

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

ANTIOXIDANTES RESTAURAM ALTERAÇÕES PROVOCADAS PELA
OVARIECTOMIA NO FÍGADO DE RATAS

Dissertação de Mestrado

Ártur Krumberg Schüller

Porto Alegre, fevereiro de 2016

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

ANTIOXIDANTES RESTAURAM ALTERAÇÕES PROVOCADAS PELA
OVARIECTOMIA NO FÍGADO DE RATAS

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como um dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aluno: Ártur Krumberg Schüller

Orientadora: Profa. Dra. Mara da Silveira Benfato

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo, do Departamento de Biofísica da UFRGS. Teve apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS.

"A vida é aquilo que acontece enquanto você está planejando o futuro."

John Lennon

AGRADECIMENTOS

Em especial à doutora Mara da Silveira Benfato, pela oportunidade, paciência e ensinamentos transmitidos nesse período.

Aos doutores Itabajara Vaz e Rogério Margis por terem aberto as portas dos seus laboratórios para a execução de experimentos.

Aos doutores José Arthur Bogo Chies e Fernanda Stanisçuaski, por sempre estarem disponíveis para auxiliar ao longo desse período.

Aos amigos do laboratório, que foram muito importantes tanto na hora dos experimentos, quanto na hora da descontração.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPq.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1.1 ESPÉCIES REATIVAS	13
1.2 A OVARECTOMIA EM RATAS COMO MODELO DE MENOPAUSA.....	16
1.3. ESTROGÊNIO.....	19
1.4 CICLO ESTRAL.....	21
1.5 ESPÉCIES REATIVAS IMPORTANTES NO PONTO DE VISTA CLÍNICO NA MENOPAUSA	22
1.5.1 O SUPERÓXIDO NA MENOPAUSA.....	22
1.5.2 ÓXIDO NÍTRICO NA MENOPAUSA	23
1.6 O FÍGADO NA MENOPAUSA.....	25
1.7 DANO OXIDATIVO EM PROTEÍNAS.....	27
1.8 DANO OXIDATIVO EM LIPÍDIOS.....	29
1.9 DEFESAS ANTIOXIDANTES	31
1.10 ÔMEGA 3	32
1.11 ÁCIDO LIPOICO.....	34
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. OBJETIVO PRIMÁRIO.....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 ARTIGO CIENTÍFICO 1	38
5 ARTIGO CIENTÍFICO 2	61
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONCLUSÃO.....	95
8 PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS	124
CURRICULUM VITAE	128

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AL	Ácido Lipoico
ALA	Ácido alfa linoleico
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALR	Aldose redutase
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
Cis	Cisteína
CuZnSOD	Superóxido dismutase cobre e zinco
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
NFK β	Fator Nuclear de Transcrição Kappa B
Foxo3a	Fator de transcrição forkheadbox O3a
Gli	Glicina
GPx	Glutaciona peroxidase
GRed	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S – transferase
His	Histidina

HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HOCl	Ácido hipocloroso
IL	Interleucina
Lis	Lisina
MDA	Malondialdeído
Met	Metionina
MnSOD	Superóxido dismutase manganês
NADPH	Dicotinamina adenine dinucleotídio fosfato
ONe	Óxido nítrico sintase endotelial
ONE	4-oxo-2-nonenal
ONi	Óxido nítrico sintase induzível
ONn	Óxido nítrico sintase neuronal
Ons	Óxido nítrico sintase
OVX	Ovariectomizadas
RE- α	Receptores de estrogênio alfa
RE- β	Receptores de estrogênio beta
RNs	Receptores nucleares
SHAM	Processo cirúrgico sem ovariectomia
Sirt1	Sirtuína 1
Sirt3	Sirtuína 3
SODs	Superóxido dismutase citosólica e mitocondrial
Tir	Tirosina
Vit C	Vitamina C

Vit E

Vitamina E

RESUMO

A ovariectomia bilateral em ratas é um dos modelos experimentais utilizados para se analisar a menopausa e as possíveis estratégias para amenizar os efeitos deletérios desta condição. A suplementação da dieta com antioxidantes vem sendo utilizada para diminuir o risco de estresse oxidativo, que está aumentado na menopausa. Nesse estudo, foram analisados os efeitos do ácido lipoico (AL) e dos ômega-3 (ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA)) no fígado, através da suplementação da dieta de ratas ovariectomizadas. O ácido lipoico foi escolhido em virtude da sua capacidade antioxidante, pela conhecida característica de ser cofator de enzimas chave no metabolismo celular e por inibir alguns mecanismos pró- inflamatórios. Essas características são importantes em virtude da disfunção mitocondrial e do aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, que estão presentes após a menopausa. Os demais ácidos graxos poli-insaturados foram utilizados por possuírem alta capacidade antioxidante e estarem bem estabelecidos como protetores endoteliais. Além disso, também exercem efeitos anti-inflamatórios e são capazes de normalizar os níveis de lipídios na circulação sanguínea. Os resultados demonstram que o ácido lipoico é capaz de atuar no fígado e recuperar a atividade da enzima fumarase e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) e glutathiona peroxidase (GPx), além de diminuir o dano oxidativo em proteínas e manter os níveis de malondialdeído (MDA) semelhantes ao grupo controle. No entanto, não exerceu influência na atividade da superóxido dismutase citosólica (CuZnSOD). A suplementação com DHA e EPA restaurou os níveis das duas classes de superóxidos dismutase, mas, não conseguiu restaurar a atividade da GPx e da fumarase. Os níveis de proteínas danificadas foram menores em todos os animais suplementados com ômega-3 em relação ao grupo controle e ao grupo ovariectomizado sem suplementação. Além disso, os suplementos também atuaram na redução dos níveis de nitritos e nitratos pois possuem propriedades anti-inflamatórias, sobretudo o ácido lipoico, que inibe a óxido nítrico sintase induzível (ONi) de macrófagos. Os níveis de vitamina C não apresentaram diferença entre os grupos SHAM, OVX, AL e DHA. Mas, o grupo EPA apresentou níveis de vitamina C inferiores aos dos grupos SHAM e OVX. Além disso, os níveis de vitamina E se mostraram inferiores nos grupos suplementados com os ácidos graxos poli-

insaturados de cadeia longa. Neste trabalho, os antioxidantes assumiram um papel importante na diminuição do dano oxidativo e na recuperação da atividade de enzimas importantes na homeostase celular, alterações essas, causadas pela diminuição drástica dos níveis de estrogênio no modelo de menopausa.

Palavras chave: **ovariectomia, menopausa, estresse oxidativo, fígado e antioxidantes**

ABSTRACT

The bilateral ovariectomy in rats is one of the experimental models used to analyze the menopause and possible strategies to mitigate the deleterious effects of this condition. Dietary supplementation with antioxidants has been used to decrease the risk of oxidative stress, which is increased in menopause. In this study, it was analyzed the effects of lipoic acid (LA) and the omega -3 (docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA)) in the liver, through dietary supplementation of ovariectomized rats. The lipoic acid was chosen because of its antioxidant capacity, its known characteristic of being cofactor for key enzymes in cellular metabolism, and inhibition of some proinflammatory mechanisms. These characteristics are important because of mitochondrial dysfunction and increased levels of inflammatory cytokines, that are present after menopause. The other polyunsaturated fatty acids were used due to their high antioxidant capacity and well established endothelial protective role. Furthermore, they also exert anti-inflammatory effects and are able to normalize the lipid levels in the bloodstream. The results showed that lipoic acid is capable of acting in the liver and recover the activities of the fumarase enzyme and the antioxidant enzymes mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) and glutathione peroxidase (GPx), and reducing oxidative damage of proteins and maintaining the levels of malondialdehyde (MDA) similar to the control group. However, lipoic acid had no influence on the activity of cytosolic superoxide dismutase (CuZnSOD). Supplementation with DHA and EPA restored the levels of both classes of superoxide dismutase, but was unable to restore the activity of GPx and fumarase. The levels of damaged proteins were lower in all animals supplemented with omega -3 when compared to the sham and ovariectomized groups without supplementation. Also, the supplements were active in reducing levels of nitrites and nitrates, since they have anti-inflammatory properties, especially lipoic acid, which inhibits nitric oxide synthase inducible (iNOS) of macrophages. Vitamin C levels did not differ between the SHAM, LA, OVX and DHA groups. But the EPA group presented lower levels of vitamin C than those of SHAM and OVX groups. Nonetheless, levels of vitamin E was inferior in the groups supplemented with long chain polyunsaturated fatty acids. In this work, antioxidants played an important role in reducing oxidative damage and assists recovery of the

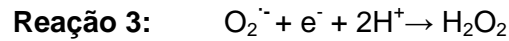
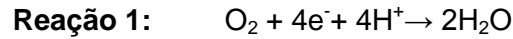
activity of important enzymes in cellular homeostasis, changes caused by the drastic decrease in estrogen levels in menopausal model.

Keywords: **ovariectomy, menopause, oxidative stress, liver.**

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESPÉCIES REATIVAS

As propriedades tóxicas do oxigênio eram obscuras antes da publicação da teoria dos radicais livres de Gershman, em 1954, que afirma que a toxicidade do oxigênio é devido a formas de oxigênio parcialmente reduzidas (Gerschman *et al.* 1954). No mesmo ano, houve a descoberta de radicais livres em amostras de materiais vivos (Commoner *et al.* 1954). A discussão sobre as espécies reativas de oxigênio (ERO) ganhou força por volta de 1956, quando Harman desenvolveu a teoria do envelhecimento baseado na produção de espécies reativas (Harman 1956). O trabalho de Harman engatilhou um intenso interesse na pesquisa sobre radicais livres em sistemas biológicos (Valko *et al.* 2007). Durante muito tempo, acreditava-se que os complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons eram responsáveis pela produção da maioria absoluta das espécies reativas de oxigênio na célula. A definição de espécie reativa diz que são moléculas e elementos químicos altamente reativos, que ao reagirem com outras moléculas, podem alterar a carga e a estrutura das mesmas. Geralmente, as espécies reativas estão centradas em oxigênio, embora possam estar centradas em nitrogênio, cloro e carbono. Embora grande parte das espécies reativas de oxigênio (ERO) sejam geradas na mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons (Koopman *et al.* 2010), há muitas outras fontes de espécies reativas na célula. Mais tarde, descobriu-se que inúmeras proteínas geram espécies reativas em caso de desequilíbrio da homeostase e que outras produzem espécies reativas para voltar à homeostase (Holzerova and Prokisch 2015). Portanto, as espécies reativas estão fortemente ligadas às funções metabólicas e possuem inúmeras funções benéficas ao organismo. Na cadeia transportadora de elétrons, o oxigênio deveria receber um elétron sucessivamente, até ser reduzido a água ao receber quatro elétrons. No entanto, dependendo da situação, o oxigênio não recebe todos os elétrons e, por conseguinte, torna-se o radical superóxido ao receber somente um elétron e, ao receber dois elétrons e dois prótons, se torna peróxido de hidrogênio como mostrado nas reações 1, 2 e 3, respectivamente.



No organismo, as espécies reativas encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, diferenciação celular (Ye *et al.* 2015), dentre outras funções. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação lipídica; oxidação de proteínas; inativação enzimática ao danificar o sítio ativo de enzimas como a aconitase, a fumarase e a catalase, por exemplo; oxidação de carboidratos e dano oxidativo em ácidos nucleicos.

No entanto, os radicais livres nem sempre oxidam biomoléculas. Eles também podem reduzir moléculas. A reação de oxirredução depende do potencial de redução das moléculas envolvidas. O destino dos elétrons envolvidos na reação segue a força desse potencial. De modo geral, a perda, ou o recebimento de elétrons, pode causar instabilidade ou danificar macromoléculas. Geralmente, a interação de macromoléculas com radicais livres tem potencial para ser danosa. Mas, como dito acima, também podem ser benéficas. Na figura 1, há a representação de algumas reações que geram espécies reativas e as moléculas que podem sofrer dano oxidativo. Além disso, também é exemplificado quais são as enzimas e algumas rotas que são capazes de neutralizar as espécies reativas. Ao analisar a figura 1, fica muito fácil perceber que há inúmeras maneiras de produção de espécies reativas e que também há inúmeras maneiras de neutralizá-las. Essa relação de equilíbrio foi adquirida evolutivamente e, embora seja muito sofisticada, pode apresentar momentos de desequilíbrio. Quando o equilíbrio fica comprometido, há o chamado estresse oxidativo. Essa condição está envolvida em inúmeros processos patológicos e se caracteriza pela incapacidade que determinada célula, e até mesmo um tecido, tenha em neutralizar a produção excessiva de espécies reativas. O acúmulo de dano oxidativo pode se manifestar através de inúmeras formas e representa altíssima importância em patologias como esteatose hepática, aterosclerose e doenças neurodegenerativas. Sendo assim, em alguns casos, é

importante que se busque auxiliar o organismo a lidar com o excesso de produção de espécies reativas no intuito de amenizar a condição de estresse oxidativo.

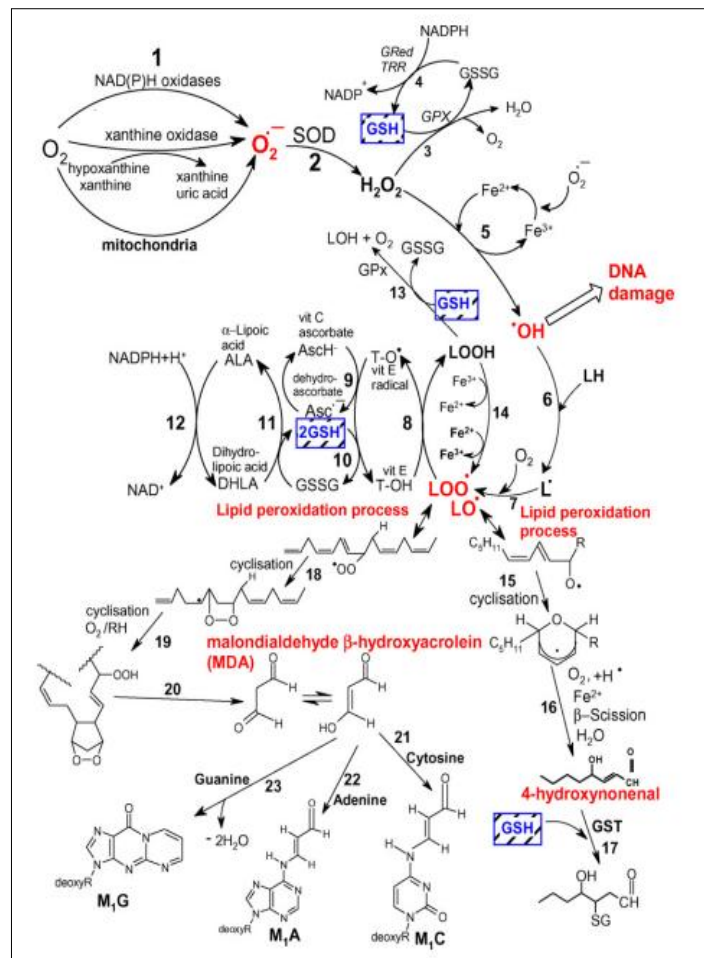


Figura 1. Algumas rotas de formação de algumas espécies reativas, o processo da peroxidação lipídica e o papel da glutatona, vitaminas C e E, ácido lipoico no manejo das ERO. **Reação 1:** o radical superóxido é formado através da NADPH oxidase e xantina oxidase ou, de forma não enzimática através da reação redox da semiquinona na cadeia transportadora de elétrons. **Reação 2:** o radical superóxido é dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio e água. **Reação 3:** o peróxido de hidrogênio é mais facilmente neutralizado pela glutatona peroxidase (GPx) que requer glutatona reduzida (GSH) como doadora de elétrons. **Reação 4:** quando GSH é oxidada a glutatona oxidada (GSSG), há a necessidade de GSSG ser reduzida a GSH. Quem atua nessa redução é a glutatona redutase (GRed), que usa NADPH como doador de elétron. **Reação 5:** Alguns metais de transição podem quebrar a molécula de peróxido de hidrogênio na reação de fenton e gerar o radical hidroxil. **Reação 6:** O radical hidroxil pode abstrair um elétron de um ácido graxo poli-insaturado e gerar o radical lipídico ($L\cdot$). **Reação 7:** O radical $L\cdot$ pode interagir com uma molécula de oxigênio e gerar o radical peróxil ($LOO\cdot$). Se o radical $LOO\cdot$ não for reduzido

por algum antioxidante, a peroxidação lipídica poderá seguir o curso das moléculas 15-17, culminando na formação de 4-hidroxinonenal, ou seguir o curso de formação das moléculas 18-23, o que gera malondialdeído (MDA) e MDA ligado a aminoácidos. **Reação 8:** o radical LOO^\bullet é reduzido pela vitamina E (T-OH) o que resulta na formação do hidroperóxido lipídico e um radical de vitamina E (T- O $^\bullet$). **Reação 9:** regeneração da vitamina E pela vitamina C: o radical T- O $^\bullet$ é reduzido a T-OH pelo ácido ascórbico, o que gera o radical ascorbil (Asc $^\bullet$). **Reação 10:** a vitamina E também é regenerada por GSH: o T- O $^\bullet$ é reduzido por GSH. **Reação 11:** GSSG e Asc $^\bullet$ são reduzidos a GSH e ascorbato monoânion (Asc $^-$) pelo ácido dihidrolipoico (DHLA) que volta a ser o ácido alfa lipoico (ALA). **Reação 12:** a regeneração de DHLA a ALA, necessita de NADPH. **Reação 13:** hidroperóxidos lipídicos são reduzidos a álcoois e dioxigênios por GPx, usando GSH como doadora de elétrons. **Reação 14:** hidroperóxidos lipídicos podem reagir com Fe^{+2} para formar o radical alcoxil (L O $^\bullet$), ou em menor escala, com Fe^{+3} , para formar o LOO^\bullet . **Reação 15:** os radicais L O $^\bullet$ derivados, por exemplo, do ácido aracdônico (ARA), sofrem reações que alteram a geometria molecular para a forma cíclica (anéis de hidropeóxidos). **Reação 16:** anéis de hidroperóxido sofrem quebras e viram 4-hidroxinonenal. **Reação 17:** 4-hidroxinonenal pode ser neutralizado por glutathione -S transferase (GST). **Reação 18:** o radical LOO^\bullet localizado na posição interna de um ácido graxo, pode sofrer alteração na geometria molecular e se tornar um radical centrado em carbono com a geometria cíclica. **Reação 19:** esse radical pode então ser reduzido a forma de hidroperóxido (reação não mostrada) ou sofrer outro processo que acentua as características cíclicas da sua molécula, o que o transforma em um peróxido bicíclico. **Reação 20:** produtos intermediários que seguem sofrendo modificações até gerarem MDA. **Reação 21, 22, 23:** MDA pode reagir com DNA, formando adutos de bases nitrogenadas citosina, adenina e guanina. M1C, M1A e M1G respectivamente (Valko *et al.* 2007)

