de vesículas e de neurotransmissores, a oxidação de ácidos graxos para síntese de membranas, via peroxissomo, causam a geração de grandes quantidades de H₂O₂ (CIRIOLO *et al.*, 1997; BOSTANCI *et al.*, 2010). Esta situação de baixas defesas antioxidantes e a alta atividade metabólica, gerando grande quantidade de espécies reativas, explicariam a maior susceptibilidade e presença de danos oxidativo no encéfalo.

Um número de doenças neurodegenerativas, e.g. ataxia de Friedreich e doença de Huntington, são descritos junto a situações anormais, e.g. aumento de estresse oxidativo pela deficiência da SOD2, declínio da atividade da ACO ao longo do envelhecimento (BOTA *et al.*, 2002).

O encéfalo utiliza também de defesas não-enzimáticas para evitar danos oxidativos, e.g. GSH. A Vit E também possui papel fundamental para um SNC saudável (GOHIL *et al.*, 2008). Em termos gerais, os tocoferóis agem como antioxidantes de membrana, quebrando a reação em cadeia da peroxidação

lipídica e/ou reagindo diretamente com espécies reativas no meio lipofílico (BOSTANCI *et al.*, 2010; CEMEK *et al.*, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2010).

Assim como na maioria dos tecidos, os níveis de Vit E são regulados pela proteína transportadora de alfa-tocoferol (“alpha-Tocopherol Transport Protein” – a-TTP) no encéfalo, que efetua tanto a troca da Vit E presente nos quilomícrons para as LDLs no fígado quanto a transferência dos transportadores presentes no sangue para o tecido neural (NISHIDA *et al.*, 2009). Outra proteína responsável pela captação e manutenção dos níveis de Vit E é o receptor de antioxidante classe B tipo I (“Scavenger Receptor class B type I” – SR-BI), com expressão diferente em diferentes regiões do encéfalo (RIGOTTI, 2007; GOHIL *et al.*, 2008). A proteína transportadora de fosfolípidos (“Phospholipid Transfer Protein” – PLTP) também é capaz de efetuar a troca da Vit E entre lipoproteínas e células do encéfalo (SPECTOR & JOHANSON, 2007). Um estudo *in vitro* demonstrou que a capacidade de captação de Vit E em tecido neural ocorre de forma linear, acompanhando o aumento linear da concentração (até 200 μM) deste composto no meio de cultura (LI *et al.*, 2003), indicando que o tecido neural procura manter os níveis de Vit E elevados.

A Vit C é outra vitamina com importante papel no encéfalo, tanto pelo papel de reciclar a Vit E a partir do radical tocoferil, quanto por ação antioxidante direta (LI *et al.*, 2003). A capacidade antioxidante desta vitamina evita danos em tecido neural e protege os neurônios de dano oxidativo associado a diversas doenças neurodegenerativas (LI *et al.*, 2003).

“Uma idéia que não é perigosa não
merece ser chamada de idéia.”
Oscar Wilde.

2. OBJETIVO

Avaliar as alterações no perfil oxidativo no encéfalo e níveis hormonais no soro de ratos machos reprodutores comparado 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.
- No encéfalo:
 - Medir a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e glutathione-S-transferase;
 - Avaliar a atividade e inibição da atividade da enzima metabólica aconitase;
 - Determinar os níveis de peroxidação lipídica e dos danos em proteína (carbonilação e nitração);
 - Avaliar o *status* oxidante total;
 - Quantificar as moléculas antioxidantes não-enzimáticas glutathione, vitamina C e E.
- No soro:
 - Avaliar os níveis hormonais testosterona e estradiol.

3. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

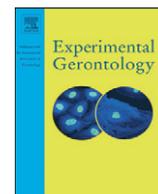
3.1. Artigo Científico:

Artigo aceito para publicação na revista *Experimental Gerontology*.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero

Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging

Paulo Vinicius Gil Alabarse^a, Fernanda Schäfer Hackenhaar^a, Tássia Machado Medeiros^b,
 Marcus Fabiano Almeida Mendes^b, Paula Ramos Viacava^b, Ártur Krumberg Schüller^b,
 Tiago Boeira Salomon^b, Guilherme Ehrenbrink^b, Mara Silveira Benfato^{a,*}

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

^b Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2010

Received in revised form 26 August 2010

Accepted 13 October 2010

Available online 21 October 2010

Section Editor: Christian Humpel

Keywords:

Reproduction

Antioxidant enzymes

Antioxidant compounds

Hormones

Oxidative damage

ABSTRACT

Reproduction alters the male physiology. We performed a comprehensive study to examine oxidative stress in the brains of male rats with (experienced) or without (naïve) reproductive activity during aging. Oxidative stress was assessed by measuring the activity of catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase, aconitase, and aconitase reactivated, and by measuring lipid peroxidation, protein carbonylation, nitrite and nitrate levels, vitamin C levels, and glutathione (total, reduced, oxidized forms) levels in brain tissue, as well as testosterone and estradiol levels in serum. Reproductively active animals exhibited increased testosterone levels and aconitase activity, suggesting an increased metabolism. Increased antioxidant enzyme activities and increased levels of antioxidant compounds were observed, yet damage to biomolecules was also observed in experienced rats. During aging changes in oxidative stress were observed. We found higher activities of antioxidant enzymes, higher amounts of antioxidants, and more damage at six months of age among experienced animals than among naïve animals. Similar antioxidant activities and levels, and damage were found between the groups at twenty-four months of age. These results add comprehensive data regarding changes in oxidative stress during aging, and suggest an explanation for the costs of reproduction.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Reproduction causes changes in male vertebrates, including morphological, behavioral, and physiological alterations (Miles et al., 2007). Many of these changes are related to brain functions, but some processes remain unclear. Reproductive success incurs some metabolic costs, and previous studies have suggested that reproduction causes oxidative stress. Most studies concerning reproductive activity and oxidative stress have been restricted to invertebrates such as *Drosophila melanogaster* (Wang et al., 2001) and *Caenorhabditis elegans* (Harshman and Zera, 2006), and few studies have addressed vertebrates (Alonso-Alvarez et al., 2004; Arenas-Ríos et al., 2007; Dowling and Simmons, 2009; Wiersma et al., 2004); thus, there is a need for studies addressing more diverse taxa. Studies have typically been limited either to females (lactation, number of litters, size of litter), or have related to male behavior (Hull and Dominguez, 2007; Speakman, 2008).

Behavioral stress in males during reproductive activity can be caused by: (1) contact with a female in heat, which cause alterations

in male behavior and physiology; (2) some sexual acts, a kind of exercise, with release of hormones which change male behavior and physiology; (3) refusal of a pregnant female, a kind of social stress for the male; (4) aggressiveness on the part of a female with a brood, a very hard social stress for the male; and (5) brood removal, resulting in better social contact between male and female, restarting the cycle.

In males, steroid hormone concentrations change as a consequence of reproductive behavior and during aging. Testosterone is considered to be a pro-oxidant and estradiol to be an antioxidant compound (Halliwell and Gutteridge, 2007).

The free radical theory of aging is regarded as an important explanation for the aging process (Harman, 1956; Rattan, 2006). This theory defends the importance of the imbalance between reactive oxygen and nitrogen species and antioxidant defenses in the aging process over the lifespan of an animal, resulting in senescence and, ultimately, death.

Mitochondria and peroxisomes are the main source of reactive oxygen species (ROS). This endogenous ROS production can cause oxidative damage such as protein modification, lipid peroxidation, and enzyme inactivation (e.g. aconitase) (Gredilla and Barja 2005; Guevara et al., 2009; Herlein et al., 2009; Razmara et al., 2007; Teixeira et al., 1998). The brain consumes large amounts of oxygen and, consequently, is vulnerable to age-related oxidative stress (Sastre et al., 2003; Serrano and Klann, 2004). Oxidative stress on the brain

* Corresponding author. 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 address: mara.benfato@ufrgs.br (M.S. Benfato).

can be dangerous for the organism, as studies have suggested an influence of free radicals in human neurodegenerative diseases (Zecca et al., 2004).

Aconitase (ACO) activity has a role in controlling oxidative processes in the cell including the functioning of the tricarboxylic acid cycle, resulting in induction of oxidation of the electron transport chain components— O_2 to O_2^- reducers (Medvedeva et al., 2002). Mitochondrial ACO is a major target of oxidative damage during aging because it is proximal to the site of free radical formation (Delaval et al., 2004; Tong and Rouault, 2007; Yarian et al., 2006). ACO can be inactivated by some ROS, mainly by superoxide anion, and increased levels of superoxide anion result in a linear increase in the amount of inactive ACO (Gardner et al., 1994; Schapira, 1998; Tórtora et al., 2007). This inactivation occurs by the loss of one iron from the iron-sulfur cluster (Beinert et al., 1996; Han et al., 2005; Tong and Rouault, 2007). Aging associated with ACO inactivation has been associated with decreased life span in *Drosophila* (Yan et al., 1997).

Aging caused by free radicals can be retarded by antioxidant defenses involving both enzymatic and non-enzymatic mechanisms (Hackenhaar et al., 2009). A number of antioxidant enzymes that act directly on ROS are well known: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and glutathione S-transferase (GST). The main non-enzymatic defense is reduced glutathione (GSH), and there are other mechanisms, such as Vitamin C (Vit C) and other vitamins (Adibhatla and Hatcher, 2010).

The aim of this work was to examine oxidative stress during aging in the brains of male rats which were reproductively actively (experienced) or reproductively inactively (naïve). We examined the levels of some hormones that alters metabolism during reproduction and aging, and which can affect oxidative stress parameters such as antioxidant enzymes and compounds, resulting in oxidative damage to molecules (see Supplementary Fig. 1 for a summary of the cellular antioxidants, oxidants, and related compounds and interactions previously studied).

2. Materials 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 male rats (*Rattus norvegicus*) aged three, six, twelve, and twenty-four months. At one month of age rats were divided into two groups: experienced and naïve ($n = 10$ for each age and group). Experienced rats were maintained in a box with a single female of the same age (1 male and 1 female per box). Naïve rats were grouped with other male rats without any contact with females (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 animal house was kept on a 12 h light/dark cycle at a temperature of 24 ± 1 °C, and animals were provided with standard lab chow and drinking water ad libitum.

2.2. Brain 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 the body weight and length (without tail) were measured. After perfusion using a saline infusion, the brain was removed from the skull, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen for further analysis.

Organ processing was made as previously performed by Hackenhaar et al. (2009). Briefly, brains were processed with manual maceration. The samples were sonicated in 30 mM phosphate buffer (120 mM KCl, 100 mM PMSF, pH 7.4) and centrifuged for 10 min at 3500 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

The levels of testosterone and 17 β -estradiol in serum were estimated by radioimmunoassay using Testosterone RIA DSL-4100[®] and Estradiol RIA DSL-4100[®] kits (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Oxford, UK). All assays were independently performed in triplicate.

2.5. Enzyme activities in brain tissue

The assay to measure total superoxide dismutase (SOD) activity was based on a spectrophotometric method that monitors the inhibition of epinephrine autoxidation using absorbance at 480 nm (Misra and Fridovich, 1972). SOD activity was expressed as U/mg of protein, and 1 U was defined as the capacity of the enzyme to inhibit 50% of the epinephrine autoxidation.

GPx activity was evaluated using absorbance at 340 nm to measure the oxidation of NADPH in the presence of reduced glutathione, glutathione reductase, and tert-butyl hydroperoxide (Pinto and Bartley, 1969). GPx activity was expressed as U/mg of protein, and 1 U was defined as the capacity of the enzyme to decompose 1 μ mol of NADPH/min.

CAT activity was evaluated by measuring the rate of hydrogen peroxide consumption via absorbance at 240 nm (Aebi, 1984). CAT activity was expressed as U/mg of protein, and 1 U was defined as the capacity of the enzyme to consume 1 μ mol of hydrogen peroxide/min.

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, and 1 U was defined as the capacity of the enzyme to produce 1 μ mol of GS-DNB per minute.

ACO activity was measured at 25 °C using absorbance at 340 nm over time as citrate was converted to α -ketoglutarate using NADP⁺ by 2 units/ml of isocitrate dehydrogenase (Razmara et al., 2007). ACO was fully reactivated (ACore) by incubation of the samples for 5 min with dithiothreitol, ferrous ammonium sulfate, and reduced glutathione (Razmara et al., 2007; Teixeira et al., 1998). ACO and ACore activity were expressed as U/g of protein, and 1 U was defined as the amount catalyzing the formation of 1 nmol of isocitrate per minute (Razmara et al., 2007).

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

2.6. Oxidative damage assays in brain tissue

As an index of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) levels were measured by HPLC employing a reverse-phase column (SUPELCO[™] LC-18-DB HPLC Column; 15 cm \times 4.6 mm, 5 μ m), using a flow of 1 ml/min of mobile phase (30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol in a ratio of 82.5:17.5 (v/v)); 20 μ L of sample was injected (Karatepe, 2004). The absorbance of the column effluent was monitored at 250 nm. Under these conditions,

Table 1

Body and brain weight, and length (without tail) of animals aged three, six, twelve, and twenty-four months, grouped as naïve or experienced. Results are expressed as the mean ± SEM.

		Age ^a			
		3	6	12	24
Body weight ^b	Naïve	296.8 ± 3.9	310.5 ± 7.1	433.0 ± 24.6	436.7 ± 36.8
	Experienced	339.5 ± 12.2	397.3 ± 17.8	468.4 ± 10.7	421.8 ± 12.5
Brain weight ^b	Naïve	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1
	Experienced	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1
Length ^c	Naïve	20.2 ± 0.2	22.0 ± 0.4	22.5 ± 0.3	22.3 ± 0.3
	Experienced	21.8 ± 0.5	22.3 ± 0.4	23.8 ± 0.4	24.0 ± 0.3

^a Age expressed in months.

^b Body and brain weight expressed in grams.

^c Length (without tail) expressed in centimeters.

the retention time of MDA was 5.6 min. The MDA level was expressed as nmol of MDA/mg of protein, and an MDA standard solution was prepared by acid hydrolysis of 1,1,3,3-tetraethoxypropane.

As an index of protein damage, carbonyl levels were measured using absorbance at 370 nm (Levine et al., 1990). As a positive control, 30 mM hydrogen peroxide was added to each sample and incubated for 30 min under UVC (λ 250 nm), and carbonyl levels were measured. Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/g of protein.

Indirect nitric oxide (nitrite and nitrate—NO₂&NO₃) was measured via a spectrophotometric method which uses absorbance at 543 nm to determine total nitrate and nitrite levels (Grisham et al., 1996). The NO₂&NO₃ level was standardized by sodium nitrite and expressed as nmol of NaNO₂/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.

2.7. Antioxidant molecules assays in brain tissue

The assay to measure Vit C levels was performed by HPLC simultaneously with the MDA assay (Karatepe, 2004). Under these

conditions, the retention time of Vit C was 3.0 min. Vit C level was expressed as μmol of vitamin C/g of protein.

The assay to measure glutathione molecule (total, reduced and oxidized—GSht, GSH, and GSSG, respectively) was performed by measuring the formation of *p*-nitrophenol from 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), in the presence of the enzyme glutathione reductase and NADPH, using absorbance at 412 nm (Kondo and Awada, 2000). To discriminate reduced glutathione from the oxidized form, *N*-ethylmaleimide (0.25 mM) was added to the samples (Kondo and Awada, 2000). Glutathione level was expressed as mmol of glutathione/mg of protein.