1.2 A OVARIECTOMIA EM RATAS COMO MODELO DE MENOPAUSA (colocar coisas sobre ovariectomia)

A ovariectomia bilateral em ratas foi adotada como um dos modelos experimentais de menopausa e é amplamente utilizada para estudar os efeitos da menopausa sob o olhar de diversos parâmetros que possam estar envolvidos com a deficiência dos hormônios da classe dos estrógenos e é um excelente modelo para esse fim (Baeza *et al.* 2010; Moiety *et al.*). O período da menopausa dura aproximadamente um terço da vida das mulheres e além da grande diminuição dos níveis de estrogênio no organismo, há inúmeras outras alterações que são controladas por essa classe de hormônios. Essas alterações podem trazer problemas à saúde das mulheres, como a distribuição de gordura corporal (antes deste período, se caracteriza pela distribuição subcutânea e, após a entrada na menopausa, o acúmulo ocorre nas vísceras (Ce *et al.* 2014)); alterações no metabolismo do ferro e aumento dos fatores de risco para aterosclerose (Brady 2015). Na tabela 1, há alguns fatores de risco que são aumentados pela diminuição dos níveis de estrogênio e que também estão aumentados ao longo do envelhecimento. Na literatura, inúmeros trabalhos apontam que após a menopausa, há aumento no risco de desenvolvimento da síndrome metabólica. A síndrome metabólica se caracteriza por apresentar muitos fatores de risco similares aos da menopausa (Despres 1993). Na tabela 2, há uma lista de fatores de risco que estão

maiores em indivíduos com esteatose que se relacionam aos fatores de risco da menopausa.

Tabela 1- Fatores de risco após a menopausa.

	Envelhecimento	Menopausa	Terapia Hormonal
Tecido Adiposo	Aumenta	Aumenta	Reduz
Obesidade	Aumenta	Aumenta	Reduz
Resistencia à Insulina	Aumenta	Aumenta	Reduz
Diabetes Tipo 2	Aumenta	Aumenta	Reduz

Adaptado de (Rettberg *et al.* 2014)

Tabela 2- Fatores de risco comuns na Menopausa e na síndrome metabólica.

1. Obesidade Central
2. Resistência à Insulina
3. Dislipidemia
a. ↑TG
b. ↑LDL
c. ↓HDL
4. hipertensão
5. ↑estado proinflamatório

Adaptado de (Carr 2003) ↑TG= aumenta os níveis de triglicerídios, ↑LDL= aumenta os níveis de lipoproteína de baixa densidade, ↓HDL= diminui os níveis de lipoproteínas de alta densidade.

Portanto, além de exercer o controle metabólico e atuar de maneira evidente na homeostase do organismo, essa classe de hormônios sexuais também possui um grupamento fenol que lhes confere propriedades antioxidantes (Beavers *et al.* 2009). Além disso, o estrogênio também é capaz de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes e pode atuar como quelante de metais de transição (Borras *et al.* 2005; Prokai *et al.* 2005; Hou *et al.* 2012), o que é muito importante em relação ao aumento do risco de estresse oxidativo. Portanto, além de exercerem as funções fisiológicas relacionadas ao desenvolvimento e ao metabolismo (Ruizlarrea *et al.* 1995; Kim *et al.* 2014), essa classe hormonal também está fortemente relacionada ao balanço redox.

Na literatura, há trabalhos que mostram que a suplementação hormonal reverte o quadro de resistência à insulina (Margolis *et al.* 2004), regula a pressão

sanguínea e reduz a obesidade (Schunkert *et al.* 1997; Wang *et al.* 2015b). No entanto, a reposição hormonal possui resistência na comunidade médica em virtude de trabalhos que apontam para o aumento dos riscos do desenvolvimento de câncer de útero, rins e mama (Santen *et al.* 2015; Yager 2015). O câncer não está relacionado somente às mulheres que fazem terapia hormonal, mas também, se relaciona a mulheres cujos níveis de estrogênio são muito altos. Por exemplo, o câncer de mama está fortemente relacionado a metabólitos secundários do estrogênio e é mais de 100 vezes mais comum em mulheres do que em homens (Santen *et al.* 2007). Na figura 2, há uma breve esquematização do mecanismo

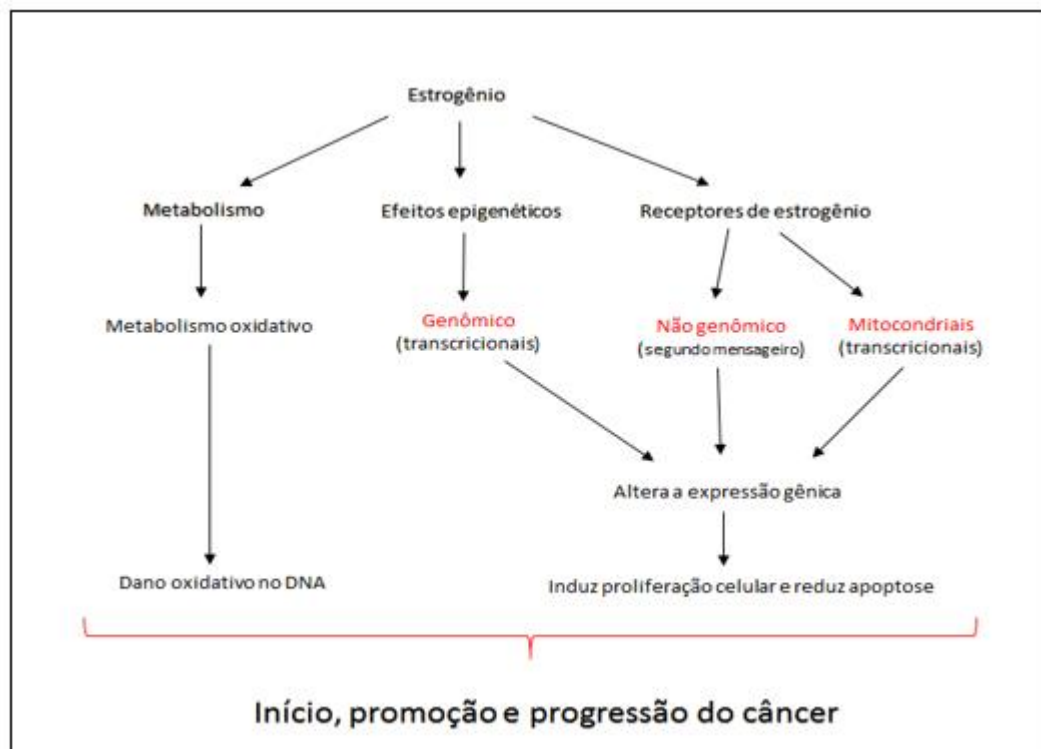


Figura 2- Mecanismos de indução de câncer por estrogênio. Há três vias que podem ocasionar câncer, agindo na inicialização, promoção e progressão.

Adaptado de (Yager 2015)

Deste modo, é de suma importância que se façam pesquisas que possam desenvolver estratégias de minimização dos fatores de risco que evidentemente estão aumentados na menopausa e que não possuam forte relação com o desenvolvimento de câncer. A suplementação com antioxidantes pode proteger o DNA do dano oxidativo e auxiliar no controle das espécies reativas geradas em processos inflamatórios, além de auxiliar no controle lipídico no organismo.

1.3. ESTROGÊNIO

O estrogênio possui representantes que variam sua concentração no organismo. Há o estriol, a estrona e o 17 β -estradiol que é a sua forma majoritária e possui a capacidade de regular a estrutura e a função mitocondrial em tecidos com alta demanda energética (Brady 2015). Portanto, a deficiência dessa classe de hormônios, sobretudo o estradiol, acarreta profundos efeitos no metabolismo energético. Em roedores, a ovariectomia está associada ao acúmulo de gordura visceral e à resistência à insulina (Donato *et al.* 2006). No entanto, a reposição de estradiol reverte esses sintomas tanto em modelos experimentais quanto em humanos (O'Sullivan and Ho 2000; Hao *et al.* 2010).

Na menopausa, a drástica diminuição dos níveis de estrogênio traz desequilíbrio no balanço redox em virtude das rotas de produção de defesas antioxidantes que são ativadas por essa classe hormonal através da produção de fatores de transcrição e da própria característica molecular desses hormônios, que possuem grupamentos fenólicos em suas moléculas (Rettberg *et al.* 2014). Por conta dessa diminuição, o organismo precisa se adaptar a essas mudanças para encontrar um estado mais harmonioso para que as suas funções sejam bem desempenhadas.

O estrogênio controla várias funções no organismo através dos seus receptores, que são encontrados nas membranas celulares, nucleares e mitocôndrias. A superfamília de receptores nucleares (RNs) incluem os receptores endócrinos que medeiam a ação de hormônios esteroides, hormônios tireoidianos e vitaminas lipossolúveis A e D (Evans and Mangelsdorf 2014). O estrogênio é capaz de regular inúmeras funções de todo o organismo através dos seus receptores nos órgãos. Os receptores de estrogênio alfa (RE- α) são expressos principalmente em tecidos reprodutivos (útero e ovário) mas, também estão presentes no rim, tecido adiposo e fígado, enquanto a expressão do receptor de estrogênio beta (RE- β) está presente nos ovários, sistema nervoso central, sistema cardiovascular, pulmão, órgãos reprodutores masculinos, próstata, rim e sistema imune (Jia *et al.* 2015). Na literatura, há evidências que suportam a relação entre o estrogênio e o aumento da atividade de enzimas antioxidantes em mulheres e em modelos experimentais

(Zhang *et al.* 2007; Baek *et al.* 2011; Liu *et al.* 2014b). Um dos mecanismos que demonstra essa relação seria, simplificada, o fato de que o estradiol se liga aos receptores de estrogênio e ativa a cascata ERK1/ERK2 que se caracteriza por uma via de sinalização através da ativação da MAPK (MAP kinase). Essa cadeia de sinalização faz com que o fator nuclear de transcrição Kappa B (NFκB) se desloque para o núcleo. Ao se posicionar na sua região de ação, o NFκB ativa a transcrição dos genes da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) e da glutatona peroxidase (GPx). Essa relação do estrogênio com a transcrição de enzimas antioxidantes, juntamente com o fato de que fêmeas são mais longevas (Borras *et al.* 2003), fez com que o mecanismo citado acima e demonstrado na figura 3 ganhasse força para tentar explicar o motivo dessa longevidade.

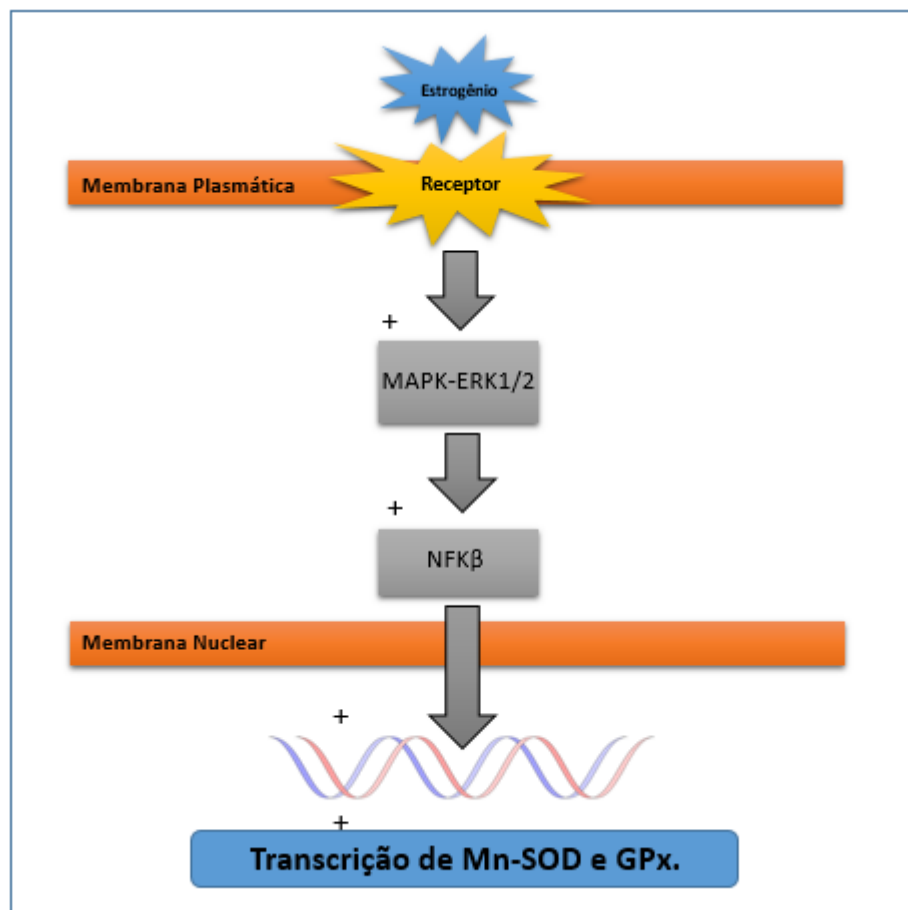


Figura 3 - Regulação transcricional através do estrogênio. O estrogênio liga-se ao seu receptor e uma cascata de sinalização ativa a transcrição das enzimas antioxidantes Mn-SOD e GPx.

Adaptado de (Borras *et al.* 2005)

1.4 CICLO ESTRAL

O ciclo reprodutivo de ratas é dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II). O ciclo estral dura quatro dias em média e a ovulação ocorre entre o início do proestro e fim do estro. Durante o ciclo, há variações hormonais bem marcadas. A prolactina, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) permanecem baixos e vão aumentando no final do proestro. O estradiol começa a aumentar no diestro I, chegando aos níveis máximos durante o proestro e voltando aos níveis basais no estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o diestro I tendo um segundo pico no final do proestro (Smith *et al.* 1975). A figura 4 mostra as grandes variações de estradiol e progesterona durante o ciclo estral com as respectivas características que são peculiares de cada fase do ciclo. Em modelos experimentais de menopausa que utilizam a ovariectomia, não há oscilações nos níveis de estrogênio e progesterona.

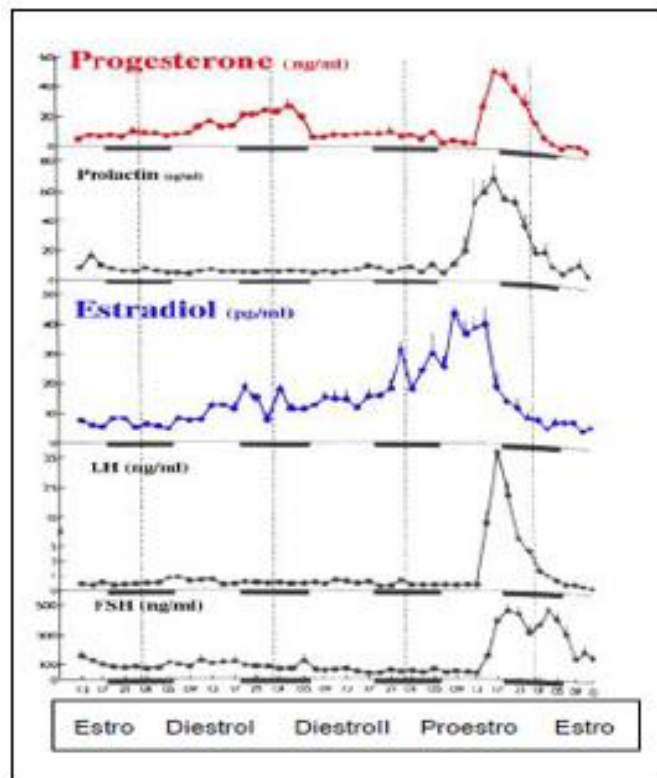


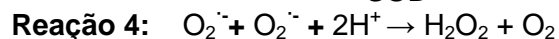
Figura 4 - Curva de variação hormonal sanguínea durante o ciclo estral ao longo do dia. (Smith *et al.* 1975).

1.5 ESPÉCIES REATIVAS IMPORTANTES NO PONTO DE VISTA CLÍNICO NA MENOPAUSA

1.5.1 O SUPERÓXIDO NA MENOPAUSA

O ânion e radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é produto de várias reações intracelulares e extracelulares. Dentre elas, a mais famosa é a redução incompleta do átomo de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons. No meio extracelular, há liberação de superóxido durante a atividade de enzimas como a xantina oxidase, por exemplo. O controle e a eliminação do $O_2^{\cdot-}$ podem ocorrer espontaneamente através da colisão com outro $O_2^{\cdot-}$ ou através da atividade das enzimas superóxido dismutase citosólica (CuZnSOD), que está presente nas células eucarióticas e que também é conhecida como SOD1, da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD), também conhecida como SOD2, e da SOD3 que é encontrada no meio extracelular, também centrada em cobre e zinco. No entanto, no caso de eliminação por colisão do radical superóxido, que é independente da ação enzimática, é necessário que haja altos níveis de superóxido para que ocorram as colisões. A maneira mais eficiente de eliminação desse radical é exercida pelas enzimas superóxido dismutase, que eliminam o $O_2^{\cdot-}$ transformando-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio em uma reação de dismutação, como mostrado resumidamente na reação 4.

SOD



Na menopausa, há um aumento nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ devido ao aumento da atividade da NADPH oxidase (Gabriel Camporez *et al.* 2011; Caliman *et al.* 2013) e à redução da expressão e atividade da CuZnSOD e MnSOD (Gabriel Camporez *et al.* 2011). Portanto, trata-se de uma molécula importante do ponto de vista clínico, já que o $O_2^{\cdot-}$ reage espontaneamente com o radical óxido nítrico, e, por conta disso, a vasodilatação endotelial fica comprometida em virtude da diminuição da disponibilidade do NO podendo levar a problemas de hipertensão, o que é comum em mulheres após a menopausa (Mendonca *et al.* 2007). Uma característica importante em relação ao $O_2^{\cdot-}$, é que esse radical possui baixa reatividade com a maioria das biomoléculas. Por exemplo, se reagir com proteínas não afeta a cadeia principal de aminoácidos. No entanto, possui alta reatividade com grupamentos tióis dos aminoácidos metionina e cisteína. Além disso, também reage com metais de transição, como Cu, Fe e Mn (Abreu and Cabelli 2010) que podem estar no sítio

ativo de algumas enzimas e desta forma, há a chance de dano no sítio ativo destas enzimas e isso pode diminuir a atividade das mesmas. Adicionalmente ao exposto acima, tem-se acumulado evidências de que proteínas solúveis com clusters Fe-S são alvos da ação do $O_2^{\cdot-}$, como as enzimas aconitase e fumarase (Flint *et al.* 1993a; Flint *et al.* 1993b; Hausladen and Fridovich 1994), o que pode comprometer as rotas metabólicas que utilizam as mesmas.

1.5.2 ÓXIDO NÍTRICO NA MENOPAUSA

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro intercelular onipresente em todos os vertebrados, modulando o fluxo sanguíneo, trombose, atividade neural dentre outras funções importantíssimas para o organismo. Além disso, é importantíssimo na defesa inata contra patógenos (Pacher *et al.* 2007). Na literatura, estudos demonstram que a deficiência de estrogênio acarreta problemas endoteliais tanto em modelos experimentais quanto em humanos (Yung *et al.* 2011; Moreau *et al.* 2012). O NO é produzido na célula através da oxidação da arginina catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (ONS), que utiliza NADPH como doador de elétrons e oxigênio molecular como receptor de elétrons (Kumar *et al.* 2012), como mostrado na figura 5. Nos vertebrados, há três tipos de oxido nítrico sintase. A oxido nítrico sintase endotelial (ONE); a óxido nítrico sintase neuronal (ONn) e a óxido nítrico sintase induzível (ONi), que responde a estresse e a mensageiros inflamatórios.

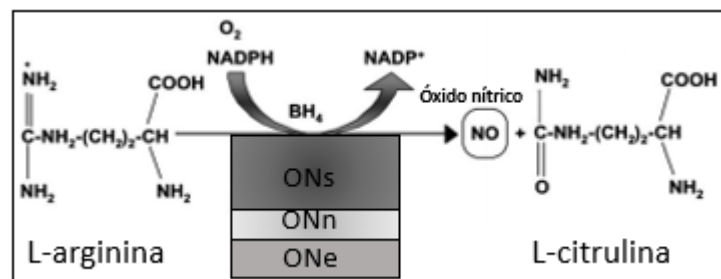


Figura – 5 A síntese de óxido nítrico. A síntese de óxido nítrico pode ser feita a partir de três formas de NOS (iNOS, induzível; nNOS, neuronal; eNOS, endotelial). Essas enzimas catalisam a transformação da L-arginina a L-citrulina e NO[•] em presença de oxigênio e dicotinafina adenina dinucleotídio fosfato (NADPH) e tetrahirobiopterina (BH₄). Adaptado de (Karpuzoglu and Ahmed 2006)

Tanto na menopausa quanto em modelos experimentais através da ovariectomia, é notado que a atividade e a expressão da ONE diminui com a perda da influência do estrogênio (Pinna *et al.* 2008). Essa influência se deve ao fato de que as células endoteliais possuem grande quantidade de receptores alfas de

estrogênio (RE α) que atuam como um potente fator de transcrição para inúmeras funções celulares, dentre elas, a expressão da ONe (Gavin *et al.* 2009). A diminuição do estrogênio acarreta diminuição dos seus receptores e, com isso, a ONe diminui drasticamente a sua expressão e ativação, levando a problemas endoteliais (Marino *et al.* 2006), já que o NO é essencial para o relaxamento endotelial e também é capaz de neutralizar outras espécies reativas como o radical superóxido O₂⁻ e o radical peroxil (LOO[•]), um intermediário e propagador da peroxidação lipídica. Além disso, na menopausa, também há um aumento na produção de espécies reativas que reagem com o NO (Gavin *et al.* 2009) fazendo com que a viabilidade desta molécula seja muito reduzida. No entanto, a menopausa acarreta um aumento das citocinas inflamatórias que ativam a ONi (Yung *et al.* 2011), o que poderia ser benéfico em relação a alguns aspectos, como a proteção citada acima já que haveria síntese de NO através da ONi. Contudo, apesar dos efeitos benéficos já citados, a produção de NO por essa via é maior e centralizada a focos inflamatórios ou sobre estresse e essa situação pode gerar dano em muitas biomoléculas através da produção da espécie reativa não radicalar peroxinitrito (ONOO⁻). Na tabela 3, há os locais onde cada uma das enzimas óxido nítrico sintase é majoritária e a respectiva função fisiológica.

Tabela 3 - Comparação biológica das três isoformas de óxido nítrico sintase

Características	ONn	One	Oni
Tecido com função conhecida	Cérebro, sistema nervoso periférico, músculo esquelético	Endotelial e em cardiomiócitos	Macrófagos
Função	Neurotransmissor, regula o relaxamento do músculo esquelético	Vasodilatador, controla o fluxo sanguíneo	Estímulos inflamatórios Infecções e morte celular
Expressão	Constitutiva	constitutiva	Induzível
Concentração	Picomolar	picomolar	Nanomol
Dependência para funcionar	Ca ⁺²	Ca ⁺²	independe de Ca ⁺²

ONn= óxido nítrico sintase neuronal; ONE= óxido nítrico sintase endotelial; ONi= óxido nítrico sintase induzível.

Adaptado de (Karpuzoglu and Ahmed 2006)

Como citado anteriormente, o NO possui a capacidade de agir na peroxidação lipídica, protegendo-os da ação deletéria de algumas ERO. A figura 6, mostra o mecanismo pelo qual o NO seria capaz de interferir na propagação do dano lipídico.

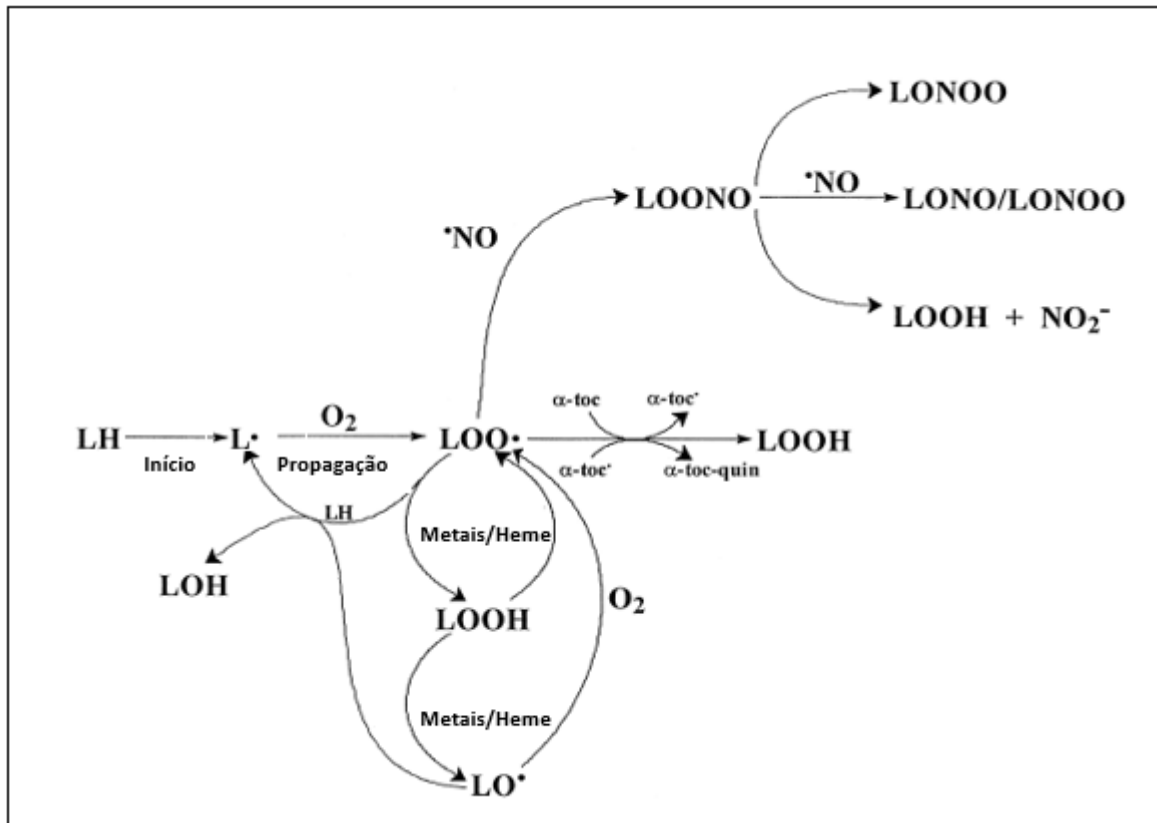


Figura 6 Inibição da peroxidação lipídica por NO. A peroxidação lipídica inicia com a retirada de um átomo de hidrogênio de uma molécula de AGPI. Após a retirada do átomo de hidrogênio, há a formação do LOO• em presença de oxigênio. O LOO• ataca o carbono adjacente e forma o hidroperóxido lipídico LOOH, que por sua vez, pode gerar novo radical peróxil se não for neutralizado e reagir com metais de transição. O α-tocoferol, é capaz de neutralizar duas moléculas de LOO•, no entanto, um dos produtos dessa reação é o LOOH, que aumenta o risco de novos ataques a lipídios. O NO, gera produtos menos reativos ao neutralizar o LOO•, embora possa gerar LOOH, as chances são muito menores dessa molécula ser gerada a partir das reações dependentes de NO.

1.6 O FÍGADO NA MENOPAUSA

O fígado é um órgão chave na defesa do organismo contra patógenos e possui uma altíssima concentração de macrófagos, o que lhe confere a capacidade de gerar respostas inflamatórias locais e/ou sistêmicas, atuando como uma fonte de citocinas inflamatórias e como um alvo para as mesmas (Kireev *et al.* 2010). Juntamente a isso, a diminuição dos níveis de hormônios sexuais apresenta um importante papel na progressão de doenças hepáticas crônicas (Yung *et al.* 2011).

No caso do estrogênio e seus derivados, a capacidade antioxidante dessas moléculas poderia atenuar os malefícios das espécies reativas geradas durante os processos inflamatórios (Wang *et al.* 2012). Há trabalhos que apontam que uma das causas do declínio das funções ovarianas seja o aumento das citocinas inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator alfa de necrose tumoral alfa (TNF- α) devido a diminuições dos níveis de estrogênio. Além disso, concentrações fisiológicas de estrogênio são capazes de inibir a secreção de cada uma dessas moléculas (Ayala *et al.* 1992) e reduzir os níveis das mesmas em situações de inflamações agudas (Kumral *et al.* 2014). Alguns estudos demonstram que há um significativo aumento da expressão e ativação da iNOS no fígado de ratas que passaram por ovariectomia e esse aumento influencia no aumento dos níveis de NO (Kireev *et al.* 2008; Kireev *et al.* 2010; Yung *et al.* 2011), o que está associado a respostas inflamatórias.

Outro fator importante em relação ao fígado associado à menopausa está relacionado ao metabolismo do ferro. É sabido que na adolescência e ao longo da fase reprodutiva da vida das mulheres os níveis de armazenamento de ferro são inferiores aos dos homens. No entanto, os níveis de armazenamento se equiparam na menopausa (Milman 1996). Embora o aumento do armazenamento de ferro como resultado da menopausa seja considerado fisiologicamente normal, potenciais problemas na saúde estão relacionados a altos níveis de ferro, tanto em homens e mulheres, assim como em neonatos. O aumento da exposição ao ferro está relacionado ao aumento do risco de inúmeras doenças, como esteatose hepática não alcoólica e diabetes tipo2 (Sullivan 1988, 2004; Hoki *et al.* 2015; Radmard *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015a). Ao longo do período de vida das mulheres, os níveis de estrogênio oscilam e os níveis de ferritina acompanham essa oscilação. Na menopausa, os níveis de estrogênio caem significativamente e os níveis de ferritina sobem em proporção inversa (Jian *et al.* 2009).

Isso pode ser explicado devido ao fato de o ferro ser tóxico e, em virtude disso, deve ser armazenado pelas moléculas de ferritina que são capazes de armazenar 4500 átomos de ferro (Walczyk and von Blanckenburg 2005). Além disso, o fígado é o órgão que mais concentra esse metal. A ferritina é uma proteína intracelular que se localiza principalmente no citoplasma, embora seja possível encontrar traços dessa proteína no soro e em outros fluidos corporais. É sabido que

em situações onde há inflamação e estresse oxidativo, também ocorre aumento da síntese de ferritina, sobretudo o TNF- α e a interleucina 2 (Il-2), que atuam estimulando a síntese de ferritina em macrófagos e hepatócitos (Torti and Torti 2002). Além disso, o estrogênio diminui os níveis de transcrição da ferroportina (Qian *et al.* 2015), o que reduz a liberação de ferro para fora da ferritina. A ferroportina é o único exportador de ferro conhecido nas células de mamíferos e é expresso na maioria das células do organismo. Portanto, é um elemento chave no metabolismo do ferro e está profundamente associado aos níveis de estrogênio, o que foi demonstrado em um trabalho realizado com ratas ovariectomizadas feito por (Qian *et a*, 2015).

1.7 DANO OXIDATIVO EM PROTEÍNAS

A oxidação proteica é definida como uma alteração covalente causada por uma reação direta ou indireta com uma espécie reativa de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN). As mudanças oxidativas em proteínas podem levar a diversas consequências funcionais, como inativação enzimática e comprometimento do reconhecimento e identidade de ligantes no caso de receptores celulares, aumento das condições de proteólise e susceptibilidade de agregação (Jasin 1983; Stadtman 1990; Kang *et al.* 2011). Dentre todos os aminoácidos, os mais suscetíveis a sofrer oxidação são a cisteína (Cis) e a metionina (Met) em virtude dos seus grupamentos de enxofre (Radi *et al.* 1991; Lii *et al.* 1994; Vogt 1995). Na tabela 4, há a representação de algumas alterações que podem ser provocadas por oxidação de resíduos de aminoácidos. Como dito anteriormente, os resíduos de aminoácidos mais suscetíveis são os de Cis e Met. Portanto, a oxidação de outros aminoácidos necessita de outras forças químicas para ocorrer. Para que alguns resíduos sejam oxidados e sofram modificações, a presença de metais de transição na forma reduzida se torna necessário (Korbashi *et al.* 1986). Os metais que mais estão envolvidos na oxidação das biomoléculas são o Fe⁺² e Cu⁺, que catalisam o processo oxidativo. Na tabela 5, estão representadas algumas alterações oxidativas que são catalisadas por esses metais. É importante salientar que a oxidação de biomoléculas que ocorrem com a participação dos metais de transição geralmente se inicia pela redução da molécula de peróxido de hidrogênio H₂O₂. A redução do H₂O₂ gera o radical OH \cdot e o radical ferril. Esses radicais rapidamente reagem com

resíduos de aminoácidos das cadeias laterais das proteínas que estão nas proximidades.

Tabela 4 - Modificações Oxidativas em Proteínas

Modificação	Aminoácido envolvido	Fonte da oxidação
Dissulfetos	Cis	ERO, ONOO ⁻
Sulfoxido de metionina	Met	ERO, ONOO ⁻
Carbonilção	todos	ERO
Glicoxidação	Gli	glicose
Nitrotirosina	Tir	ONOO ⁻
Cloro- tirosina	Tir	HOCl
Agregação protéica	vários	ERO

Adaptado de (Shacter 2000)

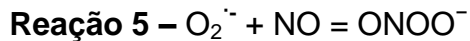
Tabela 5 - Oxidação de Proteínas Catalisadas por Metais de Transição

Resíduo de aminoácido	Produtos
Histidina	Aspartato, Asparagina, OXO- Histidina
Prolina	Hidroxi prolina, Glutamato e γ -glutamilsemialdeído
Arginina	γ -glutamilsemialdeído
Lisina	Amino- adipicsemialdeído
Treonina	Amino-cetobutirato
Tirosina	Bitirosina
Cisteína	Ponte dissulfeto

Adaptado de (Shacter 2000)

Como mostrado na tabela 4, a formação de grupamentos carbonila pode ocorrer em qualquer aminoácido da cadeia lateral das proteínas. Portanto, a detecção da formação de grupamentos carbonila é de suma importância para se averiguar os níveis de oxidação que determinada amostra sofreu. No entanto, a medida dos níveis de carbonilação mostra apenas o perfil de dano oxidativo, mas não informa a origem do dano já que praticamente todas as espécies reativas são capazes de formá-las. Portanto, a medida dos níveis de nitrotirosina, por exemplo, servem para mostrar que houve oxidação e que para tanto, é necessário que haja a interação dos radicais livres superóxido e óxido nítrico para formar peroxinitrito (Beckman and Koppenol 1996), como mostrado na reação 5. Mas, mesmo que a formação de grupamentos carbonila não informe a origem do dano oxidativo, ainda

assim, é um ótimo marcador de dano oxidativo e é extremamente útil para se realizar comparativos oxidativos em inúmeros modelos experimentais. Além disso, a atividade de enzimas antioxidantes pode auxiliar na interpretação dos resultados e direcionar a formação da conclusão.