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

2.8. Statistical analysis

Because data in the experimental groups have reached P>0.2 in the Kolmogorov–Smirnov test and have passed the Levene Equal Variance test, normality and homoscedasticity were ensured and parametric tests were employed. ANOVA test with Tukey post hoc test was used to determine differences among groups, and P≤0.05 was set as the critical limit. Spearman Correlation was performed and Stepwise Linear Regression was employed to predict the oxidative parameters studied. The reported values are expressed as the mean ± SEM.

3. Results

As can be seen in Table 1, body and brain weights, and length (without tail) of animals aged three, six, twelve, and twenty-four months were normal among groups.

It is known that the activity of antioxidant enzymes is modulated during aging. In this study we compared these changes among male rats with or without reproductive activity. As can be seen in Table 2, CAT presented higher activity in all experienced rats during aging, GPx was higher in experienced rats at six and twelve months of age, SOD, ACO, and ACOre were higher in experienced rats at three, six and twelve months of age, GST was higher in experienced rats at six months of age, and lower at twelve and twenty-four months of age.

Table 2

Enzymatic activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), aconitase (ACO), and aconitase reactivated (ACOre) in brain tissue of rats aged three, six, twelve, and twenty-four months, grouped as naïve or experienced. Results are expressed as the mean ± SEM.

		Age ^a			
		3	6	12	24
CAT ^b	Naïve	40.0 ± 2.40	25.6 ± 1.5	17.6 ± 0.8	39.1 ± 1.8
	Experienced	3199.6 ± 288.8 ^d c	1295.2 ± 111.2 ^d c	780.1 ± 128.3 c	672.7 ± 80.0 c
GPx ^b	Naïve	29.6 ± 4.0	20.7 ± 1.9	22.8 ± 1.9	172.7 ± 14.1
	Experienced	2428.5 ± 300.4 ^d c	12721.4 ± 1602.1 ^d c	4929.7 ± 131.7 ^d c	2029.9 ± 122.1 c
SOD ^b	Naïve	0.7 ± 0.08	0.4 ± 0.02	0.6 ± 0.03	0.3 ± 0.02
	Experienced	66.2 ± 4.65 ^d c	129.9 ± 19.34 ^d c	56.9 ± 4.76 c	39.0 ± 5.92 c
GST ^b	Naïve	0.112 ± 0.005	0.016 ± 0.002 ^d	0.433 ± 0.022 ^d	0.736 ± 0.030
	Experienced	0.035 ± 0.003 ^d c	0.497 ± 0.106 ^d c	0.065 ± 0.006 c	0.191 ± 0.014 c
ACO ^c	Naïve	10.8 ± 0.82	26.8 ± 2.10	17.0 ± 2.41	9.1 ± 0.77
	Experienced	41.7 ± 5.05 c	52.4 ± 6.46 c	47.1 ± 2.74 ^d c	5.4 ± 0.82 c
ACOre ^e	Naïve	25.4 ± 3.06	81.5 ± 6.75	56.6 ± 5.59	22.6 ± 1.57
	Experienced	73.4 ± 8.40 c	124.5 ± 10.16 c	92.7 ± 11.89 ^d c	11.2 ± 0.55 c

^a Age expressed in months.

^b Activity expressed in U/mg of protein.

^c Denotes significant difference among naïve vs experienced at the same age with P≤0.05.

^d Denotes significant difference among naïve vs naïve, or experienced vs experienced at different ages with P≤0.05.

^e Activity expressed in U/g of protein.

Table 3
Lipid peroxidation (MDA), protein carbonylation (carbonyl), and indirect nitric oxide damage (NO₂ and NO₃) in brain tissue of rats aged three, six, twelve, and twenty-four months, grouped as naïve or experienced. Results are expressed as the mean ± SEM.

		Age ^a			
		3	6	12	24
MDA ^b	Naïve	14.01 ± 0.45	2.86 ± 0.42	1.95 ± 0.09	3.01 ± 0.30
	Experienced	10.63 ± 0.53 ^c	139.13 ± 11.51 ^c d	49.60 ± 3.84 ^c d	0.84 ± 0.13
Carbonyl ^e	Naïve	23.0 ± 2	62 ± 8	33 ± 3	20 ± 2
	Experienced	27.0 ± 4 ^c	147 ± 1.8 ^c d	16 ± 2	25 ± 2
NO ₂ & NO ₃ ^f	Naïve	5.72 ± 0.26 ^c	0.91 ± 0.06	1.56 ± 0.15	3.25 ± 0.17
	Experienced	4.56 ± 0.43	5.27 ± 0.74 d	4.88 ± 0.74 ^c d	1.10 ± 0.09

^a Age expressed in months.

^b Lipid peroxidation level expressed as nmol of MDA/mg of protein.

^c Denotes significant difference among naïve vs naïve, or experienced vs experienced at different ages with $P \leq 0.05$.

^d Denotes significant difference among naïve vs experienced at the same age with $P \leq 0.05$.

^e Protein carbonylation levels were expressed as nmol of carbonyl/g of protein.

^f NO₂ and NO₃ levels were expressed as nmol of NaNO₂/mg of protein.

During aging, in experienced rats, CAT activity decreased from three to twelve months of age; GPx activity increased from three to six, and decreased from six to twenty-four months of age; SOD activity increased from three to six, and decreased from six to twelve months of age; GST activity increased from three to six months of age, and decreased from six to twelve months of age; ACO and ACOre decreased from twelve to twenty-four months of age (Table 2). In naïve rats, no difference was found during aging for CAT, GPx, SOD, ACO, and ACOre, but GST activity increased from six to twenty-four months of age (Table 2). All ACOre values were higher than ACO from the same group and age.

With respect to the changes that were detected in the activity of antioxidant enzymes, we wished to know if the animals were affected by oxidative stress, and if the biomolecules had suffered oxidative damage. Compared with naïve rats of the same age, MDA was higher in experienced rats at six and twelve months of age, carbonyl was higher in experienced rats at six months of age, and indirect damage by nitric oxide (NO₂&NO₃) was higher in experienced rats at six and twelve months of age (Table 3). During aging, in experienced rats, MDA levels increased from three to six months of age, and decreased steadily from six to twenty-four months of age, carbonyl levels increased from three to six months of age, and decreased from six to twelve months of age, and NO₂&NO₃ levels of experienced rats decreased from twelve to twenty-four months of age

(Table 3). In naïve rats, no difference was found during aging for MDA or carbonyl levels, but NO₂&NO₃ levels decreased from three to six months of age (Table 3).

The amount of oxidative damage that was found led us to investigate the possibility that non-enzymatic antioxidants were produced or mobilized into brain tissue and were acting against oxidant species. Compared with naïve rats at the same age, Vit C content was higher in experienced rats at six months of age, GSht levels were higher in experienced rats at three, twelve, and twenty-four months of age, GSH levels were higher in experienced rats at twelve months of age, and GSSG levels were higher in experienced rats at six and twelve months, and lower at twenty-four months of age (Table 4). During aging, in experienced rats, Vit C content increased from three to six, and decreased from six to twelve months of age, GSht levels increased from six to twelve, and decreased from twelve to twenty-four months of age, GSH levels increased from six to twelve, and decreased from twelve to twenty-four months of age, and GSSG levels increased from three to twelve, and decreased from twelve to twenty-four months of age (Table 4). In naïve rats, during aging, Vit C content increased from three to six, and decreased from six to twelve months of age, no difference was found for GSht or for GSH levels, but GSSG levels increased from twelve to twenty-four months of age (Table 4).

Because steroid hormones influence brain function and influence oxidative stress, hormonal levels were measured. Compared with naïve

Table 4
Vitamin C (Vit C), and glutathione (glutathione total, reduced and oxidized; GSht, GSH, and GSSG, respectively) levels in the brain tissue of rats aged three, six, twelve, and twenty-four months, grouped as naïve or experienced. Results are expressed as the mean ± SEM.

		Age ^a			
		3	6	12	24
Vit C ^b	Naïve	3.2 ± 0.23 ^c	56.7 ± 6.54 ^c	19.9 ± 0.91	36.4 ± 3.66
	Experienced	0.3 ± 0.01 ^c	96.6 ± 9.65 ^c d	19.2 ± 0.71	13.5 ± 0.67
GSht ^e	Naïve	2.5 ± 1.05	3.1 ± 0.26	5.0 ± 0.60	6.6 ± 0.81
	Experienced	6.8 ± 0.84 d	4.2 ± 0.41 ^c	15.1 ± 1.03 ^c d	1.06 ± 0.11 d
GSH ^e	Naïve	2.1 ± 1.67	3.2 ± 0.32	4.3 ± 0.62	4.2 ± 0.83
	Experienced	6.6 ± 0.99	2.5 ± 1.83 ^c	12.2 ± 1.66 ^c d	0.9 ± 0.12
GSSG ^e	Naïve	0.09 ± 0.014	0.04 ± 0.008	0.29 ± 0.070 ^c	1.26 ± 0.310
	Experienced	0.12 ± 0.015 ^c	0.94 ± 0.115 ^c d	1.48 ± 0.222 ^c d	0.11 ± 0.015 d

^a Age expressed in months.

^b Vitamin C level was expressed as μmol of vitamin C/g of protein.

^c Denotes significant difference among naïve vs naïve, or experienced vs experienced at different ages with $P \leq 0.05$.

^d Denotes significant difference among naïve vs experienced at the same age with $P \leq 0.05$.

^e Glutathione level was expressed as mmol of glutathione/mg of protein.

Table 5
Hormone (testosterone and estradiol) levels in serum of rats aged three, six, twelve, and twenty-four months, grouped as naïve or experienced. Results are expressed as the mean ± SEM.

		Age ^a			
		3	6	12	24
Testosterone ^b	Naïve	40.7 ± 6.14	103.9 ± 48.79	32.4 ± 8.36	28.5 ± 4.52
	Experienced	371.8 ± 30.49 ^c	303.0 ± 32.89 ^d	53.6 ± 11.06	38.5 ± 10.75
Estradiol ^e	Naïve	32.8 ± 4.91	33.5 ± 4.35	18.4 ± 2.27	42.5 ± 7.86
	Experienced	35.8 ± 2.68	66.6 ± 19.06 ^d	22.5 ± 3.91	42.7 ± 3.12

^a Age expressed in months.

^b Testosterone level was expressed in ng/mL.

^c Denotes significant difference among naïve vs experienced at the same age with $P \leq 0.05$.

^d Denotes significant difference among naïve vs naïve, or experienced vs experienced at different ages with $P \leq 0.05$.

^e Estradiol level was expressed in pg/mL.

rats at the same age, testosterone levels were higher in experienced rats at three and six months of age (Table 5). During aging, in experienced rats, testosterone and estradiol levels decreased from six to twelve months of age (Table 5). In naïve rats, no difference was found during aging.

See Supplementary Table 1 for Spearman Correlation and Supplementary Table 2 for Stepwise Linear Regression results.

4. Discussion

Previous study concerning reproductive activity and oxidative stress in vertebrates focused on the pectoral muscles of male and female birds (*Taenopygia guttata*) and their correlation with brood size (Wiersma et al., 2004). The authors found that SOD activity decreased with increased brood size; however, GPx activity did not change (Wiersma et al., 2004). Concerning total antioxidant defenses in the blood of male birds, it was shown that an increase in brood size reduced total antioxidant defenses (Alonso-Alvarez et al., 2004). This reduction may result in a concomitant increase in oxidative damage. However, it is hard to extrapolate from birds to mammals, because oxidative stress, metabolic rate, and longevity among species with equivalent body mass are not directly comparable between birds and mammals (Costantini, 2008).

In mammals, an interesting study with testis of wild mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproducing cycle found a great increase in SOD, CAT, and GPx activity during testis recrudescence-involution cycle (~50, ~5, ~200 fold of difference, respectively), and the relationship with the antioxidant enzyme

activity, testis recrudescence-involution and testosterone was suggested (Arenas-Ríos et al., 2007), but no mention on environment changes and/or hormesis effect on oxidative stress were approached.

The results presented here comprise the first work that has analyzed oxidative stress in male mammals in relation to reproduction and aging. In the current study, we showed that male rat reproductive activity alters all of the oxidative parameters studied in the brain, indicating a striking increase in oxidative damage levels and antioxidant enzymatic defenses in some age groups. The degree to which these changes lead to changes in lifespan or quality of life of these animals needs to be better clarified.

The great difference found among groups suggests some possible divergences, such as number of animals per box. We performed one experiment grouping 2 naïve males per box when they reached 1 month of age ($n = 10$), then we accompanied their aging until six months of age, and we performed the sacrifice protocol and subsequent assays ($n = 8$). One box was discarded from the sample because aggressiveness was seen among the partner. Results reached same values of naïve animals grouped in 5 per box (data not shown), and no aggressiveness was seen among naïve rats grouped in 5.

The importance of CAT in the central nervous system during aging has been suggested in the past decade (Ciriolo et al., 1997). CAT is thought to protect the brain from hydrogen peroxide during oxidative deamination of the neurotransmitter dopamine and to protect against lipid peroxidation of poly-unsaturated fatty acids (Antunes et al., 2002; Ciriolo et al., 1997). Aging negatively influences the activity of CAT (beta standardized value of -0.78 ; Spearman Correlation $R^2 = -32\%$; see Fig. 1 for the web of interactions, and Supplementary

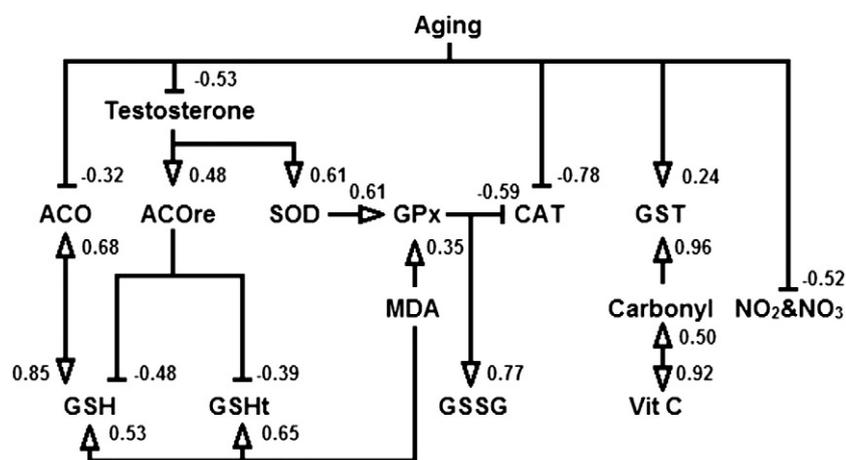


Fig. 1. Scheme of regressions found among studied parameters. Values expresses beta standardized coefficient. See Supplementary Table 2 for further information of the regressions.

Table 2 for further regression information), the result of which would increase the susceptibility of the brain to oxidative stress. Another study found that an active GPx system is essential for maintaining CAT activity (Sokolova et al., 2001). It was demonstrated that CAT cannot compensate for a complete loss of GPx-mediated clearance of hydrogen peroxide, although GPx can fully compensate for a loss of CAT function in astroglia-rich primary cultures (Sokolova et al., 2001). In reproductively experienced rats we found a marked increase in both GPx and CAT activity (Table 2) compared to naïve animals, and the decrease in GPx activity from six to twenty-four months of age is consistent with the previously noted loss of CAT activity (Spearman Correlation $R^2 = 77\%$).

It is known that endogenous gonadal hormones in the mitochondria in the brain of neutered male and female rats influence oxidative defenses (Razmara et al., 2007). Treatment with testosterone caused a small increase in the SOD level (Razmara et al., 2007). We found an increase in SOD activity in the experienced group (Table 2), probably induced by the increase in testosterone levels (beta standardized value of 0.61; Spearman Correlation $R^2 = 71\%$; see Fig. 1 for the web of interactions and Supplementary Table 2 for further regression information). The similar activity at twenty-four months of age probably is a result of equal testosterone levels, which are known to influence SOD activity (Razmara et al., 2007).

The presence and odor of a receptive female activate Fos-IR in the medial preoptic area of a male, but only after puberty it increase the dopamine metabolite DOPAC (a measure of dopamine activity), altering sexual behavior (Hull and Dominguez, 2007; Romeo et al., 1998; Romeo et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2004). Identify and exhibit a preference for an appropriate mating partner are necessary for successful reproduction, and rodent species rely heavily on olfactory cues derived from conspecifics for this particular function (Bodo, 2008; Johnston, 1998). The main olfactory system used for sex selection is the accessory or vomeronasal system (Bodo 2008; Powers and Winans, 1975) and many areas receive either direct or indirect projections from the accessory olfactory bulb, including the bed nucleus of the accessory olfactory tract, the medial division and encapsulated region of the bed nucleus of the stria terminalis, posteromedial cortical and medial nuclei of the amygdale and medial preoptic area (Bodo 2008).

All above cited regions have been described to express androgen receptors in several rodent species, including rats. As Bodo 2008 conclude, it is difficult with the data available so far to speculate on which specific component of the neural pathway that process the olfactory signal is targeted for differentiation by androgens in the male, however, it is clear that a receptive female can strongly influence an adult male's physiology and behavior. So, in our study, the female constantly returns to estrous, being receptive and producing pheromones that constantly influence the male, sustaining the male testosterone levels.

It is possible that testosterone increases oxidative stress, potentially by increasing metabolism, and thereby reducing male lifespan (Buchanan et al., 2001; Halliwell and Gutteridge, 2007; Wikelski et al., 1999). In support of this hypothesis, castrated male rats live longer than intact male rats (Halliwell and Gutteridge, 2007). Testosterone has also been shown to upregulate CAT activity and to reduce the level of lipid peroxidation in the rat brain (Alonso-Alvarez et al., 2007). However, some level of testosterone is required for normal antioxidant defenses, and differences in this concentration may alter oxidative stress (Alonso-Alvarez et al., 2007; Ikeda et al., 2009). It is well known that testosterone action depends on the presence of the androgen receptor, and this has been suggested as an explanation of the complexity of testosterone's influence among tissues, i.e., causing both neuroprotective and damaging results (Gatson and Singh, 2007). ACO activity was higher in the experienced group at three, six, and twelve months of age (Table 2), which is consistent with increased metabolism as suggested; increased ACOre was also found in the

experienced group at three, six, and twelve months of age, suggesting more protein synthesis and/or inactivation by oxidative stress, mainly by superoxide anion, would corroborate the suggested increased oxidative stress (see Fig. 1 for the web of interactions and Supplementary Tables 1 and 2 for correlations and further regression information). Higher ACOre with higher ACO activity suggest higher metabolic demand in mitochondria and higher oxidative stress in the experienced group.

Increased GPx activity was observed in the prostate tissue of castrated male rats following testosterone treatment (Murakoshi et al., 1999). The various studies discussed above show that changes in testosterone levels can have different effects in different tissues, and this is consistent with the fact that androgens exert different biological effects on various organs (Alonso-Alvarez et al., 2007; Ikeda et al., 2009). It is well known that testosterone levels decrease with age (Table 5; beta standardized value of -0.53 ; Spearman Correlation $R^2 = -54\%$; see Fig. 1 for the web of interactions and Supplementary Table 2 for further regression information), so the effects of this hormone decrease with age.

One group has reported that the amount of superoxide anion generated in the mitochondria continuously increases with age in all brain regions of the male rat (Tsay et al., 2000). As SOD activity was found to be higher in reproductively active males at all ages, high levels of hydrogen peroxide are likely produced, resulting in increased molecular damage such as lipid peroxidation and protein carbonylation, and probably induction of mitochondrial GPx activity (beta standardized value of 0.61; Spearman Correlation $R^2 = 78\%$; see Fig. 1 for the web of interactions and Supplementary Table 2 for further regression information).

In experienced rats, the highest levels of the oxidative markers MDA, carbonyl, and $\text{NO}_2\&\text{NO}_3$, were found at six months of age, as was the highest concentration of Vit C, and the highest activities of GPx, SOD, GST, ACO, and ACOre, and the second highest activity of CAT (Tables 2–4; see Fig. 1 for the web of interactions, and Supplementary Tables 1 and 2 for correlations and further regression information). The decrease in the levels of the oxidative markers MDA, carbonyl, and $\text{NO}_2\&\text{NO}_3$, and the decrease in CAT, GPx, SOD, and GST activities seen in experienced rats at subsequent ages may reflect a decrease in reproductive activity, and/or may represent a hormesis effect of oxidative stress (Adibhatla and Hatcher, 2010).

The levels of GPx, SOD, ACO, and ACOre activity, oxidative damage markers, MDA, carbonyl, and $\text{NO}_2\&\text{NO}_3$, the amount of Vit C and GSH, and the levels of testosterone, reached the same values in twenty-four month old experienced and naïve animals, and the levels of GSSG were lower in experienced than naïve animals, indicating that the elders were similar among groups (Tables 2–5). In the context of toxicology the increased levels of GST could extend life span (Zimniak, 2008), but in the context of oxidative stress, it is not clear that an increase in antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidants lead to an extended life span.

Aging is the natural deterioration process of any organism and it leads to a decrease in reproductive activity and to an increased chance of death (Dowling and Simmons, 2009). The theory of costs of reproduction are not limited to external energy input, internal energy reserves are limited too, and this giving rise to tradeoffs; in particular, current reproduction reduces future reproduction and survival. More recently, alternate view has emerged, in which 'pleiotropic' effects of regulators cause the reproductive costs. In the experienced group in the reproductive time frame (three, six and twelve months of age), we found an increase in the activity of antioxidant enzymes and in the levels of non-enzymatic antioxidants, yet oxidative damage markers were higher than in the naïve group—a finding that is consistent with previous studies identifying the 'costs of reproduction' (Alonso-Alvarez et al., 2004, 2007; Barnes and Partridge, 2003; Esiri, 2007; Harshman and Zera, 2006; Kapahi et al., 1999; Wang et al., 2001; Wiersma et al., 2004).

Neurons are particularly vulnerable to oxidative stress, particularly when low levels of GSH are reached (Adibhatla and Hatcher, 2010). We found that reproductive activity increased antioxidant mechanisms, which would be expected to protect the brain and to reduce vulnerability to oxidative stress.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.jing.2010.10.002.

Acknowledgments

We thank Z. Almeida for technical assistance. This research was supported by grants from PPGBCM—Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, and from CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian agencies for research support).

References

- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2010. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 125–169.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol. Lett.* 7, 363–368.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B., 2007. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proc. R. Soc. Lond. B* 274, 819–825.
- Antunes, F., Han, D., Cadenas, E., 2002. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in vivo conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1260–1267.
- Arenas-Ríos, E., León-Galván, M.A., Mercado, P.E., López-Wilchis, R., Cervantes, D.L.M.I., Rosado, A., 2007. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, 150–158.
- Barnes, A.I., Partridge, L., 2003. Costing reproduction. *Anim. Behav.* 66, 199–204.
- Beinert, H., Kennedy, M.C., Stout, C., 1996. Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chem. Rev.* 96, 2335–2373.
- Bodo, C., 2008. A role for the androgen receptor in the sexual differentiation of the olfactory system in mice. *Brain Res. Rev.* 57, 321–331.
- Bradford, M., 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buchanan, K.L., Evans, M.R., Goldsmith, A.R., Bryant, D.M., Rowe, L.V., 2001. Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signaling? *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 1337–1344.
- Ciriolo, M.R., Marascob, M.R., Iannone, M., Nistico, G., Rotilio, G., 1997. Decrease of immunoreactive catalase protein in specific areas of ageing rat brain. *Neurosci. Lett.* 228, 21–24.
- Costantini, D., 2008. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecol. Lett.* 11, 1238–1251.
- Delaval, E., Perichon, M., Friguet, B., 2004. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *Eur. J. Biochem.* 271, 4559–4564.
- Dowling, K.D., Simmons, L.W., 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. R. Soc. B* 276, 1737–1745.
- Esiri, M.M., 2007. Ageing and the brain. *J. Pathol.* 211, 181–187.
- Gardner, P.R., Nguyen, D.H., White, C.W., 1994. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12248–12252.
- Gatson, J.W., Singh, M., 2007. Activation of a membrane-associated androgen receptor promotes cell death in primary cortical astrocytes. *Endocrinology* 148, 2458–2464.
- Gredilla, R., Barja, G., 2005. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146, 3713–3717.
- Grisham, M.B., Johnson, G.G., Lancaster, J.R., 1996. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 268, 237–246.
- Guevara, R., Santandreu, F.M., Valle, A., Gianotti, M., Oliver, J., Roca, P., 2009. Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 169–175.
- Hackenhaar, F.S., Salomon, T.B., Alabarse, P.V.G., Ehrenbrink, G., Benfato, M.S., 2009. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochem. Funct.* 27, 378–382.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York.
- Han, D., Canali, R., Garcia, J., Aguilera, R., Gallaher, T.K., Cadenas, E., 2005. Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. *Biochemistry* 44, 11987–11996.
- Harman, D., 1956. Aging — a theory based on free-radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Harshman, L.G., Zera, A.J., 2006. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol.* 22, 80–86.
- Herlein, J.A., Fink, B.D., O'Malley, Y., Sivitz, W., 2009. Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology* 150, 46–55.
- Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2007. Sexual behavior in male rodents. *Horm. Behav.* 52, 45–55.
- Ikeda, Y., Aihara, K., Yoshida, S., 2009. Androgen-androgen receptor system protects against angiotensin II-induced vascular remodeling. *Endocrinology* 150, 2857–2864.
- Johnston, R.E., 1998. Pheromones, the vomeronasal system, and communication: from hormonal responses to individual recognition. *Ann. NY Acad. Sci.* 855, 333–348.
- Kapahi, P., Boulton, M.E., Kirkwood, T.B.L., 1999. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 495–500.
- Karatepe, M., 2004. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LC. GC. N. Am.* 22, 362–365.
- Kondo, T., Awada, F., 2000. Glutathione (oxidized and reduced form): assay mixture and measurement. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press, Oxford, pp. 57–60.
- Krinke, G.J., 2000. *The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat*. Academic Press, New York.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Alm, B., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Damage to proteins and lipids tissues under oxidative stress. *Methods Enzymol.* 186, 464.
- Medvedeva, L.V., Popova, T.N., Artyukhov, V.G., Matasova, L.V., 2002. Catalytic properties of cytoplasmic and mitochondrial aconitase hydratase from rat cardiomyocytes. *Biol. Bull.* 29, 426–430.
- Miles, D.B., Sinervo, B., Hazard, L.C., Svensson, E.I., Costa, D., 2007. Relating endocrinology, physiology and behaviour using species with alternative mating strategies. *Funct. Ecol.* 21, 654–665.
- Misra, H.B., Fridovich, I.J., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Murakoshi, M., Ikeda, R., Tagawa, M., 1999. Regulation of prostatic glutathione-peroxidase (GSH-PO) in rats treated with a combination of testosterone and 17 β -estradiol. *J. Toxicol. Sci.* 24, 415–420.
- Pinto, R.E., Bartley, W., 1969. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochemistry* 112, 109–115.
- Powers, J.B., Winans, S.S., 1975. Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science* 187, 961–963.
- Rattan, S.L., 2006. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic. Res.* 40, 1230–1238.
- Razmara, A., Duckles, S.P., Krause, D.N., Procaccio, V., 2007. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res.* 1176, 71–81.
- Romeo, R.D., Parfitt, D.B., Richardson, H.N., Sisk, C.L., 1998. Pheromones elicit equivalent levels of Fos-immunoreactivity in prepubertal and adult male syrian hamsters. *Horm. Behav.* 34, 48–55.
- Romeo, R.D., Richardson, H.N., Sisk, C.L., 2002. Puberty and the maturation of the male brain and sexual behavior: recasting a behavioral potential. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 381–391.
- Sastre, J., Plardo, F.V., Viña, J., 2003. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1–8.
- Schapiro, A.H.V., 1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 225–233.
- Schulz, K.M., Richardson, H.N., Romeo, R.D., Morris, J.A., Lookingland, K.J., Sisk, C.L., 2003. Medial preoptic area dopaminergic responses to female pheromones develop during puberty in the male Syrian hamster. *Brain Res.* 988, 139–145.
- Schulz, K.M., Richardson, H.N., Zehr, J.L., Osetek, A.J., Menard, T.A., Sisk, C.L., 2004. Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. *Horm. Behav.* 45, 242–249.
- Serrano, F., Klann, E., 2004. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res. Rev.* 3, 431–443.
- Sokolova, T., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J., Hamprecht, B., Dringen, R., 2001. Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. *Neurosci. Lett.* 297, 129–132.
- Speakman, J.R., 2008. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B* 363, 375–398.
- Teixeira, H.D., Schumacher, R.I., Meneghini, R., 1998. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7872–7875.
- Tong, W., Rouault, T.A., 2007. Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis. *Biomaterials* 20, 549–564.
- Tórtora, V., Quijano, C., Freeman, B., Radi, R., Castro, L., 2007. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1075–1088.
- Tsay, H.J., Wang, P., Wang, S.L., Ku, H.H., 2000. Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. *J. Biomed. Sci.* 7, 466–474.
- Tsuchida, S., 2000. Glutathione transferase. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press, Oxford, pp. 83–85.

- Wang, Y., Salmon, A.B., Harshman, L.G., 2001. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 36, 1349–1359.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R., Verhulst, S., 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proc. R. Soc. Lond. B. Suppl.* 271, S360–S363.
- Wikelski, M., Lynn, S., Breuner, C., Wingfield, J.C., Kenagy, G.J., 1999. Energy metabolism, testosterone and corticosterone in white-crowned sparrows. *J. Comp. Physiol. [A]* 185, 463–470.
- Yan, L., Levine, R.L., Sohal, R.S., 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11168–11172.
- Yarian, C.S., Toroser, D., Sohal, R.S., 2006. Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mech. Ageing Dev.* 127, 79–84.
- Zecca, L., Youdim, M.B., Riederrer, P., Connor, J.R., Crichton, R.R., 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 863–873.
- Zimniak, P., 2008. Detoxification reactions: relevance to aging. *Ageing Res. Rev.* 7, 281–300.

"Não gosto de acreditar em limitação. Acredito
que as coisas são tão limitadas quanto à
mentalidade das pessoas."
Jim Carrey.

4. MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTARES

4.1. Detalhamento da Criação dos Animais:

Com aprovação do Comitê de Ética da UFRGS (n^o 2007831), 80 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) foram separados em dois grupos e envelheceram conforme o esquema apresentado na Figura 7. Foram controladas características de peso e pêlo, procurando indicativos de saúde nesses animais. Caso algum animal apresentasse sintomas de doença, e.g. perda de peso e/ou perda de pêlos, este animal seria descartado da amostra. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biofísica da UFRGS.