1.8 DANO OXIDATIVO EM LIPÍDIOS

Eventos patológicos como injúria tecidual, diabetes, aterosclerose, isquemia, estresse metabólico, hipertensão e inúmeras outras desordens clínicas, estão associadas a eventos de dano oxidativo em lipídios. A oxidação lipídica é causada por certos radicais livres e pode ser mediada por espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio e peroxinitrito. A vasta quantidade de lipídios celulares, tanto na membrana plasmática ou associado a inúmeras outras biomoléculas, torna a células sensíveis a peroxidação lipídica. Dentre as moléculas lipídicas mais sensíveis ao ataque por espécies reativas estão os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). Os AGPI sofrem uma série de reações autocatalíticas que produzem muitos subprodutos, intermediários e finais, que podem ser danosos à célula. Os principais subprodutos dessas reações possuem grupamentos carbonila e podem dar sequência na propagação do dano. Na figura 7, há exemplos de moléculas que podem se ligar a proteínas, outros lipídios e ao DNA, o que pode alterar a função biológica dessas moléculas (Singh *et al.* 2015).

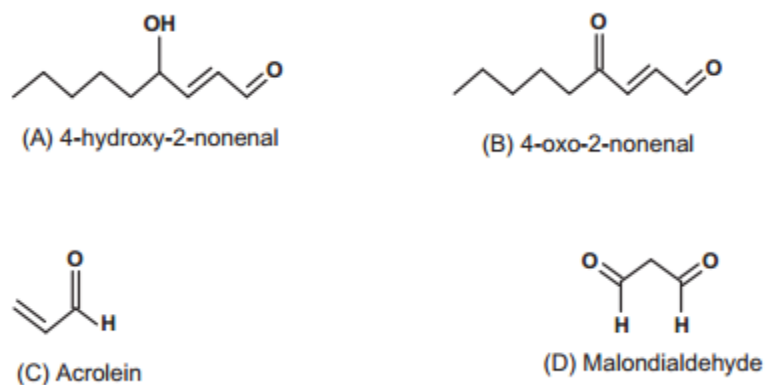


Figura 7- Compostos derivados da oxidação de AGPI (Singh *et al.* 2015)

Uma das moléculas apresentadas acima é o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) que é produzido na oxidação de ômega-6 e em inúmeros alimentos que passaram por processo de fritura (Lang *et al.* 1985). A abundância de HNE nos tecidos não depende somente da peroxidação lipídica, mas também do metabolismo, que é regulado pelas enzimas aldose redutase (ALR), glutathione -S- transferase (GST), aldeído desidrogenase (ALDH) e álcool desidrogenase (ADH) (Singh *et al.* 2015). Em altos níveis, o HNE pode causar necrose ou apoptose. A concentração de HNE no plasma de indivíduos saudáveis está entre 0,3 and 0,7 μ M e aumenta significativamente ao longo do envelhecimento (Selley *et al.* 1989). Em situações de estresse oxidativo, o HNE é capaz de formar ligações covalentes com proteínas (Liu *et al.* 2003). Quando há ligações de HNE a proteínas e lipoproteínas, macrófagos as fagocitam por haver alterações no reconhecimento (Hoff *et al.* 1989), o que causa perdas para as células.

Outro subproduto da peroxidação de AGPI, possui a seguinte nomenclatura: 4-oxo-2-nonenal (ONE). Essa molécula possui estrutura semelhante ao HNE. No entanto, produz maiores efeitos biológicos do que HNE. Como exemplo, temos a ligação cruzada de proteínas no resíduos de lisina (Lis-Lis), o que pode provocar agregação das mesmas (Liu *et al.* 2003) e reciclagem.

A acroleína (ACR), outro subproduto da peroxidação lipídica que também é mostrado na figura 7, é altamente produzido por conta da fumaça do cigarro, gasolina e diesel (Ghilarducci and Tjeerdema 1995). No entanto, a ACR também é gerada endogenamente através da degradação de poliaminas e pela mieloperoxidase de neutrófilos (Anderson *et al.* 1997). Assim como HNE e ONE, a ACR também provoca ligação cruzada em proteínas. No entanto, também já foi demonstrado que a ACR se liga ao LDL oxidado e em lesões de aterosclerose (Shao *et al.* 2005), o que amplifica o dano.

Além dessas moléculas que são subprodutos de peroxidação lipídica, também existe o malondialdeído (MDA) que é mais estável e portanto, serve como marcador de peroxidação lipídica e pode ser detectado através de inúmeras metodologias. Durante a propagação da peroxidação lipídica, a formação do MDA depende da reação em cadeia do radical peróxil (ROO \cdot) sobre uma molécula de AGPI que culmina com a formação do MDA e ao longo dessa reação, compostos que reagem

com ácido tiobarbitúrico (incluindo MDA) também são gerados (Singh *et al.* 2015) e lidos em espectrofotômetros na faixa de 532 a 535nm. A técnica espectrofotométrica do TBARS é muito empregada para se analisar os níveis de MDA, no entanto, essa técnica apresenta muitas variações e acarreta em uma superestimação dos valores de MDA (Li *et al.* 2013), já que mostra os sinais de ligação com inúmeros outros formaldeídos e hidroperóxidos gerados na peroxidação lipídica (Kishida *et al.* 1990; Aubourg 1999; Al-Rimawi 2015). Além disso, as condições experimentais para a utilização dessa técnica podem gerar novas moléculas de MDA. Por essa razão, outras técnicas mais sofisticadas são utilizadas para se determinar as quantidades de MDA de uma determinada amostra (Draper and Hadley 1990). A cromatografia líquida de alta performance, também conhecida como HPLC, pode ser utilizada para medir os níveis de MDA em diferentes tipos de amostras, dependendo da fase móvel e/ou coluna utilizada. Essa versatilidade permite que se obtenha os níveis de MDA de plantas, animais de consumo alimentício e de modelos experimentais (Kakuda *et al.* 1981; Hirayama *et al.* 1983), mesmo com técnicas desenvolvidas há trinta anos (embora antigas, ainda são precisas e extremamente confiáveis). Portanto, apesar de muitos trabalhos afirmarem que estão medindo níveis de MDA em determinadas amostras, há inúmeras outras moléculas que podem gerar sinais equivocados e a medida de níveis de MDA pode estar contaminada.

1.9 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Na literatura, um grande número de estudos relacionados ao estresse oxidativo demonstram que em situações patológicas há desequilíbrio na relação entre as espécies reativas e as respectivas moléculas, que têm por função essencial, neutralizar a espécie reativa alvo. No entanto, também é possível observar que muitos trabalhos apresentam o lado benéfico das espécies reativas em inúmeras funções celulares (Shimizu 2003). Como citado anteriormente, o radical óxido nítrico, por exemplo, é modulador da homeostase endotelial e atua também na inibição da agregação de plaquetas. (Linnane *et al.* 2007; Gavin *et al.* 2009). Essa variação na produção de espécies reativas indica que existe a necessidade de equilíbrio nos níveis das mesmas. Para tanto, os seres vivos desenvolveram um grande arsenal de defesas contra a produção exacerbada das espécies reativas.

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas e não enzimáticas. As defesas enzimáticas podem ser sintetizadas de acordo com as necessidades do organismo através de fatores de transcrição que estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e que possibilitam a transcrição de enzimas como as CuZnSOD, MnSOD, GPx, GST, catalase e inúmeras outras enzimas que são capazes de atuarem de maneira conjunta na diminuição dos níveis das espécies reativas. No repertório de defesas não enzimáticas, podemos citar as vitaminas A, C e E, glutathione e inúmeras outras moléculas que desempenham papéis fundamentais na defesa de biomoléculas, que ao serem oxidadas, podem perder a sua função e com o acúmulo de dano, trazer consequências danosas às células e aos tecidos.

1.10 ÔMEGA 3

Além do exposto acima, outras moléculas adquiridas na dieta também são extremamente eficientes na neutralização de espécies reativas. Os AGPI fazem parte dos compostos presentes em oleaginosas e na gordura de peixes, por exemplo. Um grande destaque vem sendo dado aos AGPI da classe ômega 3 como o ácido decosaheptaenóico (DHA, 22:6n-3) e o ácido eicosaheptaenóico (EPA, 20:5n-3). Os ácidos graxos estão raramente livres na natureza e quase sempre ligados a outras moléculas por seu grupo principal de ácido carboxílico. Essas moléculas são classificadas de acordo com o número de carbonos da cadeia, o número de ligações duplas e a posição da primeira ligação dupla.

A fração de AGPI, ômega 6 e ômega 3 (n-6/n-3), vem sofrendo alterações gradativas na dieta humana ao longo da história. Antes da industrialização, a fração estimada era (n-6/n-3) = 1. Atualmente, em alguns países, pode chegar a 15/1 (Simopoulos 2002). A fração ideal é considerada dentro do intervalo de 2/1 a 4/1 (Kris-Etherton *et al.* 2000; Schaefer 2002). A importância de aumentar a proporção de ômega 3 na dieta vai além das propriedades antioxidantes que essas moléculas possuem. Dietas ricas em EPA e DHA reduzem os níveis de triglicerídeos do plasma e reduzem os índices de doenças cardiovasculares e inúmeras doenças inflamatórias (Calder and Yaqoob 2009; Calder 2015).

Em algumas áreas da França, o alto consumo de comida gordurosa coincidiu com a diminuição na incidência de doenças coronarianas. Esse fato levou à criação

do conceito do paradoxo Francês, que aproxima os índices de óbito de algumas localidades francesas aos japoneses e chineses, o que se distancia dos índices de países industrializados do ocidente. Essas características incomuns se devem ao consumo de gorduras insaturadas que exercem proteção ao sistema circulatório associado ao consumo de vinho (Artaudwild *et al.* 1993).

Os AGPI DHA e EPA podem ser obtidos através de peixes marinhos ricos em gordura exemplificados na tabela 6 e também pode ser sintetizado no organismo através do seu precursor, o ácido α -linoleico (ALA, 18:3n-3), um ácido graxo essencial que é encontrado em óleos de sementes de inúmeras plantas, como a canola, por exemplo. A síntese de DHA é muito maior no fígado do que em outros órgãos (Domenichiello *et al.* 2014) e é distribuído para o organismo. Por exemplo, o DHA do plasma é essencialmente produzido pelo fígado (Rapoport *et al.* 2010). Estudos demonstram que fêmeas possuem maior capacidade de conversão do ALA a DHA. Essa característica é evolutivamente benéfica ao desenvolvimento cerebral do feto (Innis 2005). A biossíntese de DHA está associada a proteínas que são responsivas a estrogênio (Kitson *et al.* 2010). Essa relação com o estrogênio é visualizada quando se compara os níveis de DHA das mulheres aos níveis de DHA dos homens antes e após a menopausa (Bakewell *et al.* 2006; Mason *et al.* 2014). A conversão de ALA a EPA não se mostra relacionada ao estrogênio e os níveis encontrados em homens não se difere ao das mulheres antes da menopausa. O mecanismo que mostra a influência do estrogênio na síntese de DHA está representado na figura 8.

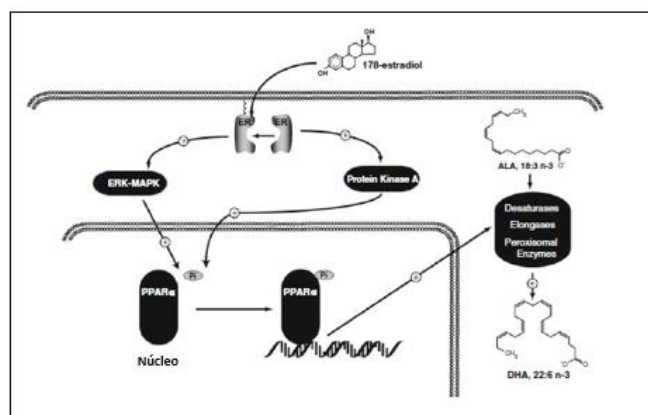


Figura 8 – Um mecanismo proposto para a ativação da síntese de DHA no peroxissomo. O proliferador peroxissomal alfa ativado é fosforilado por influência do 17 β - estradiol induz a síntese de enzimas que atuam na conversão do ALA a DHA nos peroxissomos. Adaptado de (Kitson *et al.* 2010).

Tabela 6 - Porcentagem de ômega-3 em peixes ricos em gordura.

Fontes de Omega 3	% total de ácidos graxos	
	Ácido eicosapentaenóico	Ácido decosaheptaenóico
Anchova	9,0-18,2	8,7-13
Sardinha	12,4-14,5	9,8-12,5
Cavalinha	6,1-6,7	7,0-8,7
Arenque	7,4-7,7	6,7-8,7
Salmão	12,7-13,4	10-10,2
Linguado	12,2	25,4
Badejo	10,6	19,5
Galeota	10,4	9,7
Menhaden	10,6-13,7	6,4-9,2
Capelin	9,9	7,9
Atum	4,6	18,3

Adaptado de (Racine and Deckelbaum 2007)

Um fator importante, é que mesmo o ALA podendo ser convertido a DHA e a EPA, a fração sérica dessas duas moléculas é muito baixa e, portanto, o ideal seria adquirir essas moléculas diretamente de alimentos ricos nas mesmas (Burdge and Calder 2006).

Na menopausa, como dito anteriormente, há aumento da gordura visceral e, por conta disso, é muito importante que haja meios para reverter essa situação. A suplementação da dieta com alguns tipos de ômega 3 se mostra promissora pelo fato dessas moléculas serem capazes de atuar no fígado e estimular a β -oxidação e diminuir a lipogênese (Takahashi *et al.* 2002).

1.11 ÁCIDO LIPOICO

Além dos ácidos graxos citados acima, outro ácido graxo com importante papel na proteção contra espécies reativas é o ácido lipoico (AL). O AL é uma molécula bioativa sintetizada na mitocôndria a partir do ácido octanóico e possui atividade antioxidante em dois estados de oxidação. No estado oxidado, é conhecido como alfa ácido lipóico e na sua forma reduzida, como ácido dihidrolipóico. Além disso, está presente em procariotos e eucariotos e é regulador chave no

metabolismo energético da mitocôndria (Biewenga *et al.* 1997). Outra característica importante do AL é a capacidade de diminuir os níveis de citosinas inflamatórias (Li *et al.* 2014), o que faz com que essa molécula tenha um potencial muito grande para amenizar os problemas gerados pela diminuição do estrogênio, já que a falta desse hormônio aumenta os níveis de citocinas inflamatórias (Weitzmann and Pacifici 2006) e o organismo se torna mais vulnerável ao estresse oxidativo. Além disso, a sua molécula lhe confere características anfipáticas. Deste modo, o AL é capaz de atuar tanto em locais hidrofílicos quanto hidrofóbicos.

Outra característica importante do AL está relacionada ao metabolismo energético do organismo. O AL é um cofator para enzimas mitocondriais como a piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (Hiller *et al.* 2014). Na literatura, inúmeros trabalhos mostram que o estrogênio é de suma importância no metabolismo celular. Os receptores de estrogênio possuem forte influência na transcrição de genes que codificam proteínas responsáveis por atuar no metabolismo da glicose e lipídios. Nesse contexto, no qual a perda da influência do estrogênio é drasticamente reduzida, o AL seria uma molécula promissora para atenuar desequilíbrios metabólicos. Na literatura, muitos estudos apontam que o AL é capaz de diminuir os níveis de triglicerídeos no soro (Pashaj *et al.* 2013) e reduzir a transcrição de genes envolvidos na lipogênese do fígado (Tong *et al.* 2015). Baseando-se no fato de que na menopausa há a tendência de aumento na fração lipídica das vísceras, a atuação do AL pode exercer efeito oposto a essa tendência. Tem sido mostrado na literatura, que o AL reduz o peso corporal em ratos obesos e que a administração de AL reduz a porcentagem do peso do fígado de ratos em relação a peso corporal (Park *et al.* 2008). Levando em conta que após a menopausa há maiores chances de desenvolvimento de resistência à insulina, e que essa resistência pode desencadear o aumento de gordura no fígado (Marchesini *et al.* 2001), o AL tem potencial para amenizar essa situação.

2. JUSTIFICATIVA

Na literatura, há inúmeros trabalhos que apontam o aumento de fatores de risco para muitas doenças após a perda da influência do estrogênio tanto em modelos experimentais quanto em mulheres. Para tentar remediar essa problemática, se adotou a terapia de reposição hormonal que auxiliou na amenização de inúmeros marcadores de risco cardíaco por ter ocorrido recuperação das funções de inúmeros órgãos, inclusive o fígado (que possui papel fundamental no metabolismo de lipídios do organismo). No entanto, há muitas controvérsias quanto ao uso da terapia hormonal e quanto ao momento para se adotar a sua utilização. Além disso, o estresse oxidativo se mostra um importante fator no desenvolvimento de doenças a partir da redução dos níveis de estrogênio. Portanto, a suplementação de antioxidantes que compartilham características semelhantes ao estrogênio, como a as propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, pode servir como uma aliada ao combate das adversidades advindas da falta desta classe hormonal.

3. OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo

3.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

Determinar a eficácia da suplementação da dieta de ratas em modelo de menopausa com os compostos antioxidantes ácido lipóico, ácido decohexaenóico e ácido eicospentaenoico, na redução de marcadores de estresse oxidativo no fígado. Verificar se a suplementação exerceu efeitos na atividade de enzimas antioxidantes e se a suplementação interferiu na síntese de Vitamina C e na absorção de Vitamina E das ratas suplementadas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar a atividade das enzimas antioxidantes CuZnSOD, MnSOD, GPx, as enzimas decompozitoras de peróxido de hidrogênio, catalase, peroxiredoxinas e Gpx, além da enzima GST. Analisar a atividade mitocondrial através da atividade da enzima fumarase.
- 2) Quantificar os níveis de dano oxidativo em proteínas e lipídios.
- 3) Quantificar os níveis de antioxidantes não enzimáticos Vitamina E, Vitamina C e NO.
- 4) Analisar se a ovariectomia acarretou estresse oxidativo e se a suplementação com ácido lipóico, ácido decohexaenóico e ácido eicospentaenoico foram capazes de atuar de maneira a reverter o estresse oxidativo, caso ele tenha ocorrido.

4 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Este artigo será submetido a revista Molecular Nutrition & Food Research.

Menopause and the effects of supplementation with lipoic acid in the liver

Ártur K. Schüller¹, Diego A. Mena Canata¹, Vanessa K. Engers¹, Fernanda S. Hackenhaar¹, Fernanda M. Heeman¹, Jordana S. Putti¹, Tiago B. Salomon¹ Mara S. Benfato¹

¹ Department of Biophysics, Program of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Scope: The bilateral ovariectomy in rats is an experimental model to analyze the effects of menopause and possible strategies to mitigate the deleterious effects of this condition. Supplementation of the diet with antioxidants has been used to reduce the potential oxidative stress that menopause may cause.

Methods and Results: In this study, we analyzed the effects of lipoic acid supplementation in the diet of ovariectomized rats. The lipoic acid was chosen because of its antioxidant capacity and being a cofactor of the enzymes involved in the metabolism of lipids. Our results demonstrate that lipoic acid is capable of acting in the liver and recover the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (MnSOD) and glutathione peroxidase (GPx), and reduce oxidative damage of proteins and maintain the levels of malondialdehyde (MDA) similar to the control group. Moreover, the lipoic acid also reduced levels of nitrites and nitrates. Levels of vitamin C and vitamin E showed no difference between groups.

Conclusions: Therefore, we showed that the LA was effective in modulating the activity of antioxidant enzymes and decreased damage proteins in the liver of ovariectomized rats.

Keywords:

Liver / Lipoic acid / Ovariectomy / Oxidative stress / SOD / GPx

1 Introduction

Bilateral ovariectomy in rats has been used as a model to analyze the consequences of menopause [1, 2]. The loss of the reproductive phase is associated with hormonal changes [3]. Menopause causes a significant decrease in estrogen levels and along with it there are numerous other changes that are controlled by these hormones. Among them, the body fat distribution, changes in iron metabolism and an increased risk for atherosclerosis [4]. This class of sex hormones has a phenolic grouping, which gives them an antioxidant feature [5]. Estrogen is also capable of increasing the expression of antioxidant enzymes and can act as a metal chelator [6, 7], which increase the risk of oxidative stress. So in addition to exercise physiological functions related to the development and metabolism [8, 9], it is also strongly related to the redox balance.

In literature, there are many studies stating that after the onset of menopause, various metabolic imbalances are observed. Among them, weight gain [10], accumulation of visceral fat in adipose tissue and liver. This situation contributes to the increase in risk factors for the development of metabolic syndrome [11]. The decline in estrogen levels is also connected to a decrease in fatty acid oxidation during exercise and sleep [11, 12], which contributes to weight gain. Along with this, especially in the liver, there is a large increase in inflammatory cytokines, such as interleukin -6 (IL -6), tumor necrosis factor - alpha (TNF- α) and interleukin -1 (IL-1) [13]. These pro- inflammatory factors are involved in the production of reactive oxygen species and nitrogen, especially nitric oxide (NO) derived from the inducible nitric oxide synthase [14] and this can lead to oxidative stress. Therefore, dietary supplementation with antioxidants may be a promising strategy in order to reduce the effects of inflammation in the production of reactive species. Furthermore, supplementation with antioxidants can also assist in controlling the metabolic change which is caused by the decrease in estrogen levels, since some antioxidants have the ability to regulate metabolic dysfunctions directly or indirectly.

Lipoic acid (LA) is a bioactive molecule synthesized in the mitochondria and has antioxidant activity in two oxidation states. In the oxidized state, it is referred to as alpha lipoic acid and its reduced form as dihydrolipoic acid. It is also present in prokaryotes and eukaryotes and is a key regulator of energy metabolism in the mitochondria [15]. Another important feature of LA is the ability to decrease levels of inflammatory cytokines [16-18], causing it to be a promising molecule to soften the

problems generated by lack of estrogen, since the lack of this hormone increases levels of inflammatory cytokines and the organism becomes more vulnerable to oxidative stress.

Additionally, it also acts recycling antioxidant molecules such as vitamin C and vitamin E [15]. Another important characteristic that LA shares with the estrogen is the ability to chelate transition metals [19]. All these characteristics place lipoic acid as a very promising molecule for treatment of diseases that are influenced by oxidative stress and the lack of estrogen. The supplementation with lipoic acid (1,2-Dithiolane-3-pentanoic acid), helps convert carbohydrates into energy, thus providing a lower conversion rate of carbohydrates into lipids. The lipoic acid acts in a very obvious way as coenzyme for pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase enzymes [20] playing an important role in the breakdown of glucose and optimization of the citric acid cycle, thus regulating the energy metabolism body which is less effective at menopause.

In this study, we saw that LA influences the activity of MnSOD and GPx, and reduce levels of oxidized proteins. Furthermore, it was also effective in reducing the levels of NO. And the levels of malondialdehyde were similar to the control group. Our results suggest that LA is capable of increasing the activity of antioxidant enzymes and reducing oxidative damage in menopausal model. Justificativa para a utilização.

2 Material and Methods

2.1 Animals

This study employed 15 three-month-old Wistar female rats (*Rattus norvegicus*). Rats were housed in polypropylene cages with five animals per cage. All animal studies followed the rules from the EU Directive for animal experiments 2010/63/EU and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (DHEW Publication No. (NIH) 85-23, revised in 1996, Office of Science and Health Reports, Division of Research Resources/NIH, Bethesda, MD, USA) and were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle at a temperature of 24 ± 1 °C.

Animals were fed standard lab chow and drinking water *ad libitum*. The rats were divided into three groups of five animals each. Two groups were subjected to bilateral ovariectomy and one group was sham operated, but without removal of the ovaries (SHAM group). Ovariectomy was performed during diestrus (determined by vaginal smear). Animals in SHAM group were assessed and euthanized during diestrus [21]. The surgical procedure was performed under general anesthesia, administered as an i.p. injection of a combination of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg). Immediately after surgery, while still under anesthesia, the rats received a combination of antibiotics and anti-inflammatory drugs (Pencivet PPU Plus, Intervet/Schering-Plough Animal Health, 0.1 ml/100g, i.m.; containing (per 100 ml): procaine benzylpenicillin G, 10.000.000 IU, benzathine benzylpenicillin G, 10.000.000 IU dihydrostreptomycin, 10.5 mg, piroxicam 1.0 mg). After surgery, the animals were maintained under a heat lamp until recovered from anesthesia. Animals received analgesia acetaminophen (Paracetamol, MSD) at a dose of 200 mg/kg, diluted in the drinking water with for 3 days. After the period of study of 16 weeks, the animals were euthanized under general anesthesia by i.p. injection of combination of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg) for removal of liver and withdrawal of blood for hormonal analysis.

2.2 Diet

Animals were acclimated to a nutritionally balanced diet comprising 22% proteins, 5% cellulose, 4% fatty acid, 1.4% calcium, 0.8% phosphorus, and 60% starch with added vitamins, minerals, and antioxidants (Nuvilab, Brazil), according to AIN93 [22], for 1 week prior to ovariectomy. All diets had a total of 4% fat and at least 2% grain oils, amounts slightly above the minimum required to prevent a deficiency of long chain omega-6 polyunsaturated fatty acid (1%). One week after surgery, animals were randomly assigned to three groups: one control group was sham-operated (SHAM) and received standard diet, and one ovariectomized group (OVX) received the standard diet; operated animals that received supplementation were supplemented with LA. The LA group received supplementation with alpha-lipoic acid (180 mg/kg/day). All groups received the diets for a period of 16 weeks. Diets were formulated with alpha-lipoic acid blended daily into the experimental diet to prevent fatty acid oxidation and loss of antioxidants before their use. The SHAM group was fed *ad libitum*. The food intake of the ovariectomized groups was limited to that of the

SHAM group to reduce ovariectomy-induced weight gain. All animals had *ad libitum* access to water throughout the study period. Body weights of all animals were measured weekly and food intake was recorded daily.

2.3 Organs and tissues

Animals were sacrificed according to the experimental protocol [23]. All animals were anesthetized by i.p. injection with a mixture of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After saline infusion, organs were removed and frozen in liquid nitrogen immediately for later analysis. Livers were manually macerated. Macerated tissues were mixed in 10 mL with 30 mmol/L phosphate buffer, 120 mmol/L KCl, 0.201 mmol/L PMSF, pH 7.4, sonicated three times for 10s each, and centrifuged for 10 min, 1700 x g. The supernatant of each tube was transferred to a second tube and centrifuged again for 10 min at 1700 x g. The supernatant from the second centrifugation was aliquoted and frozen at -80 °C for later analysis and assays.

2.4 Hormonal level measurements

Levels of 17 β -estradiol in serum were estimated by solid phase radioimmunoassay using Estrogen Coat-a-Count DPC kits (Diagnostic Products Corporation/USA).

2.5 Enzymatic activity

Cytosolic superoxide dismutase (CuZnSOD) and mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) activity was measured using the RanSOD kit (Randox, UK), with absorbance measured at 505 nm. Enzyme activities were analyzed according to the ideal pH for both. Enzymatic kinetics of GPx was assessed by the Ransel_ Kit (Randox, UK), with absorbance measured at 340 nm. The consumption of H₂O₂ was evaluated by measuring the rate of H₂O₂ consumption via absorbance at 240 nm [24]. The activity was expressed as units per milligram of protein; 1 U was defined as the capacity to consume 1 μ mol of H₂O₂ per minute. We report consumption of H₂O₂ because there are multiple mechanisms of detoxification of H₂O₂ (mainly CAT and peroxiredoxins), and the test is not specific for any of them. The activities were expressed as U/mg of protein. The fumarase activity was accessed by the conversion of fumarate to malate and measured at 240 nm [25].

2.6 HPLC assays

Levels of vitamin C (VitC), a non-enzymatic antioxidant, and malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation, were measured by HPLC employing a reversed-phase column (SUPELCOSIL™ LC-18-DB HPLC column; 15 cm × 4.6 mm, 5 μm), using a mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v); samples were injected in a volume of 25 μL. The absorbance of the column effluent was monitored at 254 nm [26]. Under these conditions, the retention time of vitamin C was 3.0 min and MDA was 5.6 min. The amount of Vitamin E (VitE) was measured by HPLC using a 15 cm x 4.6 mm column (Nucleosil 120 C-18) with continuous flow of 2 mL per minute 93.5:3.5 (v/v) methanol:water. Detection was carried out by fluorescence (295 nm excitation and 350 nm emission). The retention time of VitE was 5 min. The amount of VitE was expressed as nmol of Vit. E/mg protein calculated from an alpha-tocopherol standard [27].

2.7 Oxidative damage and indirect nitric oxide levels

As an index of protein damage, carbonyl levels were marked with 2, 4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) and measured at 370 nm [28]. Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/mg of protein. Malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation [26]. As an index of indirect nitric oxide levels, a variation of the Griess test was used to determine total nitrate and nitrite levels [29]

2.8 Data normalization

All results were normalized to protein concentration determined by Bradford method using BSA (bovine serum albumin) as a standard [30]. All assays in this study were independently performed in triplicate.

2.9 Statistical analysis

Data were expressed as mean ± S.D. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using *post hoc* Tukey test. Non parametric dates was performed whith independente- sample Kruskal-Wallis test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Statistical analysis was accomplished with the support of the Statistical Nucleus of the Federal University of

Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS). A software package was used for all calculations (SPSS version 19.0.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

3 Results

3.1 Estrogen levels

The success of menopause model is only achieved if the estrogen levels of ovariectomized groups are equal to estrogen levels of the rats in estropause. In this study, estrogen levels decrease significantly when comparing the SHAM group to the other ovariectomized groups (Fig. 1). This result proves that the animals were subjected to an effective menopausal model. When analyzing the data, it is evident that all the ovariectomized animals have estrogen levels lower than the SHAM group.

3.2 Markers of oxidative damage

Oxidative damage in protein, which is caused by oxidation and formation of carbonyl groups in the side chain of the aminoacids is higher in OVX group compared to the other groups. The levels of oxidative damage to proteins in the LA group are smaller than the other groups (Fig. 2a). The levels of malondialdehyde (MDA), one of the end products of lipid peroxidation, significantly decreased in OVX group compared to the sham group and the LA group (Fig. 2b).

3.3 Non-enzymatic antioxidant levels

The OVX group presents higher levels of nitric oxide (NO) compared to SHAM and AL groups and there are lower levels of NO in the LA group compared to SHAM group (Fig. 3a). VitE levels did not differ between the groups (Fig. 3b). The levels of vitamin C, which is synthesized in the liver of most animals, presented no difference between SHAM and OVX groups. However, a group supplemented with lipoic acid showed levels lower than sham group (Fig. 3c).

3.4 Activity of enzymes

The activity of CuZnSOD did not differ between ovariectomized groups, OVX and LA. However, both ovariectomized groups showed reduced activity when compared to SHAM group (Fig. 4a). Interestingly, the activity of MnSOD was much higher in the LA group when compared to the OVX group and is also higher compared to the SHAM group. The OVX group showed a significant reduction in the

activity of MnSOD in relation with the other groups (Fig. 4b). The GPx activity was higher in the LA group compared to the OVX group, but was lower than SHAM group. This result shows that the LA is capable of increasing GPx activity, though not resemble the SHAM group. OVX group showed greatly reduced activity when compared to other groups (Fig. 4c). The ovariectomy increased the activity of enzymes that break down hydrogen peroxide. The consumption of H_2O_2 was lower in LA than OVX and SHAM groups (Fig. 4d). The OVX group showed a significant reduction in the activity of fumarase in relation with the other groups and the LA group had higher activity fumarase enzyme compared to SHAM group (Fig. 4e).

4. Discussion

The menopausal model adopted by this study showed that ovariectomy increases oxidative damage to proteins in ovariectomized rats that did not receive LA supplementation. One factor that may have contributed in reducing levels of protein carbonyls of supplemented rats may be the increased activity of MnSOD and GPx enzymes, as well as the antioxidant capacity of the LA. The LA has the ability to increase the expression of the GPx [31], can chelate transition metals and also increase the expression of MnSOD [32, 33], which reduces the risk of protein oxidation.

The increase of MnSOD activity can be explained by the LA ability to increase mitochondrial activity [34]. The possible increased mitochondrial activity may cause an increase of MnSOD activity, since the production of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) could be increased. If the mitochondrial activity is increased, the production of reactive oxygen species (ROS) may increase due to faults in the transfer of electrons in the electron transport chain. One of these reactive species could be $O_2^{\cdot-}$. Therefore, the increase of MnSOD activity is very important to control this reactive species. Furthermore, LA also acts in the recycling of antioxidant molecules. Among these molecules, ascorbate can also be recycled by LA [35]. Nevertheless, Vit C levels did not differ between groups. This result can be explained because there is no need for synthesis of VitC by the LA supplemented group.

On the other hand, the group supplemented with LA, as well as the OVX group also showed a low activity of the CuZnSOD enzyme when compared to the SHAM group. In the literature, there are studies showing that rats receiving estrogen supplementation have higher expression of CuZnSOD and MnSOD [36, 37]. What

can explain the low activity of CuZnSOD in ovariectomized are the low levels of estrogen that these groups present. However, the MnSOD enzyme showed greater activity in the group supplemented with LA, even with this group showing lower levels of estrogen. In the literature, there are studies that demonstrate the action of the LA in increased expression and activity of MnSOD. One of these mechanisms is associated with the class of Sirt proteins. This class of proteins is induced after treatment with LA and this causes the number of mitochondrial copies increases [20]. With this increase, it would be natural increased MnSOD. In addition to this, the enzyme fumarase activity was higher in the LA group compared to the other groups. Although the fumarase enzyme is present in both the cytosol and in mitochondria, the treatment with LA made its activity was greater. This result indicates that this higher activity may be related to increased mitochondrial copies that LA is capable of inducing [20, 38]. Furthermore, the cellular localization of fumarase in mammalian cells is primarily in the mitochondrial matrix [39]. Therefore, although the fumarase may be in the cytosol, our results suggest that the activity of fumarase is mostly associated with mitochondrial fumarase.

But despite the benefits of LA pointed out above, the MDA levels of OVX group were lower than the other groups. This result might be due to increased levels of NO that were observed in the OVX group. NO is an inorganic free radical flowing freely through cell membranes by being lipophilic and quickly reacts with superoxide and the peroxy radical (LOO^\bullet). Lipid peroxidation is an event that occurs in a chain reaction [40]. When a hydrogen atom is stolen from a polyunsaturated fatty acid, the damage spreads through the lipid molecule. This event is propagated through the formation of the LOO^\bullet radical. This radical attacks the carbon adjacent and turns it into another LOO^\bullet after some reactions. This event successively occurs to generate an MDA molecule, which would be the end products of lipid peroxidation.