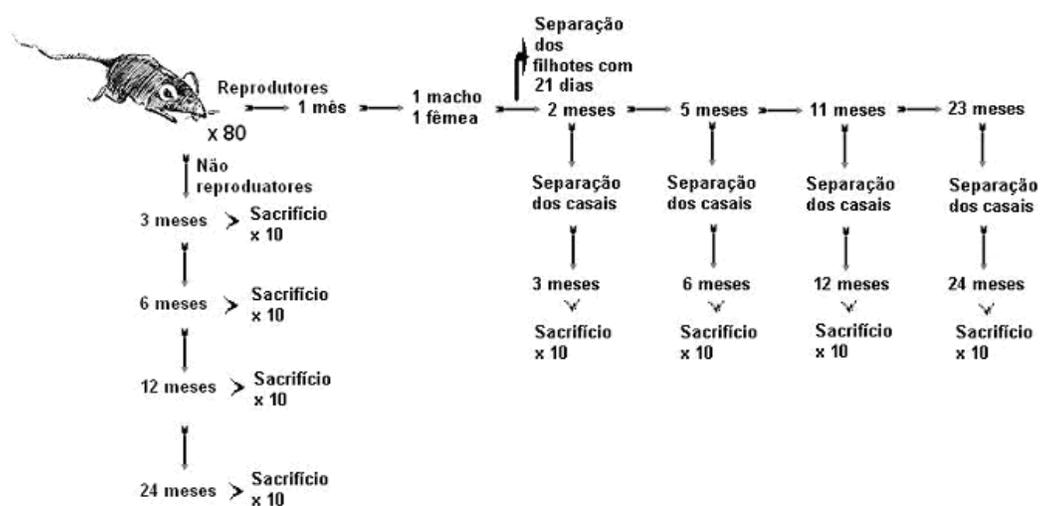


Fig. 7 – Esquema de separação e criação dos animais separados em reprodutores e não reprodutores. A indicação de tempo em dias ou meses referencia a idade dos animais.

4.2. Ensaio Complementares:

4.2.1. Ensaio da Capacidade Oxidante Total no Encéfalo:

Para medir a capacidade oxidante total (“Total Oxidant Status” – TOS) se seguiu o método espectrofotométrico de EREL (2005), avaliando a oxidação do íon ferroso da o-dianisidina em íon férrico pelas moléculas oxidantes da amostra e a posterior formação do complexo entre alaranjado de xilenol e a o-dianisidina com o íon férrico em meio ácido ($A_{560\text{nm}}$). A capacidade oxidante total é expressa por mmol de H_2O_2 /mg de proteína.

4.2.2. Ensaio de Vit E no Encéfalo:

Para medir a quantidade de Vit E se seguiu o método de BARBAS *et al.* (1997), medindo a quantidade de Vit E por HPLC, utilizando uma coluna de 15cmx4,6mm, 5 μm (Coluna 120 C-18 Nucleosil), com fluxo contínuo de 2mL/min de 96,5:3,5 (v/v) metanol-água. A detecção se realizou através de fluorescência (295 e 350nm, excitação e emissão, respectivamente). O tempo de retenção da Vit E sendo de 6min. A quantidade de Vit E é expressa por ηmol de Vit E/mg de proteína, onde a quantidade de Vit E é calculada a partir do padrão, sendo este preparado a partir de alfa-Tocoferol.

4.2.3. Padronização:

Todos os ensaios foram realizados em triplicadas e todos os resultados foram normalizados pela quantidade total de proteína (mg de proteína/mL) pelo método de BRADFORD (1976).

4.3. Análise Estatística:

Utilizou-se o teste de ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey, para avaliar as diferenças entre os grupos e se assumiu um valor $P \leq 0,05$ como limite crítico. Correlação de Spearman e Regressão Linear (método *stepwise*) foram empregadas para evidenciar correlações e previsões entre os parâmetros estudados. Os dados estão expressos como média \pm EP.

5. RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1. TOS no Encéfalo:

Os dados de TOS foram menores nos animais reprodutores de 3 meses e maiores nos animais de 24 meses comparado aos animais não-reprodutores. Ao longo do envelhecimento a TOS diminuiu de 3 para 6 meses nos animais não-reprodutores. Nos animais reprodutores, a TOS aumentou de 6 para 12 meses.

Tabela 2. Dados de TOS (mmol de H₂O₂/mg de proteína) no encéfalo de ratos nas idades de três, seis, doze e vinte e quatro meses, separados como reprodutores e não-reprodutores. Resultados representam média±EP.

	Idade (meses)			
	3	6	12	24
Não-reprodutores	28,9±0,65 ^a	11,5±1,38	21,4±1,56	11,5±1,15
	b			b
Reprodutores	16,1±0,96	8,8±0,18 ^a	30,2±2,49	35,3±5,92

^aDiferença estatística (P≤0,05) em um mesmo grupo ao longo do envelhecimento.

^bDiferença estatística (P≤0,05) entre os grupos.

5.2. Vit E no Encéfalo:

Os dados de Vit E foram mais elevados nos animais reprodutores de 6 e 12 meses que os não-reprodutores. Ao longo do envelhecimento, os animais não-reprodutores não apresentaram diferença estatística entre as idades. Nos animais reprodutores os níveis de Vit E diminuiram de 12 para 24 meses.

Tabela 2. Dados de quantidade de Vit E (η mol de Vit E/mg de proteína) no encéfalo de ratos nas idades de três, seis, doze e vinte e quatro meses, separados como reprodutores e não-reprodutores. Resultados representam média \pm EP.

	Idade (meses)			
	3	6	12	24
Não-reprodutores	1,1 \pm 0,24	0,3 \pm 0,23	0,8 \pm 0,10	0,7 \pm 0,11
		a	a	
Reprodutores	1,9 \pm 0,18	1,1 \pm 0,16	1,7 \pm 0,20 ^b	0,4 \pm 0,01

^aDiferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos.

^bDiferença estatística ($P \leq 0,05$) em um mesmo grupo ao longo do envelhecimento.

5.3. Correlações:

Diversas foram as correlações encontradas entre os parâmetros estudados (Tabela 3). Dada a quantidade de correlações, estes não serão diretamente comentados.

Tabela 3. Correlações entre os parâmetros analisados em encéfalo e soro de ratos machos de 3, 6, 12 e 24 meses, reprodutores e não reprodutores. Resultados representam percentual do valor ajustado de R². Valores considerados significantes para um valor P ≤ 0,05.

	Idade	CAT	GPx	SOD	GST	ACO	ACORE	Carbonil	NO ₂ &NO ₃	MDA	TOS	Vit C	Vit E	GSht	GSSG	GSH	Testosterona	Estradiol
Idade	---	-32			52	-33			-52	-35		40	-38		39		-54	
CAT		---	77	75	-64												73	
GPx			---	78	52	63				65		84		57	81			
SOD				---							-59						71	
GST					---	-33		62							45			
ACO						---	84			62			55	59		66	46	
ACORE							---			55	-40	38	38	47		59	47	
Carbonil								---			-59	50		-56		-57		
NO ₂ &NO ₃									---	74			76	38		38	50	
MDA										---			60	53		57	44	
TOS											---	-46						
Vit C												---						
Vit E													---	63	41	62		
GSht														---	54	96		
GSSG															---			
GSH																---		
Testosterona																	---	
Estradiol																		---

6. DISCUSSÃO COMPLEMENTAR

6.1. Hormônios Sexuais Esteróides:

O perfil redox se relaciona com a concentração de diversos hormônios. Uma tênue alteração na concentração de certos hormônios leva a alterações na atividade e na concentração de algumas enzimas antioxidantes (VIÑA *et al.*, 2005; RAZMARA *et al.*, 2007). O estradiol pode agir como antioxidante de forma direta em diferentes sistemas (VIÑA *et al.*, 2005; RAZMARA *et al.*, 2007). Encontrou-se nenhuma relação entre o estradiol e o estresse oxidativo ou a reprodução. Sugere-se que este hormônio tenha menor relevância em machos quando comparado a fêmeas e a outros hormônios.

6.1.1. Envelhecimento:

A queda da concentração da testosterona no organismo ao longo do envelhecimento já foi previamente relatada (coeficiente padronizado B de -0,53; Correlação de Spearman $R^2 = -54\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos; ROSELI *et al.*, 1993). O mecanismo proposto para esta queda é relacionada à perda da capacidade das células de Leydig em captar o estímulo do hormônio luteinizante e produzir testosterona, e esta perda estaria relacionada ao dano oxidativo (ZIRKIN & CHEN, 2000).

NIESCHLAG *et al.* (1993) estudou a relação entre os níveis de testosterona e longevidade em humanos. Dados bibliográficos de nascimento e morte de cantores nascidos entre 1581 e 1858 foram utilizados, e um total de 50 cantores castrados foi analisado. Cantores que não foram castrados e nascidos em época próxima foram pareados aos castrados e comparada à longevidade. O estudo apresenta não haver diferença estatística entre os

grupos e a longevidade, apesar do uso incorreto da ferramenta estatística, i.e. pareamento de amostras e teste estatístico para amostras não pareadas, e grande variação nos dados, possivelmente em função do longo período avaliado (277 anos); esses fatores dificultam uma interpretação confiável dos resultados. Entretanto, os autores apontam que os níveis de testosterona possam influenciar na longevidade dos homens com o aumento da expectativa de vida. Dando suporte a sugestão, há diferença estatística na longevidade em deficientes mentais castrados comparados a intactos nascidos entre 1871 e 1932, sugerindo que baixos níveis de testosterona possam aumentar a longevidade (HAMILTON & MESTLER, 1969). A relação entre longevidade e reprodução em ratos machos está em estudo por nosso laboratório.

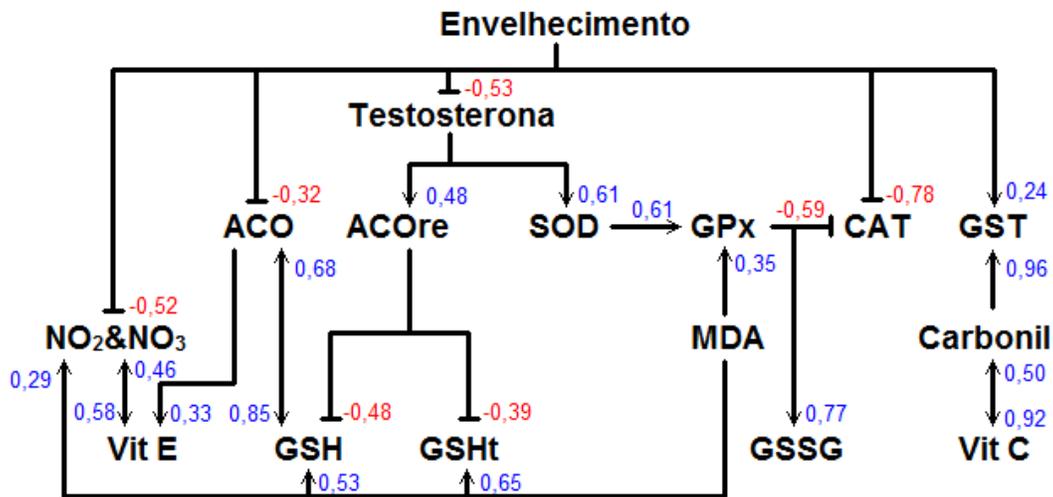


Fig. 8 – Representação esquemática da rede de interações formadas pelas regressões encontradas entre os dados estudados. Valores representam o coeficiente padronizado B. Para maiores informações quanto as regressões e modelos empregados, consultar Tabela Complementar 1 nos anexos.

6.1.2. Atividade das Enzimas Antioxidantes:

O aumento na concentração da testosterona resulta no aumento da atividade da enzima SOD e a queda deste é acompanhada pela queda da atividade da SOD (coeficiente padronizado B de 0,61; Correlação de Spearman $R^2 = 71\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos). Sugere-se que o aumento possa estar relacionado com mecanismos transcricionais e traducionais, bem como pós-traducionais. O aumento na atividade da enzima SOD provavelmente se deve a uma elevação na produção de $O_2^{\bullet-}$, relacionada com o aumento do metabolismo mitocondrial, seguida por um aumento na síntese final de H_2O_2 neste sistema. Este último, conjuntamente com o estímulo da testosterona, pode resultar no estímulo de mecanismos transcricional partilhado pela GPx, e.g. elemento responsivo antioxidante (“antioxidant responsive element” – ARE), e traducional, bem como pós-traducional, culminando no aumento da atividade da GPx.

O aumento na atividade da CAT pode estar indiretamente relacionada com as alterações nas atividades da SOD e GPx, pelo efeito da testosterona e com o sugerido aumento de H_2O_2 . O aumento na atividade da CAT é inibida pela atividade da GPx, em função de sua competição pelo H_2O_2 ; e, uma vez que a manutenção do sistema de GPx é capaz de lidar independentemente do sistema de CAT, ela pode regular este último (coeficiente padronizado B de -0,59; Correlação de Spearman $R^2 = 77\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos; SOKOLOVA *et al.*, 2001).

A atividade da GPx também é regulada pela peroxidação lipídica (coeficiente padronizado B de 0,35; Correlação de Spearman $R^2 = 65\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos), a fim de buscar o controle e

redução na taxa de peroxidação lipídica. O aumento da concentração da glutathiona oxidada é explicado pelo aumento da atividade da GPx (coeficiente padronizado B de 0,77; Correlação de Spearman $R^2 = 81\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos). Pelo aumento da concentração de glutathiona oxidada, procura-se manter a relação entre glutathiona oxidada e reduzida, e o mecanismo de síntese de mais glutathiona deve ser ativado.

6.2. Metabolismo:

O aumento no metabolismo pode ser explicado pela necessidade de maior produção de energia pela mitocôndria, que leva a uma maior produção de EROs. A concentração de O_2^{\bullet} gerada na mitocôndria aumenta continuamente ao longo do envelhecimento no encéfalo (TSAY *et al.*, 2000). O complexo I da mitocôndria sofre inativação via NO^{\bullet} (ANTUNES *et al.*, 2002), sugere-se uma maior produção de radicais livres nos animais reprodutores de 6 e 12 meses devido os níveis elevados de NO_2 & NO_3 relacionada a essa inativação. Um aumento proporcional de geração de EROs pelos mecanismos citados podem explicar o aumento dos danos oxidativos encontrados nos animais reprodutores nas idades de 6 e 12 meses.

A atividade aumentada da enzima ACO evidencia o aumento no metabolismo. A atividade da enzima ACOre está aumentada também, indicando maior inativação e necessidade de maior síntese desta. A atividade desta enzima cai ao longo do envelhecimento (coeficiente padronizado B de -0,32; Correlação de Spearman $R^2 = -33\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos).

A ACO inativa no citosol regula a homeostase de ferro por mecanismos ligados ao elemento responsivo ao ferro (“Iron Responsive Element” – IRE), com o objetivo de captar maior quantidade de ferro e ser reativada. O organismo possivelmente aumenta a concentração de ferro no espaço extracelular para suprir a regulação e a sinalização de aumento dos níveis de ferro no interior celular. Este aumento hipotético na concentração de ferro no encéfalo poderia resultar em estresse oxidativo.

A hipótese relacionada ao aumento na quantidade de ACO inativa é sustentada pela presença de aglomerados de ACO em tecidos envelhecidos, e concomitante queda na atividade enzimática (BOTA & DAVIES, 2002). Esses aglomerados de enzima inativa não poderiam ser reativados e não retornariam ao ciclo de Krebs. Não existem trabalhos abordando a participação destes aglomerados na homeostase de ferro intracelular. Em diversas doenças neurodegenerativas, e.g. Parkinson, a atividade metabólica cai e há um considerável aumento na concentração de ferro no encéfalo. A enzima ACO inativa poderia exercer um papel importante e poderia estar firmemente relacionada a estes eventos.

O metal mais abundante no fígado e no encéfalo é o ferro (BOSTANCI *et al.*, 2010). Em níveis mais elevados, ele causa estresse oxidativo e morte neuronal (BOSTANCI *et al.*, 2010). A questão levantada por BOSTANCI *et al.* (2010) e sem respostas: “Why do iron levels increase abnormally in the brain in neurodegenerative diseases?” poderia ser explicada pela inativação da ACO, junto a outros mecanismos, mas mais estudos devem ser realizados para melhor compreensão e confirmação desta hipótese.

6.2.1. Metabolismo Elevado Gerador de EROs:

Durante o processo de glicólise, há a exigência do poder oxidante de NAD^+ e posterior regeneração do NADH em NAD^+ (Fig. 9). A geração ativa de ATP pela mitocôndria consome NADH no complexo I, regenera o poder oxidante de NAD^+ e há manutenção da homeostase iônica (Fig. 9 Reação 1). A enzima lactato desidrogenase é ativada em situações de elevada demanda de energia para a regeneração do NAD^+ , pois o oxigênio se torna limitado para a CTE e ocorre o acúmulo de NADH (Fig. 9 Reação 2). O encéfalo possui um limiar de tolerância contra os efeitos da acidose pela produção de ácido láctico via LDH, necessitando que mecanismos alternativos sejam ativados. Como mecanismo alternativo, sugere-se a ativação da NAD(P)H Oxidoredutase (NOX) da membrana plasmática e outras oxidoredutases para regenerar o NAD^+ (Fig. 9 Reação 3; BREWER, 2010).

A mitocôndria produz elevadas concentrações de EROs em estado de repouso (estado 4), reduzindo esta produção quando a atividade mitocondrial é elevada e a via da respiração oxidativa está ativada (estado 3). A via da LDH não produz EROs, todavia deve ser evitada para prevenir efeitos da acidose no encéfalo. Elevado dano oxidativo é observado em diversos tecidos durante a respiração oxidativa (estado 3). Sugere-se haver uma via alternativa para a produção dessas EROs e a NOX como responsável por este aumento, já que esta produz 100% de EROs quando ativa (Fig. 9; BREWER, 2010).

Retomando a inativação do complexo I por NO^\bullet , os animais reprodutores das idades de 6 e 12 meses, que apresentaram maiores níveis de NO_2 & NO_3 que os não reprodutores, poderiam estar tomando outras vias para a reciclagem do NADH , tendendo ao sistema da NOX e gerando mais EROs

(GARTHWAITE & BOULTON, 1995; ANTUNES *et al.*, 2002; LINNANE *et al.*, 2007; BREWER, 2010).

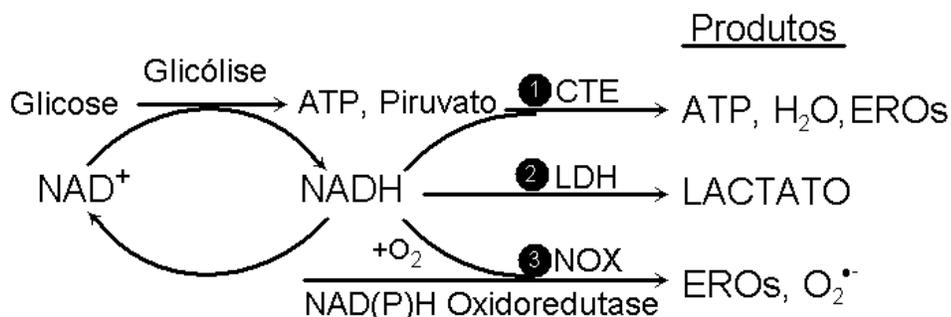


Fig. 9 – Mecanismos utilizados para a produção de energia, manutenção dos níveis de NAD⁺ para glicólise e homeostase iônica. (1) NADH é consumido pelo complexo I da CTE na mitocôndria, com relativa baixa produção de EROs. (2) LDH reduz o piruvato em ácido láctico, consumindo NADH. (3) A NOX produz O₂^{•-} para cada NADH reoxidado, faz a manutenção da homeostase iônica e depende das defesas antioxidantes para eliminação dos EROs formados. Figura adaptada de BREWER (2010).

Pela importância como cofator para a atividade da enzima ACO, complementando o protocolo de RAZMARA *et al.* (2007), adicionou-se GSH ao conjunto de reagentes, desconhecendo-se sua função precisa neste sistema (TEIXEIRA *et al.*, 1998). É interessante ressaltar que um metabolismo adequado reflete num melhor sistema de síntese e reciclagem de GSH e um metabolismo adequado, i.e. atividade da enzima ACO, necessita da presença de níveis adequados de GSH.

6.3. Antioxidantes Não-Enzimáticos:

6.3.1. Vitamina C:

O fígado armazena e sintetiza Vit C e possivelmente produz e libera maiores quantidades nos animais com atividade reprodutiva, resultando no aumento encontrado nos animais de 6 meses. A concentração de Vit C no encéfalo, entretanto, é diluída a todos os órgãos afetados pela atividade reprodutiva e regulada pela presença dos receptores SVCT2. Por ser considerada pró-oxidante ou antioxidante por dose-dependência, esta molécula não pode nem ser sintetizada nem liberada em quantidades elevadas, a evitar sua característica pró-oxidante.

6.3.2. Glutathiona:

A glutathiona evita o dano oxidativo celular e é regulada por oxidantes e por atividade de diversas enzimas, e.g. GPx e GST. Enquanto a reação catalisada pela GPx gera glutathiona oxidada, mantendo o pool total de glutathiona, a atividade da enzima GST resulta em uma redução no pool de glutathiona. Assim como a glutathiona auxilia como cofator da ACO, a alteração no metabolismo influencia na concentração de glutathiona (coeficiente padronizado B de 0,85; Correlação de Spearman $R^2 = 66\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos; TEIXEIRA *et al.*, 1998).

6.3.3. Vitamina E:

O alfa-tocoferol circulante possui curta meia-vida (12 minutos) e captação predominante pelo fígado. O fígado representa um terço da reserva desta vitamina no corpo, seguido do tecido adiposo e músculo esquelético

(RIGOTTI, 2007). Fortes interações biológicas entre a Vit E e outros compostos antioxidantes endógenos são sugeridas, e.g. a Vit C e a GSH (GOHIL *et al.*, 2008).

O papel neuroprotetor da Vit E é bem conhecido, e.g. neurônios do hipocampo (BOSTANCI *et al.*, 2010). Este papel parece estar relacionado tanto a efeitos antioxidantes diretos quanto indiretos. Suplementação alimentar com Vit E e suplementação concomitante de Vit E e C resultam no aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD em fígado e tecidos musculares, sugerindo efeitos antioxidantes indiretos (SHIREEN *et al.*, 2008). Após administração de Vit E, os níveis de glutathione também se elevam no encéfalo (BOSTANCI *et al.*, 2010).

Os níveis de NO₂&NO₃ e Vit E se relacionaram reciprocamente. O NO[•] e a Vit E são capazes de agir como antioxidantes terminadores da reação de peroxidação lipídica e regulam seus níveis (NO₂&NO₃ para Vit E: coeficiente padronizado B de 0,58; Vit E para NO₂&NO₃: coeficiente padronizado B de 0,46; Correlação de Spearman R² = 76%; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos; HAYASHI *et al.*, 1995).

6.4. Dano Oxidativo:

De acordo com SASTRE *et al.* (2003), a produção de EROs pode determinar a longevidade de um organismo pela sinalização sensível a estresse oxidativo e relativo a dano oxidativo causado às moléculas.

Quantidades excessivas de EROs causam danos oxidativo em lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos, pequenas moléculas, etc. (FLOCCARI *et al.*, 2005; WONG *et al.*, 2010). O marcador mais utilizado para medir peroxidação lipídica

é a detecção dos níveis de MDA (FLOCCARI *et al.*, 2005; CEMEK *et al.*, 2010); para medir oxidação protéica é a medida dos níveis de carbonil (WONG *et al.*, 2010); e para acessar de forma indireta o NO[•] é por NO₂&NO₃ (BRYAN & GRISHAM *et al.*, 2007). Procurou-se analisar os danos oxidativo mais importantes no tecido cerebral.

6.4.1. NO₂&NO₃:

A maturação sexual ocorre independentemente da presença de uma fêmea e este processo incorre a mudanças morfológicas e fisiológicas, alterando a pressão circulatória via NO[•]. Observa-se que os níveis de NO₂&NO₃ são equivalentes na idade de 3 meses em ambos os grupos, em função do metabolismo e da sinalização celular de ambos estar relacionado à passagem de juvenis para o estado de reprodução ativa (KRINKE, 2000). Como as genitálias de ratos machos passam por um processo de mudança morfológica, com intensa atividade metabólica, há alteração na circulação de forma sistêmica e os níveis de NO₂&NO₃ estão elevados em ambos os grupos.

6.4.1.1. NO[•] e Peroxidação Lipídica:

O NO[•] é incapaz de reagir diretamente com lipídeos de membrana não oxidados, nem em presença de níveis elevados de oxigênio (HIRAMOTO *et al.*, 2003). Durante a peroxidação lipídica, o NO[•] é capaz de terminar a reação em cadeia, formando ou um composto peroxonitroso ou um peroxinitrito orgânico (HAYASHI *et al.*, 1995; CEMEK *et al.*, 2010). O mecanismo proposto para essa ação antioxidante é dada pela sequência de reações (Reação 7 a 10):





O LOO^{\bullet} é um radical lipídico peroxil, $LOONO$ é um peroxinitrito orgânico, LO^{\bullet} é um radical lipídico alcoxil, $\bullet NO_2$ é um radical dióxido de nitrogênio e $LONO_2$ é um nitrito orgânico (HAYASHI *et al.*, 1995). Dois são os destinos prováveis para o $LOONO$: (i) quebra da ligação entre oxigênios em radicais lipídico alcoxil e dióxido de nitrogênio (Reação 9), e (ii) rearranjo interno e formação do nitrito orgânico mais estável (Reação 10; HOGG & KALYANARAMAN, 1999). O radical alcoxil ou algum produto deste pode propagar a peroxidação lipídica (HOGG & KALYANARAMAN, 1999).

A nitração lipídica e a liberação do NO^{\bullet} de lipídios já foram relatadas (LIMA *et al.*, 2005). Até que nível o NO^{\bullet} possui a característica antioxidante contra a peroxidação lipídica ainda é controversa, pois o produto final pode continuar a peroxidação lipídica (HOGG & KALYANARAMAN, 1999).

BAKY *et al.* (2010) observou aumento concomitante de NO_2 & NO_3 e de MDA no soro de ratos em situação de hipóxia induzida. Eles citam que o aumento de NO_2 & NO_3 levariam ao aumento dos níveis de MDA, entretanto, observamos que os níveis de MDA explicaram o aumento de NO_2 & NO_3 , pelas Reações 7 a 10 (coeficiente padronizado B de 0,29; Correlação de Spearman $R^2 = 74\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos).

6.4.2. Carbonil e Envelhecimento:

Estudos antigos relacionam estresse oxidativo com danos em proteínas, e acúmulo de proteínas danificadas ao longo do envelhecimento, mas essa relação não foi sempre observada (BECKMAN & AMES, 1998; KASAPOGLU &

ÖZBEN, 2001; LEVINE & STADTMAN, 2001; HIPKISS, 2006). Uma série de fatores rege o aumento de proteínas danificadas ou queda desses níveis ao longo do envelhecimento, e contradiz a teoria do acúmulo – a quantidade e os tipos de espécies reativas formadas; os níveis de defesas antioxidantes não-enzimáticas; a atividade das defesas antioxidantes enzimáticas; a capacidade do sistema em degradar as proteínas danificadas, e.g. por proteases; a capacidade do sistema de solubilizar proteínas danificadas a evitar a formação de agregados, e.g. GST; etc. (BERLETT & STADTMAN, 1997; STADTMAN, 2006).

6.4.3. Ativação da GST:

A GST possui forte interação com aldeídos resultantes da peroxidação lipídica, agindo como detoxificadora destas moléculas conjuntamente com oxidoreduases (MONTINE *et al.*, 2002). A GST pode ser ativada por EROs e por dano oxidativo, e.g. proteínas carboniladas (coeficiente padronizado B de 0,96; Correlação de Spearman $R^2 = 62\%$; Fig. 8; Tabela 3 e Tabela Complementar 1 nos anexos; IMAZUMI *et al.*, 2006). A GST de vesículas microssomais de fígado pode ser ativada em até 40% por alterações com espécies reativas de nitrogênio (IMAZUMI *et al.*, 2006; MUSCI *et al.*, 2006).

6.5. Envelhecimento e Reprodução:

Para facilitar a compreensão das alterações encontradas relacionadas ao envelhecimento concomitante com a atividade reprodutiva e o estresse oxidativo, a Figura 10 esquematiza e reúne o que estaria ocorrendo com o encéfalo dos ratos machos em cada um dos grupos.

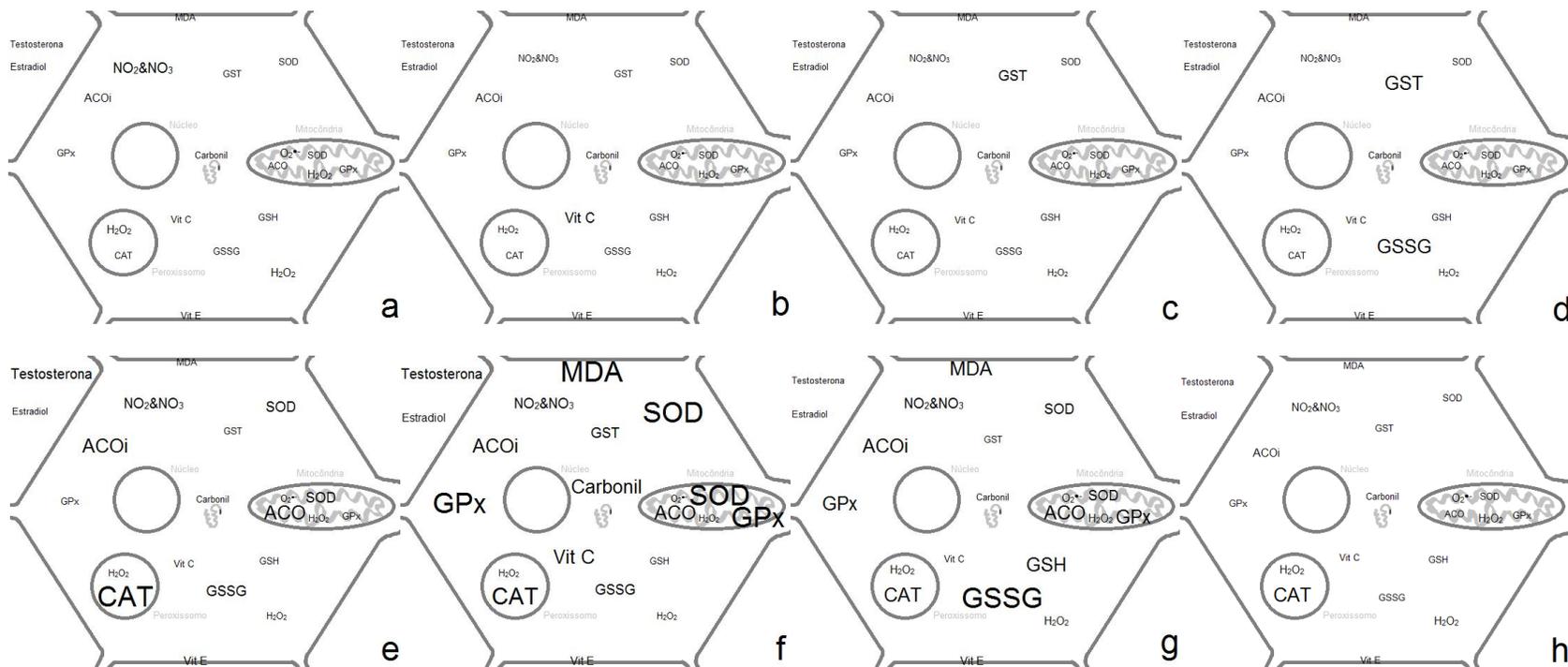


Fig. 9 – Representação esquemática das variações nos parâmetros estudados ao longo do envelhecimento no encéfalo dos animais machos reprodutores e não reprodutores. Os painéis (a), (b), (c) e (d) representam células dos animais não reprodutores de 3, 6, 12 e 24 meses, respectivamente. Os painéis (e), (f), (g) e (h) representam células dos animais reprodutores de 3, 6, 12 e 24 meses, respectivamente.