The MDA formation is inhibited if this chain reaction is stopped. It is precisely in the spread of such damage, that NO acts on the protection of lipid peroxidation. The rate of reaction between NO and LOO^\bullet is 10000 times higher than the reaction speed between LOO^\bullet and VitE [41, 42]. However, OVX rats showed low CuZnSOD and MnSOD activity of the enzymes as mentioned above. This situation is conducive to the increased quantities of $\text{O}_2^{\bullet -}$ that is a target of NO and the reaction between them generates peroxynitrite, a reactive species with great capacity to cause damage to proteins and other biomolecules. In spite the lower levels of MDA in the OVX

group, the possible peroxynitrite production can also have consequences for the cell. The superoxide radicals generated in the cell may not be satisfactorily controlled due to the decreased activity of these enzymes. Studies have shown that NADPH oxidase increases its expression in ovariectomized rats [43]. The increased expression of this enzyme increase superoxide levels in tissue. This situation can be remedied through the action of nitric oxide synthase (iNOS). Macrophages and hepatocytes synthesize this enzyme and the liver has a large amount of macrophages [44, 45]. Furthermore, the activity of iNOS is increased in ovariectomized rats [46-48]. However, LA molecule has the ability to inhibit expression of iNOS and, therefore, NO production is diminished [49]. This situation decreases the interaction between NO and LOO^{\bullet} causing the continuous production of MDA. This situation would explain higher MDA levels in the LA groups compared to the OVX group. Another way to deal with the excess of peroxynitrite is related to the activity of peroxiredoxins. These enzymes decompose hydrogen peroxide and are also capable of decomposing peroxynitrite [50]. The peroxiredoxins are located in the cytosol, peroxisome and mitochondria, and they can be exported out of the cell [51]. The OVX group showed greater ability to decomposition of hydrogen peroxide when compared to the other groups. This can be explained by the fact that the NO levels are higher in this group at the same time, the activity of the CuZnSOD, MnSOD enzymes are reduced. Thus, the conditions for reacting NO with $O_2^{\bullet -}$ become favorable and the cell needs of peroxiredoxins to handle the excess of peroxynitrite. It is very important to highlight the fact that the GPX be controlled by estrogen and is with reduced activity in OVX group. As the enzyme catalase is located in peroxisomes, it is up to peroxiredoxins deal with peroxynitrite in the cytosol. Because of this, it can be inferred that the increase in capacity decomposition of hydrogen peroxide made by the OVX group is associated with increased production of peroxynitrite and the need to reduce the levels of this molecule.

Another important result for this study was the levels of VitE. This molecule is considered an excellent protector of lipids and there was no change in the levels of this molecule among the experimental groups. The uniformity of the VitE levels between the groups suggest that the MDA results is not affected by this antioxidant molecule.

Therefore, our study of menopausal model shows that LA is able to exert protection against protein carbonylation and our results suggest that LA influences the activity of GPx and MnSOD enzymes, and could reduce the need for synthesis of vitamin C by acting in oxidative defense. On the other hand, the LA increased MDA levels in supplemented rats. But MDA levels presented are equal to the sham group.

Estrogen increases the activity of antioxidant enzymes as well as the LA. Another similarity between the two molecules is the ability to chelate transition metals. Together with this, lipoic acid corrects problems of mitochondrial dysfunction by being a cofactor of numerous enzymes necessary for the mitochondrial energy metabolism [52, 53]. The action of the LA on the mitochondria is much explored in articles with type 2 diabetes [54, 55]. Studies have shown that during menopause, the risk of developing type 2 diabetes is increased due to insulin resistance, which is generated from the mitochondrial dysfunction [56]. This situation is reversed when LA is used as a supplement [57-60].

Thus, our study, pioneer in supplementing the diet of ovariectomized rats with LA, confirms other studies that demonstrate the resilience that LA can exert on mitochondria when analyzing the activity of MnSOD and the possible anti-inflammatory effect caused by the reduction of nitrite levels observed in supplemented group. However, by diminishing the production of NO by the inducible nitric oxide synthase there were an increase of MDA production. But the MDA levels are presented similar to the SHAM group. This indicates that our treatment had a beneficial effect in regarding to protein and enzymatic activity of MnSOD and GPx, and despite the increase of MDA observed in the supplemented group compared to OVX, there was no difference between LA and SHAM, showing that supplementation exerts protection for protein, and does not change the MDA levels compared to control.

REFERENCES

- [1] Salazar M, Hernandez L, Ramos AL, Micheletti KR, Albino CC, Nakamura Cuman RK (2011) Effect of teriparatide on induced tooth displacement in ovariectomized rats: A histomorphometric analysis. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 139: E337-E344

- [2] Peng ZQ, Vaananen HK, Zhang HX, Tuukkanen J (1997) Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* 20: 207-212
- [3] Jian J, Pelle E, Huang X (2009) Iron and Menopause: Does Increased Iron Affect the Health of Postmenopausal Women? *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 2939-2943
- [4] Grygiel-Gorniak B, Marcinkowska J, Szczepanik A, Przyslawski J (2014) Nutritional habits and oxidative stress in postmenopausal age. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej-Polish Archives of Internal Medicine* 124: 298-305
- [5] Prokai L, Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Simpkins JW (2005) Mechanistic insights into the direct antioxidant effects of estrogens. *Drug Development Research* 66: 118-125
- [6] Borrás C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, et al. (2005) 17 beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2(MAPK)/NF kappa B cascade. *Aging Cell* 4: 113-118
- [7] Ruizlarrea B, Leal A, Martin C, Martinez R, Lacort M (1995) Effects of estrogens on the redox chemistry of iron - A possible mechanism of action of estrogen. *Steroids* 60: 780-783
- [8] Kim JH, Cho HT, Kim YJ (2014) The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocrine Journal* 61: 1055-1067
- [9] Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P (2006) Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current Genomics* 7: 497-508
- [10] Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, et al. (2012) Understanding weight gain at menopause. *Climacteric* 15: 419-429
- [11] Abildgaard J, Pedersen AT, Green CJ, et al. (2013) Menopause is associated with decreased whole body fat oxidation during exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 304: E1227-E1236
- [12] Lovejoy JC, Champagne CM, de Jonge L, Xie H, Smith SR (2008) Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *International Journal of Obesity* 32: 949-958
- [13] Weitzmann MN, Pacifici R (2006) Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *Journal of Clinical Investigation* 116: 1186-1194

- [14] Morschl E, Pavo I, Varga G, Nemcsik J, Laszlo F, Whittle BJR (2001) Endogenous bacteria-triggered inducible nitric oxide synthase activation protects the ovariectomized rat stomach. *Journal of Physiology-Paris* 95: 137-140
- [15] Biewenga GP, Haenen G, Bast A (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology* 29: 315-331
- [16] Li Y, Ma Q-G, Zhao L-H, et al. (2014) Effects of Lipoic Acid on Immune Function, the Antioxidant Defense System, and Inflammation-Related Genes Expression of Broiler Chickens Fed Aflatoxin Contaminated Diets. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 5649-5662
- [17] Maczurek A, Hager K, Kenkies M, et al. (2008) Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1463-1470
- [18] Tanaka Y, Kaibori M, Miki H, et al. (2015) Alpha-lipoic acid exerts a liver-protective effect in acute liver injury rats. *Journal of Surgical Research* 193: 675-683
- [19] Gomes MB, Negrato CA (2014) Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 6
- [20] Pilar Valdecantos M, Perez-Matute P, Gonzalez-Muniesa P, Prieto-Hontoria PL, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA (2012) Lipoic Acid Improves Mitochondrial Function in Nonalcoholic Steatosis Through the Stimulation of Sirtuin 1 and Sirtuin 3. *Obesity* 20: 1974-1983
- [21] Spradley JM, Freeman ME, Wilson JL, Davis AJ (2008) The influence of a twice-a-day feeding regimen after photostimulation on the reproductive performance of broiler breeder hens. *Poultry Science* 87: 561-568
- [22] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents - Final report of the american institute of nutrition Ad HOC writing committee on the reformulation of the AIN-76A RODENT DIET. *Journal of Nutrition* 123: 1939-1951
- [23] Hackenhaar FS, Salomon TB, Gil Alabarse PV, Ehrenbrink G, Benfato MS (2009) Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochemistry and Function* 27: 378-382
- [24] Aebi H (1984) CATALASE INVITRO. *Methods in Enzymology* 105: 121-126

- [25] Mescam M, Vinnakota KC, Beard DA (2011) Identification of the Catalytic Mechanism and Estimation of Kinetic Parameters for Fumarase. *Journal of Biological Chemistry* 286: 21100-21109
- [26] Karatepe M (2004) Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America*: 104-106
- [27] Barbas C, Castro M, Bonet B, Viana M, Herrera E (1997) Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 778: 415-420
- [28] Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186: 464-478
- [29] Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR (1996) Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase* 268: 237-246
- [30] Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- [31] de Souza GF, Saldanha GB, de Freitas RM (2010) Lipoic acid increases glutathione peroxidase, Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures? *Arquivos De Neuro-Psiquiatria* 68: 586-591
- [32] (2014) The Effects of α-Lipoic Acid on Liver Oxidative Stress and Free Fatty Acid Composition in Methionine–Choline Deficient Diet-Induced NAFLD. *Journal of Medicinal Food* 17: 254-261
- [33] Arambasic J, Mihailovic M, Uskokovic A, et al. (2013) Alpha-lipoic acid upregulates antioxidant enzyme gene expression and enzymatic activity in diabetic rat kidneys through an O-GlcNAc-dependent mechanism. *European Journal of Nutrition* 52: 1461-1473
- [34] Padmalayam I, Hasham S, Saxena U, Pillarisetti S (2009) Lipoic Acid Synthase (LASY) A Novel Role in Inflammation, Mitochondrial Function, and Insulin Resistance. *Diabetes* 58: 600-608
- [35] Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, et al. (1992) Dihydrolipoic acid - A universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase - Reduction of peroxy, ascorby and chromanoxyl radicals. *Biochemical Pharmacology* 44: 1637-1649

- [36] Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Duce JA, Finkelstein DI (2007) 17 beta-Estradiol reduces nitrotyrosine immunoreactivity and increases SOD1 and SOD2 immunoreactivity in nigral neurons in male mice following MPTP insult. *Brain Research* 1164: 24-31
- [37] Rao AK, Dietrich AK, Ziegler YS, Nardulli AM (2011) 17 beta-Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: A mechanism to protect neurons from ischemia. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127: 382-389
- [38] Fernandez-Galilea M, Perez-Matute P, Prieto-Hontoria PL, et al. (2015) alpha-Lipoic acid treatment increases mitochondrial biogenesis and promotes beige adipose features in subcutaneous adipocytes from overweight/obese subjects. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851: 273-281
- [39] Bowes T, Singh B, Gupta RS (2007) Subcellular localization of fumarase in mammalian cells and tissues. *Histochemistry and Cell Biology* 127: 335-346
- [40] Morel I, Cillard J, Lescoat G, et al. (1992) Antioxidants and free radicals scavenging activities of the iron chelators pyoverdin and hydroxypyrid-4-ones in iron-loaded hepatocyte cultures - Comparison of their mechanism of protection with that of desferrioxamine. *Free Radical Biology and Medicine* 13: 499-508
- [41] Odonnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, DarleyUsmar VM, Freeman BA (1997) Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: Kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* 36: 15216-15223
- [42] Patel RP, Levonen AL, Crawford JH, Darley-Usmar VM (2000) Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 47: 465-474
- [43] Gabriel Camporez JP, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, de Oliveira Carvalho CR (2011) Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *Journal of Physiology-London* 589: 2585-2596
- [44] Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM (1992) Molecular-cloning and functional expression of an inducible nitric-oxide synthase from a murine macrophage cell-line. *Journal of Biological Chemistry* 267: 6370-6374
- [45] Geller DA (1995) Hot papers *Molecular-Biology* - molecular-cloning and expression of inducible nitric-oxide synthase from human hepatocytes by Geller,D.A.,

- Lowenstein,C.J., Shapiro,R.A., Nussler,A.K., Disilvio,M., Wang,S.C., Nakayama, D.K., Simmons,R.L., Snyder,S.H., Billiar,T.R. *Scientist* 9: 14-14
- [46] Karpuzoglu E, Ahmed SA (2006) Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 15: 177-186
- [47] Tamura K, Yamaguchi K, Kogo H (2000) 17 beta-estradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo. *Life Sciences* 66: PL259-PL264
- [48] Priyanka HP, Singh RV, Pratap UP, ThyagaRajan S (2014) Estrogen modulates beta(2)-adrenoceptor-induced cell-mediated and inflammatory immune responses through ER-alpha involving distinct intracellular signaling pathways, antioxidant enzymes, and nitric oxide. *Cellular Immunology* 292: 1-8
- [49] Karabay AZ (2015) Inhibitory effects of indole α -lipoic acid derivatives on nitric oxide production in LPS/IFN γ activated RAW 264.7 macrophages. In: Koc A (ed), *cell biochemistry and function*, pp 121–127
- [50] Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005) Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 1543-1552
- [51] Wood ZA, Schroder E, Harris JR, Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences* 28: 32-40
- [52] Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1790: 1149-1160
- [53] Reed LJ (1998) From lipoic acid to multi-enzyme complexes. *Protein Science* 7: 220-224
- [54] Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C (2014) Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1840: 2709-2729
- [55] Sankar P, Zachariah B, Vickneshwaran V, Jacob SE, Sridhar MG (2015) Amelioration of oxidative stress and insulin resistance by soy isoflavones (from *Glycine max*) in ovariectomized Wistar rats fed with high fat diet: The molecular mechanisms. *Experimental Gerontology* 63: 67-75

- [56] Kandeil MA, Amin KA, Hassanin KA, Ali KM, Mohammed ET (2011) Role of lipoic acid on insulin resistance and leptin in experimentally diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications* 25: 31-38
- [57] Yi X, Xu L, Hiller S, et al. (2012) Reduced Expression of Lipoic Acid Synthase Accelerates Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 23: 103-111
- [58] Derosa G, Preciado Limas C, Ceballos Macias P, Estrella A, Maffioli P (2014) Dietary and nutraceutical approach to type 2 diabetes. *Archives of Medical Science* 10: 336-344
- [59] Gebka A, Serkies-Minuth E, Raczynska D (2014) Effect of the Administration of Alpha-Lipoic Acid on Contrast Sensitivity in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes. *Mediators of Inflammation*
- [60] Victor VM, Rocha M, Herance R, Hernandez-Mijares A (2011) Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Current Pharmaceutical Design* 17: 3947-3958

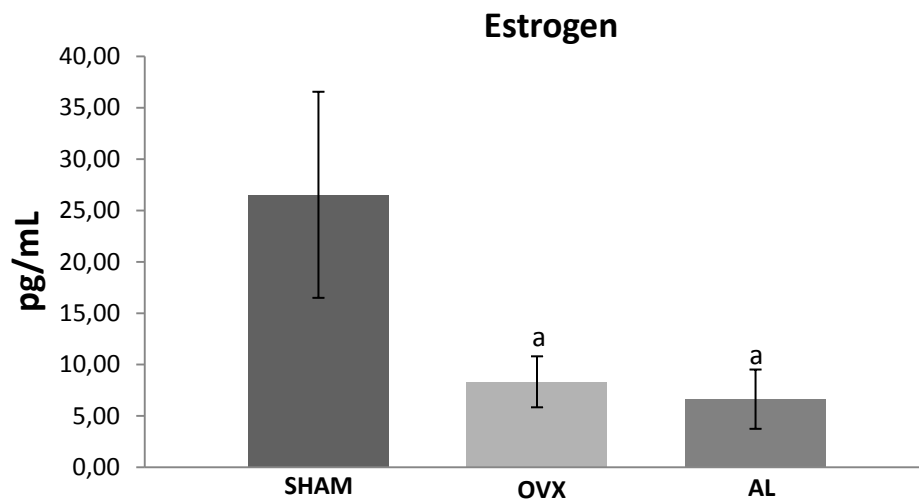
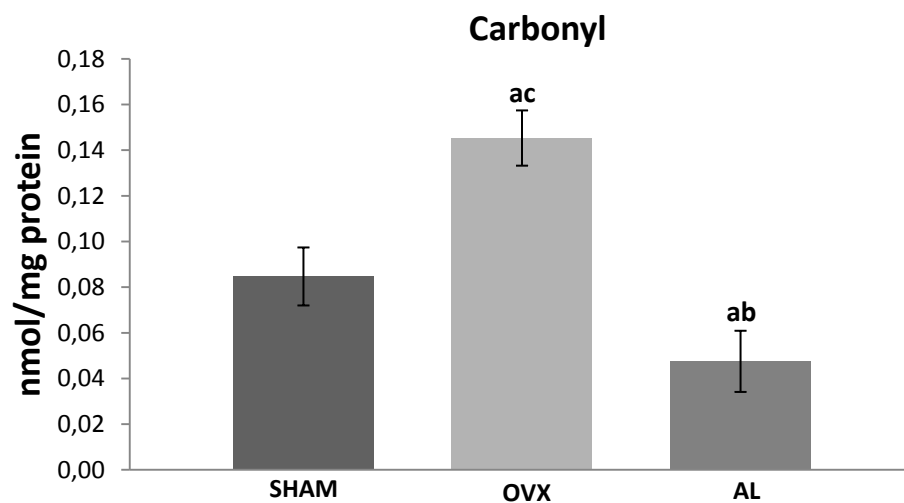


Fig. 1. Comparison of estrogen levels among groups. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. a= is different from SHAM.