Os animais reprodutores de 3 meses recém iniciaram o período de atividade reprodutiva, já que o final da puberdade ocorre por volta do segundo mês de vida (aproximadamente 70 dias; KRINKE, 2000). Sugere-se o efeito hormético a esse grupo pela exposição ao estresse reprodutivo (fisiológico, social e oxidativo) e a adaptação a esse ciclo de estresse. Observa-se o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) e do metabolismo (ACO e ACOre), e os níveis de danos em lipídeos e proteínas se mantêm baixos e, portanto, os mecanismos de defesas dos animais expostos ao estresse da reprodução conseguem evitar os danos.

Não há atividade reprodutiva efetiva aos 24 meses, uma vez que o comportamento reprodutivo declina até a ausência deste a partir da idade de 12 meses. Após o período de um ano entre a presença de reprodução na idade de 12 meses e a ausência de reprodução nos animais de 24 meses, uma série de alterações é observada, levando a uma similaridade entre os grupos.

A Figura 11 apresenta, de forma esquemática, a rede de relações encontradas e os mecanismos propostos para essas relações, elucidando e simplificando processos redoxes, as correlações e as regressões encontradas.

A teoria de Williams, ou teoria do antagonismo pleiotrópico, aponta que a atividade reprodutiva imediata afeta a longevidade (WILLIAMS, 1957; TURKE, 2008). A influência se deve a alterações genéticas com efeito fenotípico direto e relacionado a ganho ou perda na capacidade reprodutiva no início do período

²**Cont. Fig. 9** – e 24 meses, respectivamente. As variações encontradas estão representadas de forma meramente ilustrativa com o aumento ou redução encontrados, representada pelo tamanho da fonte do parâmetro indicado.

reprodutivo e altera a longevidade proporcionalmente. Em outras palavras, uma mutação capaz de elevar o número de descendentes é capaz de ser selecionado positivamente mesmo levando a uma morte antecipada do organismo, e o contrário também é proposto nos casos em que o cuidado realizado pelos parentes mais velhos favorece o desenvolvimento e sucesso da prole (TURKE, 2008; MITTELDORF, 2004).

Analisando a teoria do “corpo descartável”, que aponta como causa do envelhecimento e morte a distribuição das reservas metabólicas entre a manutenção somática e o reparo e outras funções, e.g. reprodução, torna-se previsível o envelhecimento acentuado dos animais com elevada atividade reprodutiva, quando comparado com os sem atividade reprodutiva (KIRKWOOD, 1977; MITTELDORF, 2004; ESIRI, 2007). É observado que a reprodução tende a diminuir a expectativa de vida de muitos organismos, e.g. *Drosophila melanogaster* e *C. elegans* (FLATT, 2010). Mesmo assim, os mecanismos vinculados a mudanças no comportamento, metabolismo e outros processos fisiológicos e a atividade reprodutiva precisam ser elucidados (HARSHMAN & ZERA, 2006; SPEAKMAN, 2008).

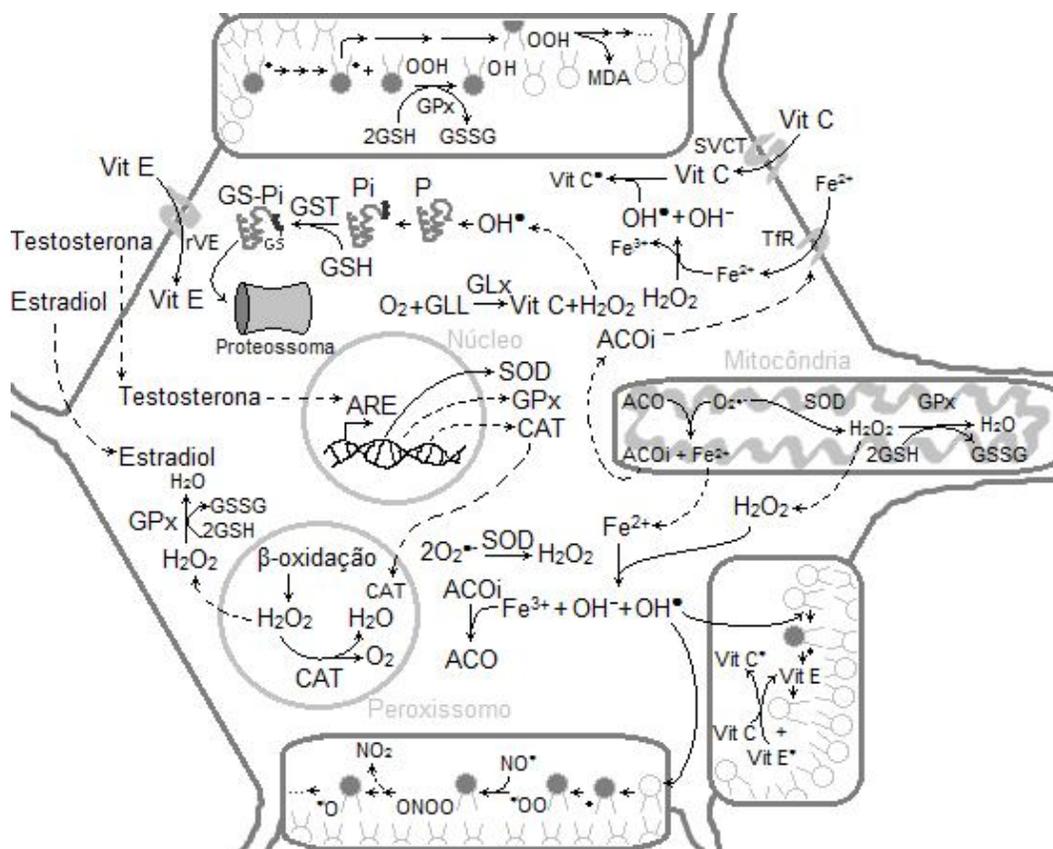


Fig. 11 – Representação esquemática de uma célula do sistema nervoso e as relações com os hormônios esteróides sexuais e moléculas relacionadas com o estresse oxidativo nos diversos compartimentos celulares. Na membrana plasmática, pode-se iniciar a peroxidação lipídica e formação de um lipídeo peroxidado, este pode ser degradado pela enzima GPx, oxidando glutationas, ou continuar reagindo, podendo formar o MDA; alternativamente, um radical lipídico pode reagir com a Vit E e formar o radical tocoferil (Vit E[•]), e este pode ser regenerado pela Vit C e formar o radical ascorbil (Vit C[•]); outra via possível está relacionada ao NO[•], em que um radical lipídico peroxil pode reagir com este, formando um peroxinitrito orgânico e este pode formar um nitrito (NO₂). Tanto a testosterona quanto o estradiol podem interagir com receptores de membrana e iniciar uma cascata de sinalização que podem induzir a transcrição de diversos mRNAs, e.g. relacionado ao ARE. A Vit C³

³**Cont. Fig. 11** – pode ser internalizada por SVCT; enquanto que a Vit E pode ser captada por diferentes receptores de membrana, aqui simplificados por receptor de vitamina E (rVE). No peroxissomo, diversas reações enzimáticas produzem H₂O₂, e.g. a β-oxidação, e essa molécula pode tanto difundir para o citosol quanto ser decomposta pela CAT. Na mitocôndria, a CTE produz O₂[•] que reage com a ACO, inativando-a, ou ser dismutado pela SOD, formando H₂O₂, que pode ser degradado pela GPx ou difundir para o citoplasma. No citosol, a ACO inativada (ACO_i) possui papel de regulação dos níveis de ferro, e.g. aumentando a tradução do receptor de transferrina (“Transferrin Receptor” – TfR), que aumenta os níveis de ferro intracelular e pode reativar a ACO. A enzima gulonolactona oxidase (GLx) oxida a gulonolactona (GLL) formando Vit C e H₂O₂. Algumas proteínas (P) sofrem ataque de radicais, perdendo sua função e se tornando uma proteína inativa (Pi); a GST pode conjugar uma GSH a essa Pi (GS-Pi), evitando agregação dessas Pi e podendo induzir a degradação via proteossoma. O Fe²⁺ liberado pela ACO pode reagir com o H₂O₂ e formar o radical mais reativo: OH[•], que poder reagir causando dano oxidativo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro trabalho a avaliar a atividade reprodutiva e o envelhecimento em mamíferos machos sob o ponto de vista do estresse oxidativo. As amplas alterações observadas no metabolismo, comportamento, fisiologia e outros parâmetros, apontam o estresse oxidativo como participante de todos os processos e possibilitaram embasamento sólido para as teorias observadas.

8. PERSPECTIVAS

Avaliar a longevidade relacionada à atividade reprodutiva em ratos machos.

Avaliar as vias relacionadas à sinalização nos neurônios que possuem relação entre resposta ao comportamento reprodutivo e as vias de defesas antioxidantes.

Avaliar o efeito do estresse oxidativo, reprodução e envelhecimento em outros órgãos de ratos machos e em fêmeas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU I.A. & CABELLI D.E. Superoxide dismutases - a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804:263-274, 2010.
- ALONZO-ALVAREZ C.; BERTRAND S.; DEVEVEY G.; PROST J.; FAIVRE B. & SORCI G. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* 7:363-368, 2004.
- ALONSO-ALVAREZ C.; BERTRAND S. & FAIVRE, B. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B* 274:819-825, 2007.
- ANANTHARAMAN M.; TANGPONG J.; KELLER J.N.; MURPHY M.P.; MARKESBERY W.R.; KININGHAM K.K & St. CLAIR D.K. β -Amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase. *American Journal of Pathology* 168:1608-1618, 2006.
- ANTUNES F.; HAN D.; RETTORI D. & CADENAS E. Mitochondrial damage by nitric oxide is potentiated by dopamine in PC12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1556:233-238, 2002.
- BAKY N.A.A.; ZAIDI Z.F.; FATANI A.J.; SAYED-AHMED M.M. & YAQUB H. Nitric oxide pros and cons: The role of L-arginine, a nitric oxide precursor, and idebenone, a coenzyme-Q analogue in ameliorating cerebral hypoxia in rat. *Brain Research Bulletin* 83:49-56, 2010.
- 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* 778:415-420, 1997.
- BARNES A.I. & PARTRIDGE L. Costing reproduction. *Animal Behaviour* 66:199-204, 2003.
- BARTESAGHI S.; FERRER-SUETAL G.; PELUFFO G.; VALEZ V.; ZHANG, H.; KALYANARAMAN B. & RADHAKRISHNAN R. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids* 32:501-515, 2007.
- BECKMAN K. B. & AMES B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78:547-581, 1998.
- BEINERT H.; KENNEDY M.C. & STOUT C.D. Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chemical Reviews* 96: 2335-2373, 1996.
- BERLETT B.S. & STADTMAN E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 272:20313-20316, 1997.
- BIENERT P. G.; MØLLER A.L.B.; KRISTIANSEN K.A.; SCHULZ A.; MØLLER I.M. & SCHJOERRING J.K. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 282:1183-1192, 2007.
- BODO C. A role for the androgen receptor in the sexual differentiation of the olfactory system in mice. *Brain Research Reviews* 57:321-331, 2008.
- BOSTANCI M.Ö.; BAS O. & BAGIRIEI F. Alpha-tocopherol decreases iron-induced hippocampal and nigral neuron loss. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30: 389-394, 2010.
- BOTA D.A. & DAVIES K.J.A. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nature Cell Biology* 4:674-680, 2002.

- BOTA D.A.; REMMEN H.V. & DAVIES K.J.A. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Letters* 532:103-106, 2002.
- BRADFORD M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976.
- BREWER G.J. Epigenetic oxidative redox shift (EORS) theory of aging unifies the free radical and insulin signaling theories. *Experimental Gerontology* 45:173-179, 2010.
- BRYAN N.S. & GRISHAM M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* 43:645-657, 2007.
- BUEMI M.; NOSTRO L.; ALOISI C.; COSENTINI V.; CRISEO M. & FRISINA N. Kidney aging: From phenotype to genetics. *Rejuvenation Research* 8:101-109, 2005.
- CELIK I.; TULUCE Y. & TURKER M. Antioxidant and immune potential marker enzymes assessment in the various tissues of rats exposed to indoleacetic acid and kinetin: a drinking water study. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86:180-185, 2006.
- CEMEK M.; BÜYÜKBEN A.; BÜYÜKOKUROGLU M.E; AYMELEK F. & TÜR L. Protective roles of vitamin E (α -tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 113-118, 2010.
- CIRIOLO M.R.; MARASCOB M.R.; IANNONEC M.; NISTICO G. & ROTILIO G. Decrease of immunoreactive catalase protein in specific areas of ageing rat brain. *Neuroscience Letters* 228:21-24, 1997.
- COMICHAU F.M. & STÜLKE J. Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Molecular Microbiology* 67:692-702, 2008.
- DELAVAL E.; PERICHON M. & FRIGUET B. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *European Journal of Biochemistry* 271:4559-4564, 2004.
- EREL O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 38:1103-1111, 2005.
- ESIRI M.M. Ageing and the brain. *Journal of Pathology* 211:181-187, 2007.
- FLATT T. Survival Costs of Reproduction in *Drosophila*. *Experimental Gerontology, in press*.
- FLOCCARI F.; ALOISI C.; CRASCI E.; SOFI T.; CAMPO S.; TRIPODO D.; CRISEO M.; FRISINA N. & BUEMI M. Oxidative stress and uremia. *Medicinal Research Reviews* 25:473-486, 2005.
- GARTHWAITE J.; CHARLES S.L. & CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388, 1988.
- GARTHWAITE J. & BOULTON C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Review of Physiology* 57:683-706, 1995.
- GOHIL K.; OOMMEN S.; QUACH H.T.; VASU V.T.; AUNG H.H.; SCHOCK B.; CROSS C.E. & VATASSERY G.T. Mice lacking α -tocopherol transfer protein gene have severe α -tocopherol deficiency in multiple regions of the central nervous system. *Brain Research* 1201: 167-176, 2008.