A



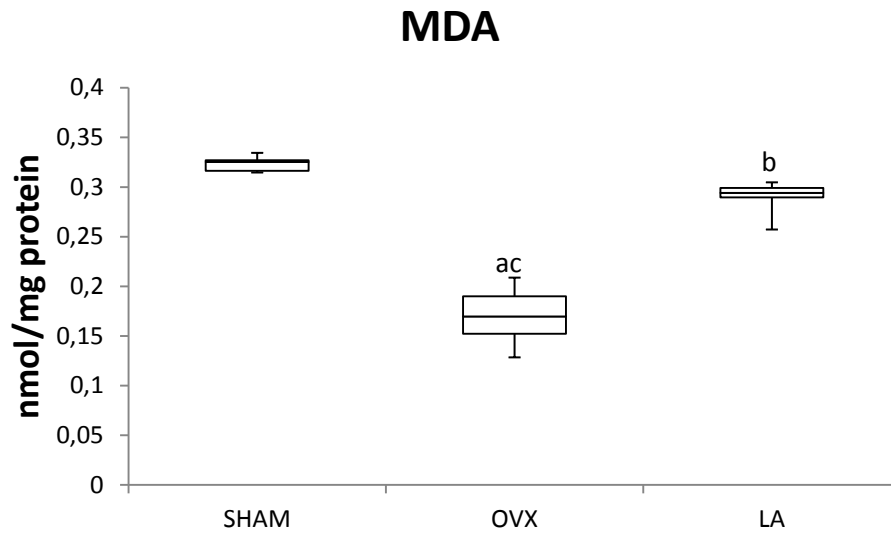
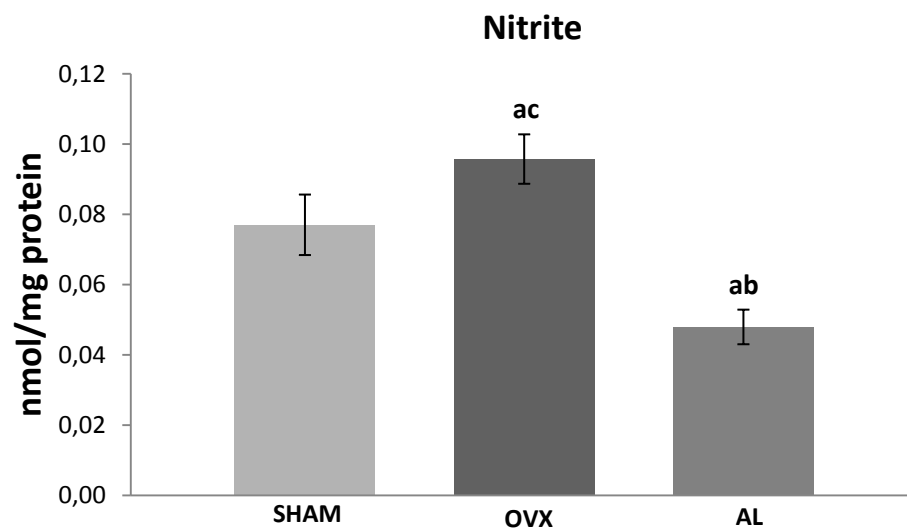
B

Fig. 2. Markers of oxidative damage. Oxidative damage levels in Proteins in A. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Oxidative damage levels in lipids in B. The results were analyzed using Kruskal–Wallis followed by Dunn test in order to determine statistical significance among the different groups. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. a= is different from SHAM; b= is different from OVX; c= is different from DHA and d= is different from EPA.

A

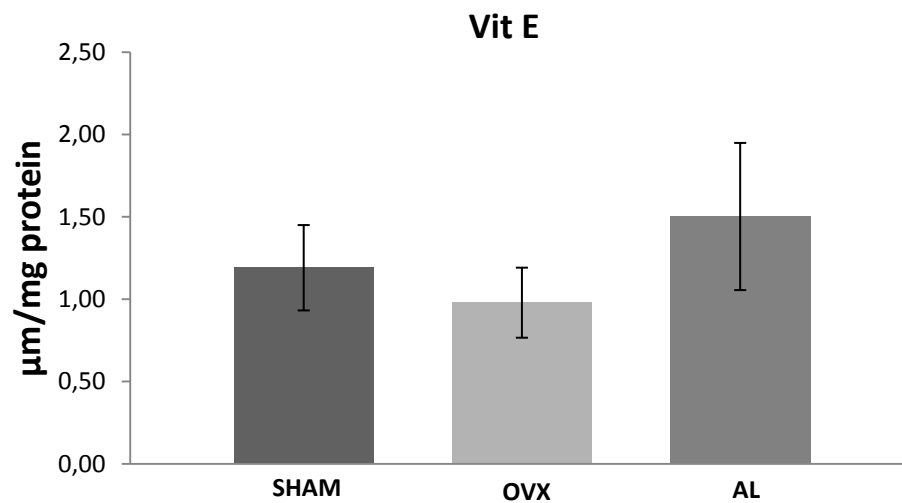
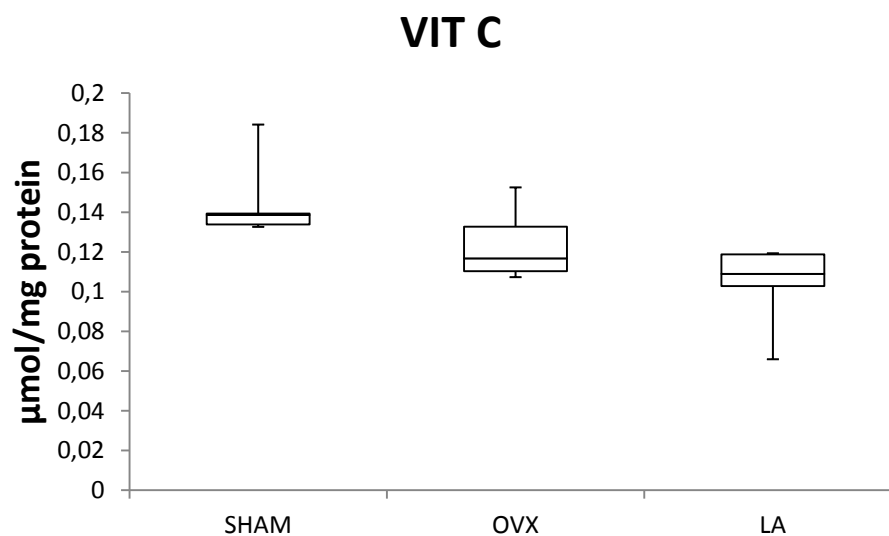
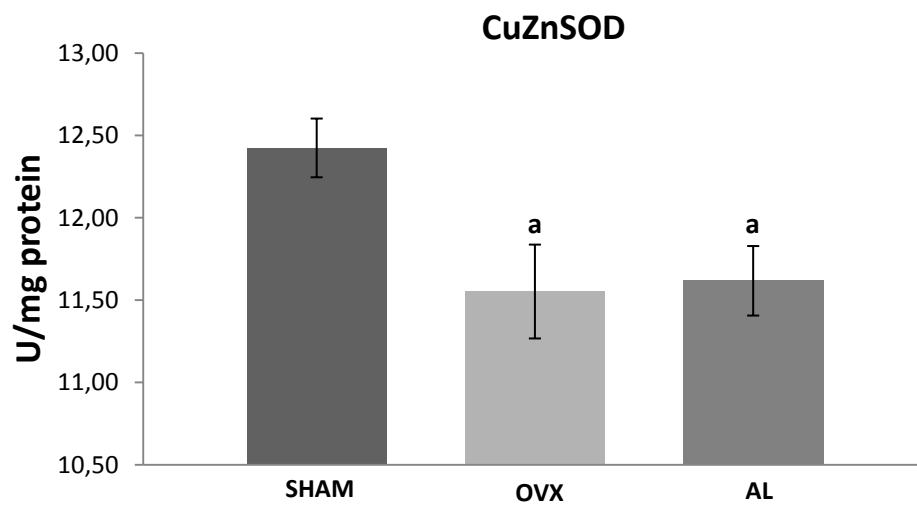
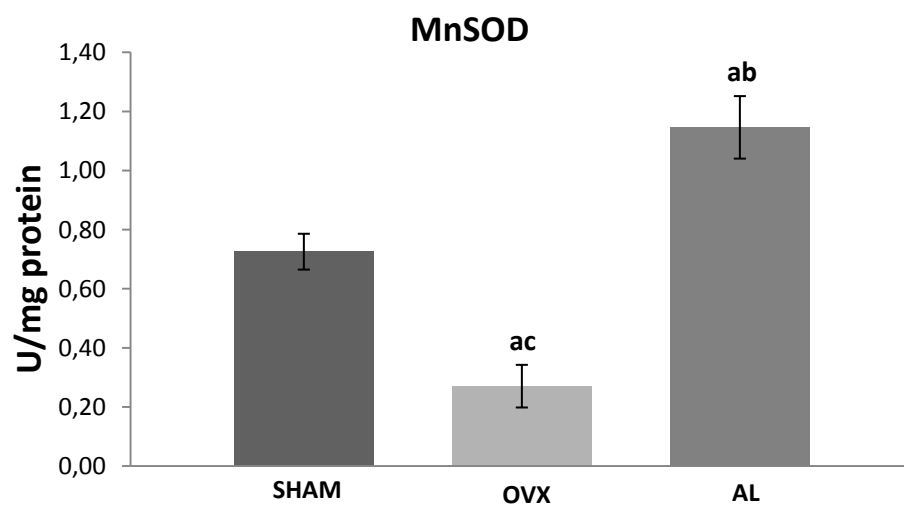
B**C**

Fig. 3. Non-enzymatic antioxidants. Nitrite levels in A and Vit E levels in B. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Vit C levels in C. The results were analyzed using Kruskal–Wallis followed by Dunn test in order to determine statistical significance among the different groups. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. a= is different from SHAM; b= is different from OVX; c= is different from DHA and d= is different from EPA

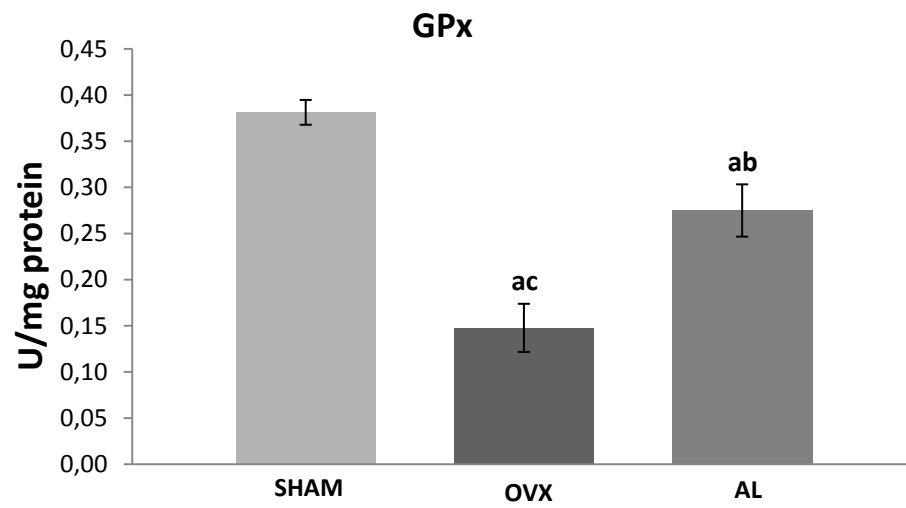
A



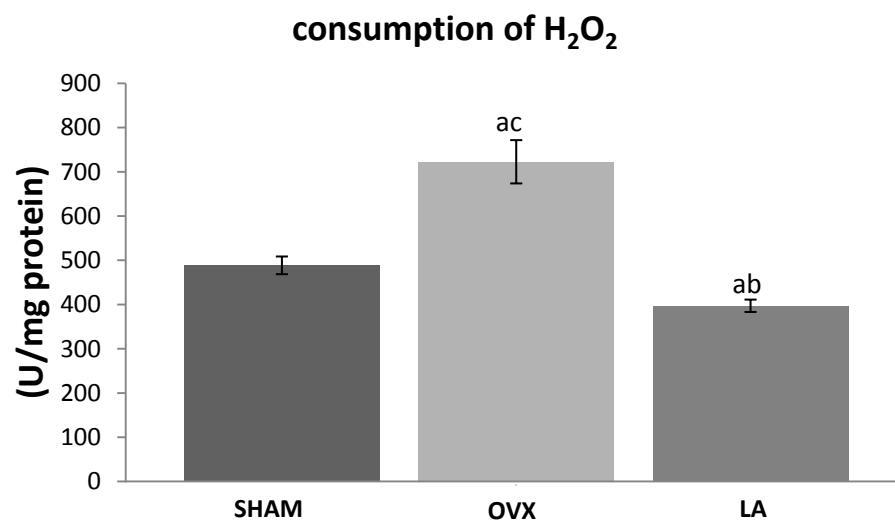
B



C



D



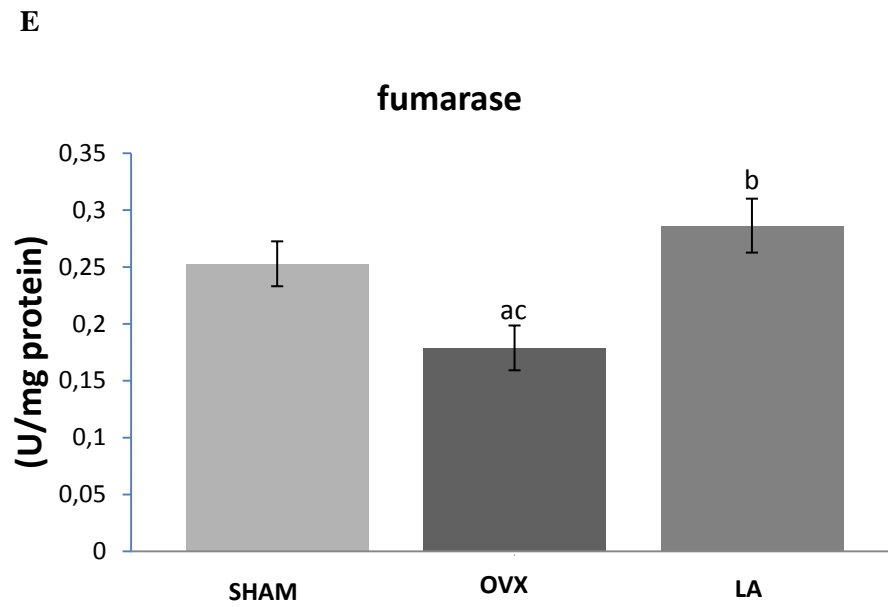


Fig. 4. Enzymatic activity analysis. CuZnSOD enzyme activity in A, MnSOD activity in B, GPx activity in C, Consumption of H_2O_2 in D and fumarase activity in E. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0$. a= is different from SHAM; b= is different from OVX; c= is different from DHA and d= is different from EPA.

5 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Este artigo será submetido a revista Molecular Nutrition & Food Research e está apresentando os mesmos resultados para os grupos SHAM e OVX.

The effects of DHA and EPA on the liver of ovariectomized rats

Ártur K. Schüller¹, Diego A. Mena Canata¹, Vanessa K. Engers¹, Fernanda S. Hackenhaar¹, Fernanda M. Heeman¹, Jordana S. Putti¹, Tiago B. Salomon¹ Mara S. Benfato¹

¹ Department of Biophysics, Program of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Scope: The bilateral ovariectomy in rats is an experimental model to analyze the effects of menopause and possible strategies to mitigate the deleterious effects of this condition. Supplementation of the diet with antioxidants has been used to reduce the potential oxidative stress that menopause may cause.

Methods and Results: In this study, we analyzed the effects of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in the diet of ovariectomized rats. These polyunsaturated fatty acids were chosen because of their antioxidant capacity and possess anti-inflammatory properties. Our results demonstrate that docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid are capable of acting in the liver and are able to recover the activity of antioxidant enzymes such as CuZnSOD, MnSOD and exert protection against oxidative stress, reducing proteins oxidation levels. Lipid protection differ between treatments. The group treated with DHA has increased levels of malondialdehyde (MDA) compared to the group treated with EPA. However, MDA levels of DHA -treated group did not differ from the SHAM group.

Conclusions: Therefore, we showed that the DHA and EPA was effective in modulating the activity of antioxidant enzymes and decreased damage proteins in the liver of ovariectomized rats.

Keywords:

Liver / Omega-3 / Ovariectomy / Oxidative stress / DHA / EPA

1 Introduction

The menopausal model produced by ovariectomy in rats is used to analyze the deleterious effects of this condition and possible strategies to minimize the increased risk factors at this stage of women's lives [1-3]. In the literature, there are studies showing that dietary supplementation with omega-3 exerts a protective effect on a diabetes type 2, obesity, metabolic syndrome, and neurodegenerative diseases [4-6] that are strongly associated with oxidative stress and menopause [7]. For this study, docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), two omega-3 fatty acids found in fish oil, have been chosen. These polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are associated with the resolution of inflammatory processes via production of molecules called protectins— especially in the case of DHA —and resolvins, that help the tissues to return to homeostasis [8-10]. On the menopause and in experimental models of menopause there is an increase in expression of genes involved in inflammation [11]. In this context, the liver can be damaged, since it has many defense cells [12]. These cells could be stimulated by proinflammatory molecules that are present at higher amounts during the menopause and in animal models [13, 14]. The liver is the central distribution organ of nutrients and antioxidant molecules to the body, such as vitamins C and E [15-17], and exerts control of the lipid distribution in the body [18]. So it's very important that the liver stays healthy so it can perform its duties satisfactorily and not accumulate fat. In the literature, there are studies that show the changes in activity of antioxidant enzymes suffered by the liver after ovariectomy and after menopause [19, 20], which can compromise the physiological functions of this organ. These changes are related to the very low estrogen levels during menopause. It is known that estrogen regulates transcription of antioxidant enzymes [21, 22]. Thus, dietary supplementation with antioxidants could help the organism to cope with the loss of estrogen's influence in the oxidative stress defense. In addition to transcriptional control exerted by estrogen upon antioxidant enzymes such as mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) and glutathione peroxidase (GPx) [21-23], the molecules of this class of hormones also have antioxidant properties that protect the body from reactive species of oxygen (ROS) [24, 25]. Therefore, supplementing the diet with polyunsaturated fatty acids (PUFAs) may help the organism to cope with ROS and decrease oxidative damage. In addition, omega-3 is capable of reducing the synthesis of inflammatory cytokines

which are increased with the decrease of estrogen in women and in animal models [26-28]. Thus, supplementation of the diet of ovariectomized rats with omega-3 may be beneficial in against the increased risk of oxidative stress.