- GUEVARA R.; SANTANDREU F.M.; VALLE A.; GIANOTTI M.; OLIVER J. & ROCA P. Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free radicals in biology and medicine* 46:169-175, 2009.
- HALLIWEL B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytologist* 73:1075-1086, 1974.
- HALLIWEL B. & GUTTERIDGE J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*, 4a Oxford university press, 2007.
- HAMILTON J.B. & MESTLER G.E. Mortality and survival. Comparison of eunuchs with intact men and women in a mentally retarded population. *Journals of Gerontology* 24:395-411, 1969.
- HAN D.; CANALI R.; GARCIA J.; AGUILERA R.; GALLAHER T.K. & CADENAS E. Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. *Biochemistry* 44:11987-11996, 2005
- HANDA R.J.; WEISER M.J. & ZULOAGA D.G. A role for the androgen metabolite, 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, in modulating oestrogen receptor b-mediated regulation of hormonal stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology* 21:351-358, 2009.
- HARMAN D. Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journal Gerontology* 11: 298-300, 1956.
- HARRISON F.E.; DAWES S.M.; MEREDITH M.E.; BABAIEV V.R.; LI L.; MAY J.M. Low vitamin C increased oxidative stress cell death in mice that lack the sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 821-829, 2010.
- HARSHMAN L.G. & ZERA A.J. The cost of reproduction: the devil in the details. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22: 80-86, 2006.
- HAYASHI K.; NOGUCHI N. & NIKI E. Action of nitric oxide as an antioxidant against oxidation of soybean phosphatidylcholine liposomal membranes. *FEBS Letters* 370:37-40, 1995.
- HIPKISS A. R. Accumulation of altered proteins and ageing: Causes and effects. *Experimental gerontology* 41:464-473, 2006.
- HIRAMOTO K.; OHKAWA T.; OIKAWA N. & KIKUGAWA K. Is nitric oxide (NO) an antioxidant or a prooxidant for lipid peroxidation? *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 51:1046-1050, 2003.
- HO Y.; MAGNENAT J.L.; BRONSON R.T.; CAO J.; GARGANO M.; SUGAWARA M. & FUNK C.D. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry* 272: 16644-16651, 1997.
- HOGG N. & KALYANARAMAN B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411:378-384, 1999.
- HULL E.M. & DOMINGUEZ J.M. Sexual behavior in male rodents. *Hormones and Behavior* 52:45-55, 2007.
- IMAIZUMI N.; MIYAGI S. & ANIYA Y. Reactive nitrogen species derived activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase. *Life Sciences* 78:2998-3006, 2006.
- ISLER K. & van SCHAİK C.P. The expensive brain: A framework for explaining evolutionary changes in brain size. *Journal of Human Evolution* 57:392-400, 2009.

- KASAPOGLU M. & ÖZBEN T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Experimental Gerontology* 36:209-220, 2001.
- KEELE B.B.; McCORD J.M.; FRIDOVICH I. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B – A new manganese-containing enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 245:6176-6181, 1970.
- KIRKWOOD T.B.L. Evolution of ageing. *Nature* 270:301-304, 1977.
- KONDO Y.; SASAKI T.; SATO Y.; AMANO A.; AIZAWA S.; IWAMA M.; HANDA S.; SHIMADA N.; FUKUDA M.; AKITA M.; LEE J.; JEONG K.; MARUYAMA N. & ISHIGAMI A. Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377:291-296, 2008.
- KREBS H.A. & HOLZACH O. The conversion of citrate into *cis*-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase. *Biochemical Journal* 52:527-528, 1952.
- KRINKE G.J. *The handbook of experimental animals: the laboratory rat*. New York: Academic Press, 2000.
- LEVINE R. L. & STADTMAN E. R. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology* 36:1495-1502, 2001.
- LI X.; HUANG J. & MAY J.M. Ascorbic acid spares α -tocopherol and decreases lipid peroxidation in neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305: 656-661, 2003.
- LIMA E.S.; BONINI M.G.; AUGUSTO O.; BARBEIRO H.V.; SOUZA H.P. & ABDALLA D.S.P. Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radical Biology & Medicine* 39:532-539, 2005.
- LINNANE A.W.; KIOS M. & VITETTA L. Healthy aging: regulation of the metabolome by cellular redox modulation and prooxidant signaling systems: the essential roles of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Biogerontology* 8: 445-467, 2007.
- MARKLUND S.L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79:7634-7638, 1982.
- MATSUMOTO M.; IMAGAWA M. & YASUNOBU A. Epidermal growth factor regulation of glutathione S-transferase gene expression in the rat is mediated by class Pi glutathione S-transferase enhancer I. *Biochemical Journal* 349:225-230, 2000.
- MATSUMOTO T.; SHIJNA H.; KAWANO H.; SATO T. & KATO S. Androgen receptor functions in male and female physiology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 109:236-241, 2008.
- McCORD J.M. & FRIDOVICH I. Superoxide dismutase – An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 244:6049-6055, 1969.
- McINTYRE M.; BOHR D.F. & DOMINICZAK A.F. Endothelial function in hypertension : the role of superoxide anion. *Hypertension* 34:539-545, 1999.
- MEDVEDEVA L.V.; POPOVA T.N.; ARTYUKHOV V.G. & MATASOVA L.V. Catalytic properties of cytoplasmic and mitochondrial aconitate hydratase from rat cardiomyocyte. *Biology Bulletin* 29:426-430, 2002.

- MILES D.B.; SINERVO B.; HAZARD L.C.; SVENSSON E.I & COSTA D. Relating endocrinology, physiology and behaviour using species with alternative mating strategies. *Functional Ecology* 21: 654-665, 2007.
- MITTELDORF J. Ageing selected for its own sake. *Evolutionary Ecology Research* 6:1-17, 2004.
- MONTINE T.J.; NEELY M.D.; QUINN J.F.; BEAL M.F.; MARKESBERY W.R.; ROBERTS II L.J. & MORROW J.D. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 33:620-626, 2002.
- MURAKAMI Y.; UCHIDA K.; RIJLI F.M. & KURATANI S. Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans. *Developmental Biology* 280:249-259, 2005.
- MUSCI G.; PERSICHINI T.; CASADEI M.; MAZZONE V.; VENTURINI G.; POLITICELLI F. & COLASANTI M. Nitrosative/oxidative modifications and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 127:544-551, 2006.
- MUSCI G.; PERSICHINI T.; CASADEI M.; MAZZONE V.; VENTURINI G.; POLITICELLI F. & COLASANTI M. Nitrosative/oxidative modifications and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 127:544-551, 2006.
- NIESCHLAG E.; NIESCHLAG S. & BEHRE H.M. Lifespan and testosterone. *Nature* 366: 215,1993.
- NISHIDA Y.; ITO S.; OHTSUKI S.; YAMAMOTO N.; TAKAHASHI T.; IWATA N.; JISHAGE K.; YAMADA H.; SASAGURI H.; YOKOTA S.; PIAO W.; TOMIMITSU H.; SAIDO T.C.; YANAGISAWA K.; TERASAKI T.; MIZUSAWA H. & YOKOTA T. Depletion of vitamin E increases amyloid β accumulation by decreasing its clearances from brain and blood in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 33400-33408, 2009.
- RATTAN S.I. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radical Research* 40: 1230-1238, 2006.
- RAZMARA A.; DUCKLES S.P.; KRAUSE D.N. & PROCACCIO V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Research* 1176: 71- 81, 2007.
- RAZMARA A.; SUNDAY L.; STIRONE C.; WANG X.B.; KRAUSE D.N.; DUCKLES S.P. & PROCACCIO V. Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor α in brain endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325: 782-790, 2008.
- RIGOTTI A. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine* 28: 423-436, 2007.
- ROMEO R.D.; PARFITT D.B.; RICHARDSON H.N. & SISK C.L. Pheromones elicit equivalent levels of Fos-Immunoreactivity in prepubertal and adult male Syrian hamsters. *Hormones and Behavior* 34:48-55, 1998.
- ROMEO R.D.; RICHARDSON H.N. & SISK C.L. Puberty and the maturation of the male brain and sexual behavior: recasting a behavioral potential. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26:381-391, 2002.
- ROSELLI C.E.; THORNTON J.E. & CHAMBERS K.C. Age-related deficits in brain estrogen receptors and sexual behavior of male rats. *Behavioral Neuroscience* 107:202-209, 1993.
- RUBBO H. & RADI R. Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780:1318-1324, 2008.
- SANTIAGO A.P.S.A.; CHAVES E.A.; OLIVEIRA M.F. & GALINA A. Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases:

- Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie* 90: 15660-1577, 2008.
- SASTRE J.; PALLARDO F.V. & VIÑA J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology & Medicine* 35:1-8, 2003.
- SCHULZ K.M.; RICHARDSON H.N.; ROMEO R.D.; MORRIS J.A.; LOOKINGLAND K.J. & SISK C.L. Medial preoptic area dopaminergic response to female pheromones develop during puberty in male Syrian hamster. *Brain Research* 988:139-145, 2003.
- SCHULZ K.M.; RICHARDSON H.N.; ZEHR J.L.; OSETEK A.J.; MENARD T.A. & SISK C.L. Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. *Hormones and Behavior* 45: 242-249, 2004.
- SHIREEN K.F.; PACE R.D.; MAHBOOB M. & KHAN A.T. Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats. *Food and Chemical Toxicology* 46:3290-3294, 2008.
- SOHAL R.S.; KAMZALOV S.; SUMIEN N.; FERGUSON M.; REBRIN I.; HEINRICH R.K. & FORSTER M.J. Effect of coenzyme Q10 intake on endogenous coenzyme Q content, mitochondrial electron transport chain, antioxidative defenses, and life span of mice. *Free Radical Biology & Medicine* 40: 480-487, 2006.
- SOKOLOVA T.; GUTTERER J.M.; HIRRLINGER J.; HAMPRECHT B. & DRINGEN R. Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. *Neuroscience Letters* 297:129-132, 2001.
- SPEAKMAN J.R. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363:375-398, 2008.
- SPECTOR R. & JOHANSON C.E. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on vitamins B and E. *Journal of Neurochemistry* 103:425-438, 2007
- STADTMAN E.R. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research* 40:1250-1258, 2006.
- TEIXEIRA H.D.; SHUMACHER R.I. & MENEGHINI R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:7872-7875, 1998.
- TIAN L.; CAI Q. & WEI H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radical Biology & Medicine* 24: 1477-1484, 1998.
- TONG W. & ROUAULT T. A. Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis. *Biometals* 20: 549-564, 2007.
- TSAY H.J.; WANG P.; WANG S.L. & KU H.H. Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. *Journal of Biomedical Sciences* 7:466-474, 2000.
- TURKE P.W. Williams's theory of the evolution of senescence: still useful at fifty. *The Quarterly Review of Biology* 83:243-256, 2008.
- VIÑA J.; BORRÁS 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* 579:2541-2545, 2005.
- WANG Y.; SALMON A.B. & HARSHMAN L.G. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 36:1349-1359, 2001.
- WILLIAMS G.C. Pleiotropy,, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11:398-411, 1957.
- WONG C.M.; MARCOCCI L.; LIU L.L. & SUZUKI Y.J. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling* 12:393-404, 2010.
- 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* 127:79-84, 2006.
- YOSHIDA Y.; ITOH N.; HAYAKAWA M.; HABUCHI Y.; SAITO Y.; TSUKAMOTO Y.; CYN Shi O.; JISHAGE K.; ARAI H. & NIKI E. The role of α -tocopherol in motor hypofunction with aging in α -tocopherol transfer protein knockout mice as assessed by oxidative stress biomarkers. *Journal of Nutritional Biochemistry* 21: 66-76, 2010.
- ZECCA L.; YODIM M.B.; RIEDERER P.; CONNOR J.R. & CRICHTON R.R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Review Neuroscience*, 5: 863-873, 2004.
- ZIRKIN B.R. & CHEN H. Regulation of leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of Reproduction* 63:977-981, 2000.

10. ANEXO 1 Tabela Complementar 1

Tabela Complementar 1. Regressão Linear (método *stepwise*) entre os parâmetros analisados em encéfalo e soro de ratos machos de 3, 6, 12 e 24 meses, reprodutores e não reprodutores. Distintos modelos foram empregados para determinar os diferentes regressores. Valores considerados significantes para um valor $P \leq 0,05$.

Variável dependente	Regressor	Passo	R ² cru	R ² ajustado	B padronizado	P
CAT ^a	Idade	1	0,75	0,71	-0,78	≤ 0,001
	GPx	2			-0,59	≤ 0,001
GPx ^b	SOD	1	0,55	0,50	0,61	0,001
	MDA	2			0,35	0,040
SOD ^c	Testosterona	1	0,38	0,33	0,61	0,015
GST ^d	Carbonil	1	0,85	0,83	0,96	≤ 0,001
	Idade	2			0,23	0,032
ACO ^e	GSH	1	0,68	0,64	0,69	≤ 0,001
	Idade	2			-0,30	0,041
ACOre ^f	Testosterona	1	0,66	0,63	0,35	0,009
MDA ^g						
Carbonil ^h	Vit C	1	0,90	0,89	0,50	≤ 0,001
NO ₂ &NO ₃ ⁱ	Vit E	1	0,64	0,60	0,46	≤ 0,001
	Idade	2			-0,31	0,012
	MDA	3			0,29	0,019
TOS ^j						
Vit C ^k	Carbonil	1	0,85	0,84	0,92	≤ 0,001
Vit E ^l	NO ₂ &NO ₃	1	0,56	0,53	0,58	≤ 0,001
	ACO	2			0,33	0,013
GSHt ^m	MDA	1	0,82	0,80	0,65	≤ 0,001
	ACO	2			0,65	≤ 0,001
	ACOre	3			-0,39	0,021

Cont. Tabela Complementar 1.

Variável dependente	Regressor	Passo	R ² cru	R ² ajustado	B padronizado	P
GSH ⁿ	MDA	1	0,79	0,77	0,53	≤ 0,001
	ACO	2			0,85	≤ 0,001
	ACORE	3			-0,48	0,017
GSSG ^o	GPx	1	0,60	0,56	0,77	0,002
Testosterona	Idade	1	0,29	0,26	-0,53	0,003
Estradiol						

Variáveis incluídas nos modelos:

^aSOD, GST e testosterona.

^bCAT, GST, ACO, Vit C e GSSG.

^cGPx, CAT e TOS.

^dGPx, CAT, ACO, Vit C e GSSG.

^eGPx, MDA, Vit E, GSht e testosterona.

^fGPx, TOS, Vit C, Vit E, GSht e GSH.

^gGPx, ACO, ACORE, NO₂&NO₃, GSht, GSH, Vit E, Idade e Testosterona.

^hGST, TOS, GSht e GSH.

ⁱGSht, GSH e Testosterona.

^jSOD, ACORE, Carbonil e VitC.

^kGPx, TOS, ACORE e Idade.

^lACORE, MDA, TOS, GSht, GSH, GSSG e Idade.

^mGPx, Vit E, Carbonil e NO₂&NO₃.

ⁿVit E, Carbonil e NO₂&NO₃.

^oGST, Vit E e Idade.

11. ANEXO 2 Currículum Vitae

Alabarse, P. V. G.
Alabarse, Paulo Vinicius Gil

Dados Pessoais

Nome: Paulo Vinicius Gil Alabarse.
Data de Nascimento: 03 de abril de 1987.
Local: Porto Alegre, RS, Brasil.
Telefone: (051) 9132-6959
e-mail: vgalabarse@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2009 - Atual Mestrado em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

2005 - 2008 Graduação em Ciências Biológicas.
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Formação Complementar

2010 Extensão Universitária em Curso de Idiomas: NELE Alemão 6 - UFRGS.
2010 Extensão Universitária em Curso de Idiomas: NELE Alemão 5 - UFRGS.
2009 Extensão Universitária em Curso de Idiomas: NELE Alemão 4 - UFRGS.
2009 Extensão Universitária em Curso de Idiomas: NELE Alemão 3 - UFRGS.
2008 Extensão Universitária em Curso de Idiomas: NELE Alemão 2 - UFRGS.
2008 Extensão Universitária em Curso de Idiomas: NELE Alemão 1 - UFRGS.
2007 Extensão Universitária em Curso Avançado em Metodologia de Radioisótopos – Biociências Nucleares – CNEN.
2003 Curso de Idiomas: Intersections 4 – Instituto de Idiomas Yázigi.
2003 Curso de Idiomas: Intersections 3 – Instituto de Idiomas Yázigi.
2002 Curso de Idiomas: Intersections 2 – Instituto de Idiomas Yázigi.
2002 Curso de Idiomas: Intersections 1 – Instituto de Idiomas Yázigi.
2001 Curso de Idiomas: Inter English 4 – Instituto de Idiomas Yázigi.
2001 Curso de Idiomas: Inter English 3 – Instituto de Idiomas Yázigi.
2000 Curso de Idiomas: Inter English 2 – Instituto de Idiomas Yázigi.
2000 Curso de Idiomas: Inter English 1 – Instituto de Idiomas Yázigi.
1999 Curso de Idiomas: Teen Mate 4 – Instituto de Idiomas Yázigi.
1999 Curso de Idiomas: Teen Mate 3 – Instituto de Idiomas Yázigi.
1998 Curso de Idiomas: Teen Mate 2 – Instituto de Idiomas Yázigi.
1998 Curso de Idiomas: Teen Mate 1 – Instituto de Idiomas Yázigi.

Estágios

1/2006 - 12/2008 Instituto de Biociências

- Determinação da expressão e atividade enzimática das defesas antioxidantes em ratos ao longo do envelhecimento.

Produção Bibliográfica

Artigos Completos Publicados em Periódicos

1. Alabarse, Paulo Vinicius Gil; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Medeiros, Tássia Machado; Mendes, Marcus Fabiano Almeida; Viacava, Paula Ramos;

Schüller, Ártur Krumberg; Salomon, Tiago Boeira; Ehrenbrink, Guilherme; Benfato, Mara Silveira. Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. *Experimental Gerontology*, v. 46, p. 241-248, 2010.

1. Abegg, Maxwell A.; Lucietto, Rodrigo; Alabarse, Paulo V. G.; Mendes, Marcus F. A.; Benfato, Mara Silveira. Differential resistance to oxidants and production of hydrolytic enzymes in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, v. 171, p. 35-41, 2010.
2. Abegg, Maxwell Adriano; Alabarse, Paulo Vinicius Gil; Casanova, Anderson; Hoscheid, Jaqueline; Salomon, Tiago Boeira; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Medeiros, Tássia Machado; Benfato, Mara Silveira. Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia*, v. 170, p. 11-20, 2010.
3. Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Alabarse, P. V. G.; Ehrenbrink, Guilherme; Benfato, Mara Silveira. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochemistry and Function*, v. 27, p. 378-382, 2009.

Apresentação em Eventos e Publicação de Resumos.

1. Alabarse, P. V. G.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Medeiros, T. M.; Mendes, M. F. A.; Viacava, P. R.; Schüller, A. K.; Salomon, Tiago Boeira; Ehrenbrink, Guilherme; Benfato, Mara Silveira. Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. In: Annual Meetings of Society for Free Radical Research & The European Environmental Mutagen Society, 2010, Oslo. Programme & Abstracts, p. 219-219.
2. Alabarse, P. V. G.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Medeiros, T. M.; Mendes, M. F. A.; Viacava, P. R.; Schüller, A. K.; Salomon, Tiago Boeira; Ehrenbrink, Guilherme; Benfato, Mara Silveira. Estresse oxidativo e envelhecimento no cérebro de ratos machos reprodutores. In: XII Reunião anual do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular do centro de biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 83-83.
3. Alabarse, P. V. G.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Ehrenbrink, Guilherme; Benfato, Mara Silveira. Oxidative stress in the brain of reproductive male rats. In: Free Radicals and Antioxidants in Chile, 2009, Santiago. Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009. Salviat Impresores, p. 136-136.
4. Viacava, P. R.; Medeiros, T. M.; Salomon, Tiago Boeira; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Benfato, Mara Silveira. Pulmonary antioxidant enzymatic activities and protein damage in male rats during the aging. In: Free Radicals and Antioxidants in Chile, 2009, Santiago. Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009. Salviat Impresores, p. 135-135.
5. Medeiros, T. M.; Klein, C.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Suris, F. M.; Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Martinez, D.; Benfato, Mara Silveira. Prohepcidin in obstructive sleep apnea syndrome. In: Free Radicals and Antioxidants in Chile, 2009, Santiago. Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009. Salviat Impresores, p. 137-137.
6. Mendes, M. F. A.; Abegg, M.; Medeiros, T. M.; Hackenhaar, Fernanda

- Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Schüller, A. K.; Benfato, Mara Silveira. Protein and lipid damage sensitive in candidas sp. In: Free Radicals and Antioxidants in Chile, 2009, Santiago. Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009. Salviat Impresores, p. 140-140.
7. Schüller, A. K.; Klein, C.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Suris, F. M.; Medeiros, T. M.; Martinez, D.; Benfato, Mara Silveira. Malondialdehyde (mda) and vitamin c levels in non-smokers with coronary artery disease (cad). In: Free Radicals and Antioxidants in Chile, 2009, Santiago. Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009. Salviat Impresores, p. 161-161.
 8. Salomon, Tiago Boeira; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Benfato, Mara Silveira. Catalase (cat), superoxide dismutase (sod) and glutathione peroxidase (gpx) activities and the protein carbonylation in naïve and experienced male rats gonads. In: Free Radicals and Antioxidants in Chile, 2009, Santiago. Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009. Salviat Impresores, p. 193-193.
 9. Viacava, P. R.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Medeiros, T. M.; salomon, Tiago Boeira; Benfato, Mara da Silveira. Dano oxidativo em proteína e atividade das enzimas antioxidantes no pulmão de ratos machos durante o envelhecimento. In: XXI Salao de Iniciacao Cientifica, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos do XXI Salao de Iniciacao Cientifica.
 10. Medeiros, T. M.; Klein, C.; Martinez, D.; Suris, F. M.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Benfato, Mara da Silveira. Pró-hepcidina na síndrome da apnéia e hipopnéia obstrutiva do sono. In: XXI Salao de Iniciacao Cientifica, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos do XXI Salao de Iniciacao Cientifica.
 11. Mendes, M. F. A.; Schüller, A. K.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Abegg, M.; Alabarse, P. V. G.; Medeiros, T. M.; Salomon, Tiago Boeira; Benfato, Mara da Silveira . Sensibilidade a danos em proteína e lipídios em candidas sp. In: XXI Salao de Iniciacao Cientifica, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos do XXI Salao de Iniciacao Cientifica.
 12. Schüller, A. K.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Mendes, M. F. A.; Viacava, P. R.; Alabarse, P. V. G.; Benfato, Mara Silveira. Níveis de dano oxidativo em proteínas e atividade da enzima catalase em ratos expostos à fumaça. In: XXI Salão de Iniciação Científica, 2009, Porto Alegre. XXI Salão de Iniciação Científica - Resumos.
 13. Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Klein, C.; Medeiros, T. M.; Alabarse, P. V. G.; Martinez, D.; Benfato, Mara Silveira. Estresse oxidativo e hórmonios esteróides na associação entre doença aterosclerótica coronariana (dac) e distúrbio respiratório do sono (drs). In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, p. 37-37.
 14. Abegg, M.; Alabarse, P. V. G.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Mendes, M. F. A.; Schüller, A. K.; MEDEIROS, T. M.; Benfato, Mara Silveira. Response to oxidative stress in eight human pathogenic species of the Genus Candida. In: XI Reunião Anual do

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009. Livro de Resumos PPGBCM, p. 87-87.

15. Alabarse, P. V. G.; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Medeiros, T. M.; Benfato, Mara Silveira. Active reproduction, aging, and oxidative stress in the brain. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, p. 100-100.
16. Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Benfato, Mara da Silveira. Brain and ageing: oxidative stress profile in reproductive male rats. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting, p. 122-122.
17. Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Alabarse, P. V. G.; Benfato, Mara da Silveira. Antioxidant enzymes activities in kidney of naïve and experienced male rats. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting, p. 122-122.
18. Salomon, Tiago Boeira; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Benfato, Mara da Silveira. Catalase (cat), superoxide dismutase (sod) and glutathione peroxidase (gpx) activities in naïve and experienced male rats gonads. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting, p. 129-129.
19. Medeiros, T. M.; Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Benfato, Mara da Silveira. Pulmonary antioxidant enzymes activity and protein damage in female rats of 3, 6, 12, and 20 months of age. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting, p. 130-130.
20. Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Benfato, Mara da Silveira. Estresse oxidativo e envelhecimento no cérebro: perfil reprodutivo em ratos machos. In: XX Salão de Iniciação Científica, 2008, Porto Alegre. Livro de Resumos. Editora da UFRGS, p. 324-325.
21. Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Benfato, Mara da Silveira. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities and protein damage in brains of naïve and experienced male rats. In: V meeting of SFRBM - South American Group and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. Free Radicals in Montevideo 2007 - Book of Abstracts. Montevideo : Imprensa Gega s.r.l., p. 111-111.
22. Hackenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Tiago Boeira; Benfato, Mara da Silveira. Pulmonary activities of antioxidant enzymes and protein damage in naïve and experienced male rats. In: V meeting of SFRBM - South American Group and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. Free Radicals in

Montevideo 2007 - Book of Abstracts. Montevideo : Imprensa Gega s.r.l., p. 59-59.

23. Salomon, Tiago Boeira; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Benfato, Mara da Silveira. Catalase (cat), superoxide dismutase (sod), glutathione peroxidase (gpx) activities and the protein carbonylation among naive and experienced male rat heart. In: V meeting of SFRBM - South American Group and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. Free Radicals in Montevideo 2007 - Book of Abstracts. Montevideo: Imprensa Gega s.r.l., p. 120-120.
24. Alabarse, P. V. G.; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Benfato, Mara da Silveira. Atividade de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e dano em proteína em cérebro de ratos machos experientes ou inocentes. In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos. Editora da UFRGS, p. 467-467.
25. Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Benfato, Mara da Silveira. Comparação da atividade pulmonar de enzimas antioxidantes e dano em proteína em ratos machos reprodutores e não reprodutores. In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre. Livro de resumos. Editora da UFRGS, p. 467-468.
26. Salomon, Tiago Boeira; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Benfato, Mara da Silveira. Atividades das enzimas catalase (cat), superóxido dismutase (sod), glutathione peroxidase (gpx) e a carbonilação de proteínas no coração de ratos machos com e sem atividade reprodutiva. In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos. Editora da UFRGS, p. 468-468.
27. Alabarse, P. V. G.; Bins, Sofia Costa; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Ehrenbrink, Guilherme; Dornelles, Paula; Benfato, Mara da Silveira. Atividade enzimática da catalase e superóxido dismutase em ratos machos de 12 meses reprodutores e não reprodutores. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 384-384.
28. Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Alabarse, P. V. G.; Bins, Sofia Costa; Ehrenbrink, Guilherme; Dornelles, Paula; Benfato, Mara da Silveira. Comparação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase entre ratos machos reprodutores e não-reprodutores. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 384-384.
29. Salomon, Tiago Boeira; Alabarse, P. V. G.; Bins, Sofia Costa; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Ehrenbrink, Guilherme; Dornelles, Paula; Benfato, Mara da Silveira. Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase cardíacas entre ratos machos reprodutores e não-reprodutores. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 384-384.
30. Bins, Sofia Costa; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Alabarse, P. V. G.; Ehrenbrink, Guilherme; Dornelles, Paula; Benfato, Mara da Silveira. Verificação das atividades de superóxido dismutase (sod) e

- catalase (cat) em gônadas de ratos machos reprodutores e não-reprodutores. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, p. 384-385.
31. Alabarse, P. V. G.; Bins, Sofia Costa; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Ehrenbrink, Guilherme; Dornelles, Paula; Benfato, Mara da Silveira. Atividade enzimática da catalase e superóxido dismutase em ratos machos de 12 meses reprodutores e não-reprodutores. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, p. 2-2.
 32. Bins, Sofia Costa; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Alabarse, P. V. G.; Ehrenbrink, Guilherme; Dornelles, Paula; Benfato, Mara da Silveira. Verificação das atividades de superóxido dismutase (sod) e catalase (cat) em gônadas de ratos machos reprodutores e não-reprodutores. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, p. 11-11.
 33. Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Bins, Sofia Costa; Alabarse, P. V. G.; Ehrenbrink, Guilherme; Dornelles, Paula; Benfato, Mara da Silveira. Comparação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase pulmonares entre ratos machos reprodutores e não-reprodutores. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, p. 43-43.
 34. Salomon, Tiago Boeira; Alabarse, P. V. G.; Bins, Sofia Costa; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Ehrenbrink, Guilherme; Dornelles, Paula; Benfato, Mara da Silveira. Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase cardíacas entre ratos machos reprodutores e não-reprodutores. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, p. 96-96.
 35. Benfato, Mara da Silveira; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Salomon, Tiago Boeira; Alabarse, P. V. G. Aprendizado usando o princípio da redescoberta. In: 2 Salão de Ensino a Distância. Anais do 2º Salão de Educação a Distância. Porto Alegre : editora da UFRGS, 2006.

Produção Técnica

Softwares Sem Registro de Patente

1. Benfato, Mara da Silveira; Salomon, Tiago Boeira; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Marcolin M.I. Controle de pH em Mamíferos. 2008.
2. Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Benfato, Mara da Silveira. Dano oxidativo no DNA. 2007.
3. Alabarse, P. V. G.; Salomon, Tiago Boeira; Hachenhaar, Fernanda Schäfer; Benfato, Mara da Silveira. Replicação de DNA. 2006.

Eventos

Participação em Eventos

1. Annual Meetings of Society for Free Radical Research & The European Environmental Mutagen Society in Oslo. 2010.
2. Free Radicals and Antioxidants in Chile. 2009.
3. XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB. 2008.
4. I Workshop em Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente. 2007.
5. V meeting of SFRBM - South American Group and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species. 2007.
6. VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. 2006.
7. I Curso de Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. 2007.
8. A Guerra Fria e o Começo da Corrida Nuclear - 1954-1964. 2006.
9. 2 Salão de Ensino a Distância. 2006.
10. Aplicações Terapêuticas das Células Tronco. 2006.
11. XX Salão de Iniciação Científica. 2008.
12. XIX Salão de Iniciação Científica. 2007.
13. XVIII Salão de Iniciação Científica. 2006.
14. XVIII Salão de Iniciação Científica. 2006.

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

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