2. Material and Methods

2.1 Animals

This study employed 20 three-month-old Wistar female rats (*Rattus norvegicus*). Rats were housed in polypropylene cages with five animals per cage. All animal studies followed the rules from the EU Directive for animal experiments 2010/63/EU and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (DHEW Publication No. (NIH) 85-23, revised in 1996, Office of Science and Health Reports, Division of Research Resources/NIH, Bethesda, MD, USA) and were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle at a temperature of 24 ± 1 °C.

Animals were fed standard lab chow and drinking water *ad libitum*. The rats were divided into four groups of five animals each. Three groups were subjected to bilateral ovariectomy and one group was sham operated, but without removal of the ovaries (SHAM group). Ovariectomy was performed during diestrus (determined by vaginal smear). Animals in SHAM group were assessed and euthanized during diestrus [29]. The surgical procedure was performed under general anesthesia, administered as an i.p. injection of a combination of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg). Immediately after surgery, while still under anesthesia, the rats received a combination of antibiotics and anti-inflammatory drugs (Pencivet PPU Plus, Intervet/Schering-Plough Animal Health, 0.1 ml/100g, i.m.; containing (per 100 ml): procaine benzylpenicillin G, 10.000.000 IU, benzathine benzylpenicillin G, 10.000.000 IU dihydrostreptomycin, 10.5 mg, piroxicam 1.0 mg). After surgery, the animals were maintained under a heat lamp until recovered from anesthesia. Animals received analgesia acetaminophen (Paracetamol, MSD) at a dose of 200 mg/kg, diluted in the drinking water with for 3 days. After the period of study of 16 weeks, the animals were euthanized under general anesthesia by i.p. injection of combination of

xylazine (10 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg) for removal of liver and withdrawal of blood for hormonal analysis.

2.2 Diet

Animals were acclimated to a nutritionally balanced diet comprising 22% proteins, 5% cellulose, 4% fatty acid, 1.4% calcium, 0.8% phosphorus, and 60% starch with added vitamins, minerals, and antioxidants (Nuvilab, Brazil), according to AIN93 [30], for 1 week prior to ovariectomy. All diets had a total of 4% fat and at least 2% grain oils, amounts slightly above the minimum required to prevent a deficiency of long chain omega-6 polyunsaturated fatty acid (1%). One week after surgery, animals were randomly assigned to four groups: one control group was sham-operated (SHAM) and received standard diet, and one ovariectomized group (OVX) received the standard diet; operated animals that received supplementation were divided in 2 groups according to the diet supplement (DHA, EPA). The DHA group received dietary supplementation of docosahexaenoic acid ethyl ester (1 g/kg/day DHA + 0.2 g/kg/day EPA); the EPA group received supplementation with eicosapentaenoic acid ethyl ester (1 g/kg/day EPA + 0.2 g/kg/day DHA). All groups received the diets for a period of 16 weeks. Diets were formulated with fish oil blended daily into the experimental diet to prevent fatty acid oxidation and loss of antioxidants before their use. The SHAM group was fed *ad libitum*. The food intake of the ovariectomized groups was limited to that of the SHAM group to reduce ovariectomy-induced weight gain. All animals had *ad libitum* access to water throughout the study period. Body weights of all animals were measured weekly and food intake was recorded daily.

2.3 Organs

Animals were sacrificed according to the experimental protocol [31]. All animals were anesthetized by i.p. injection with a mixture of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After saline infusion, organs and tissues were removed and frozen in liquid nitrogen immediately for later analysis. Organs were manually macerated. Macerated tissues were mixed in 10 mL with 30 mmol/L phosphate buffer, 120 mmol/L KCl, 0,201 mmol/ L PMSF, pH 7.4, sonicated three times for 10s each, and centrifuged for 10 min, 1700 x g. The supernatant of each tube was transferred to a second tube and centrifuged again for 10 min at 1700 x g. The

supernatant from the second centrifugation was aliquoted and frozen at -80 °C for later analysis and assays.

2.4 Hormonal level measurements

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

2.5 HPLC assays

Levels of vitamin C, a non-enzymatic antioxidant, and malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation, were measured by HPLC employing a reversed-phase column (SUPELCOSIL™ LC-18-DB HPLC column; 15 cm \times 4.6 mm, 5 μ m), using a mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v); samples were injected in a volume of 25 μ L. The absorbance of the column effluent was monitored at 254 nm [32]. Under these conditions, the retention time of vitamin C was 3.0 min and MDA was 5.6 min. The amount of Vitamin E was measured by HPLC using a 15 cm \times 4.6 mm column (Nucleosil 120 C-18) with continuous flow of 2 mL per minute 93.5:3.5 (v/v) methanol: water. Detection was carried out by fluorescence (295 nm excitation and 350 nm emission). The retention time of Vit.E was 5 min. The amount of VitE was expressed as nmol of Vit.E/mg protein calculated from an alpha-tocopherol standard [33].

2.6 Oxidative damage

As an index of protein damage, carbonyl levels were marked with 2, 4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) and measured at 370 nm [34]. Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/mg of protein. Malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation [32]. As an index of indirect nitric oxide levels, a variation of the Griess test was used to determine total nitrate and nitrite levels [35]

2.7 Assays for enzyme activities in liver

Cytosolic Superoxide dismutase (CuZnSOD) and mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) activity was measured using the RanSOD kit (Randox, UK), with absorbance measured at 505 nm. Enzyme activities were analyzed according to the

ideal pH for both. Enzymatic kinetics of GPx was assessed by the Ransel_ Kit (Randox, UK), with absorbance measured at 340 nm. The activities were expressed as U/mg of protein. The consumption of H₂O₂ was evaluated by measuring the rate of H₂O₂ consumption via absorbance at 240 nm [36]. The activity was expressed as units per milligram of protein; 1 U was defined as the capacity to consume 1 µmol of H₂O₂ per minute. We report consumption of H₂O₂ because there are multiple mechanisms of detoxification of H₂O₂ (mainly CAT and peroxiredoxins), and the test is not specific for any of them. Glutathione S-transferase (GST) activity was measured by the GST-catalyzed reaction of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with GSH using absorbance at 340 nm [37]. GST activity is expressed as units per milligram of protein; 1 U is defined as the capacity of the enzyme to produce 1 µmol GS-DNB per minute. The fumarase activity was accessed by the conversion of fumarate to malate and measured at 240 nm [38].

2.8 Data normalization

All results were normalized to protein concentration determined by Bradford method using BSA (bovine serum albumin) as a standard [39]. All assays in this study were independently performed in triplicate.

2.9 Statistical analysis

Data were expressed as mean ± S.D. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Non parametric dates was performed whith independente- sample Kruskal-Wallis test. Statistical analysis was accomplished with the support of the Statistical Nucleus of the Federal University of Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS). A software package was used for all calculations (SPSS version 19.0.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1 Hormone levels

In this study, estrogen levels decrease significantly when comparing the SHAM group to the other ovariectomized groups (Fig. 1). This result proves that the

animals were subjected to an effective menopausal model. When analyzing the data, it is evident that all the ovariectomized animals have estrogen levels lower than the SHAM group.

3.2 Markers of oxidative damage

Oxidative damage in protein, which is caused by oxidation and formation of carbonyl groups in the side chain of the aminoacids is higher in OVX group compared to the other groups. The levels of oxidative damage in the DHA and EPA groups are smaller than the other groups (Fig. 2a). The levels of malondialdehyde (MDA), one of the end products of lipid peroxidation, unexpectedly significantly decreased in OVX group compared to the SHAM and DHA groups (Fig. 2b). However, there is no difference between the OVX and EPA groups.

3.3 Non-enzymatic antioxidant levels

The OVX group presents higher levels of NO compared to SHAM, DHA and EPA groups and there are lower levels of NO in the DHA and EPA groups compared to SHAM and OVX groups (Fig. 3a). On levels of VitE not differ between SHAM and OVX groups. However, the groups supplemented with DHA and EPA have levels lower than SHAM and OVX groups (Fig. 3b). Ovariectomy had no effect on levels of VITC. However, the VITC levels decreased when ovariectomized female rats were supplemented with DHA and EPA. Only supplementation with EPA lowers VITC levels compared to the OVX group (Fig. 3c).

3.4 Activity of enzymes

Ovariectomy decreased the activity of the enzyme CuZnSOD. Supplementation with DHA and EPA made the activity CuZnSOD equaled the SHAM group. There was no difference between the DHA and EPA groups (Fig. 4a). Interestingly, the activity of MnSOD was higher in the DHA and EPA groups when compared to the OVX and SHAM groups. The ovariectomized group showed a significant reduction in the activity of MnSOD in relation with the other groups (Fig. 4b). The SHAM group had higher activity of GPx enzyme in relation to other groups. Ovariectomized groups did not differ among themselves (Fig. 4c). The activity of glutathione S- transferase was lower in the SHAM group compared to other groups. There was no difference between the OVX group compared to the other

ovariectomized groups. But GST activity was higher in the DHA group compared to the EPA group (Fig 4d). The ovariectomy increased the activity of enzymes that break down hydrogen peroxide. When ovariectomized females were supplemented with DHA, the activity of these enzymes are below the activity observed in the OVX and SHAM groups. Supplementation with EPA decreased the activity of these enzymes consumers peroxide in terms of SHAM group. (Fig 4e). Ovariectomy decreased the activity of the enzyme fumarase. Supplementation with DHA did the activity of fumarase be higher than in the group supplemented with EPA. However, it was not higher than the OVX group (fig. 4f).

4 Discussion

In this study, the groups supplemented with DHA and EPA did not receive these PUFAs pure. The DHA group receive 83.3% of DHA and 16.67% EPA and the EPA group receive supplementation with 83.3% of EPA and DHA of 16.67%. Therefore, although we are addressing groups with a single classification, both supplementations are a mixture of the two types of omega-3. Supplementation with DHA and EPA is widely used to try to mitigate the damaging effects of ROS [40] and has therapeutic potential for many diseases related to inflammation Arachidonic acid (AA), an omega -6 present in cellular and mitochondrial membranes, is a substrate for the formation of prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes, which have the ability to maintain inflammatory processes [41]. The supplementation of DHA and EPA increases the levels of these lipids in membranes and reduces AA levels, decreasing pro-inflammatory effects [42]. In addition, kidneys of animals supplemented with AA showed a decrease in the levels of DHA and EPA in cell membranes, which demonstrates competition between these molecules in the lipid fraction of cell membranes [43]. Both DHA and EPA have the ability to insert in lipid bilayers and maintain the structure and function of cell membranes [44], which maintains the integrity of the membranes. It should be noted that in menopause and in experimental models of menopause, there are increased levels of proinflammatory cytokines [45, 46] and the index of diseases related to inflammation are increased in postmenopausal period [46]. Contrary to expectations, the OVX group had lower levels of MDA compared to SHAM and DHA groups, possibly because of high levels of NO. NO can act in defense of lipid peroxidation by reacting with peroxy radical

[47, 48]. However, supplementation with DHA did not act in the reduction of the MDA levels although it reduced the levels of protein oxidation. However, both EPA and DHA have the ability to inhibit nitric oxide synthase (iNOS) [49, 50]. Regarding supplementation with EPA, which showed low levels of MDA and NO, the mechanism which avoided the increase of the MDA formation is due to the fact that both EPA and DHA, have the ability to penetrate the cell membranes and change the lipid profile of those membranes [51]. Thus, supplementation of EPA did not change the MDA levels, compared to the OVX group, even with low levels of NO. One hypothesis to explain this fact is that supplementation with EPA can cause decreased β -oxidation and triglyceride accumulation in the liver [52]. In addition, EPA competes with AA in the synthesis of prostaglandins by the cyclooxygenase enzymes. The cells synthesize prostaglandins in response to pro-inflammatory cytokines and are not able to store prostaglandins [53]. Thus, EPA would act in reducing the prostaglandin levels in the supplemented group. This situation, along with the antioxidant capacity of EPA, reduces the formation of MDA and at the same time, protects the protein against oxidative damage. However, MDA levels were increased in the DHA supplemented group compared to the OVX group, even with the DHA being an antioxidant molecule with antiinflammatory properties. However, although the levels increased compared to the OVX group, MDA levels were not higher than the levels of SHAM group. In the literature, DHA help protect against oxidative damage, but the DHA protective effects are more evident in the brain, since this organ has low DHA synthesis capacity and high holding capacity of this PUFA, leaving to the liver function supri- of it with DHA It should be noted that DHA can reduce the expression of miRNAs miRNA33a and miRNA122 in rat liver [54]. These miRNAs are very important in the regulation of lipid metabolism in the liver because they act in the reduction of β -oxidation. The use of antagonists of these miRNAs decreases the synthesis of lipids and increases β -oxidation [55]. Thus, the DHA would be able to liver protect proteins from oxidative damage, but, although it has the ability to protect lipids from lipid peroxidation, also acts positively on β -oxidation and this could increase the Acetyl-CoA levels and increased lipid peroxidation by increasing the production of reactive oxygen species in mitochondria. It is important to note that the activity of fumarase is increased in the DHA supplemented group compared to the EPA group. This result suggests greater mitochondrial activity in the DHA supplemented group. But the increase in MDA levels found in the DHA group is

similar to the levels of SHAM group. Therefore, this increase could be considered within normal levels of MDA, since the metabolism of SHAM group was within the normal levels. Importantly, the VitE levels did not differ between the DHA and EPA supplemented groups. The VitE has a phenolic ring that acts in neutralizing reactive oxygen species. In addition to the phenolic ring there is also a twelve carbons structure that enables interaction with VitE nonpolar molecules. These molecular characteristics make the Vit E an excellent antioxidant molecule to the lipid fractions of the cell. But the difference between MDA levels shown between these two groups can be related only to the diet with their respective supplements. In the case of OVX group, levels of VitE were similar to the levels of the SHAM group and the OVX group MDA levels are lower than the levels of SHAM group. In the case of VitE, the SHAM and OVX groups did not differ among themselves. However, the supplementation with PUFAs led to little VitE be absorbed and / or returned to the liver. This occurred due to the supplementation with DHA and EPA have been made in animal feed and this can have significantly impaired the absorption of this lipophilic vitamin or their return to the liver, since the long chain PUFA difficult the absorption of VitE by the chylomicrons in the lymph vessels [56]. Another possible hypothesis, which occurs both in animals and in humans, says that an increase in the intake of unsaturated fats, particularly long chain PUFA, increases the need for vitamin E consumption due to the fact that the PUFA are found preferably in cell membranes, where they have an ability to sequester vitamin E to keep their oxidative stability [57] and this could reduce VitE levels in the liver. Therefore, supplementation with omega-3 could be indicated if administered at different times from the meals. The results of VITC levels, showed no need for synthesis of this antioxidant in the supplemented animals. .

Regarding the enzymatic antioxidant defenses, it is known that the activities and the expression of CuZnSOD and MnSOD enzymes are influenced by estrogen [58]. Our results show that the activity of CuZnSOD is reduced in OVX group. However, the groups supplemented with DHA and EPA have activity similar to the SHAM group. In literature, there are studies showing that estrogen increases the expression of the enzymes MnSOD and CuZnSOD [23, 59]. Studies also show that supplementation with omega-3 enhances the activity of MnSOD and CuZnSOD in the brain of male rats [60], , in the heart of male rats in hypoxia model [61] and liver [62], also in male rats. These studies conducted in males show that PUFA are able to

increase the activity of MnSOD and CuZnSOD without the influence of high levels of estrogen that occurs in females under normal physiological conditions. So what can explain the higher activity of MnSOD and CuZnSOD in the DHA and EPA groups would be their direct or indirect influence on the activity of the enzymes, which needs to be further studied, since estrogen does not seem to be acting so evident in the activity of the MnSOD and CuZnSOD of male rats. But the SHAM group has high activity due to the presence of physiological levels of estrogen that the rats have before ovariectomy. Just as MnSOD and CuZnSOD enzymes, GPx (especially Gpx1, which is the most abundant and is located in the cytosol and mitochondrial matrix) also responds to circulating estrogen levels in the organism [63]. Our results for the GPx activity agree with literature, with lower activity levels in all ovariectomized groups compared to SHAM group. Another measure of antioxidant defense of the study was accessed by the consumption capacity of hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide decomposition assay was carried out in cell extract and covers the activity of GPx, catalase and peroxiredoxins enzymes simultaneously. Levels of hydrogen peroxide decomposition activity were higher in the OVX group than in the other groups. This result may indicate that supplementation with antioxidants may have acted protectively in the supplemented groups and that the increase in the peroxiredoxin synthesis was not required in these groups and in the SHAM group. The activity of peroxiredoxins may be lower in the SHAM group because of physiological levels of estrogen present in this group. Therefore, hydrogen peroxide could be being controlled by other defense mechanisms. The activity of peroxiredoxins may be lower in the SHAM group because of physiological levels of estrogen present in this group. Therefore, hydrogen peroxide could be being controlled by other defense mechanisms. However, in the OVX group, the peroxiredoxins synthesis may have been stimulated to compensate for the lack of protection exerted by antioxidants in the supplemented groups and by estrogen in the SHAM group. What could explain the high activity of peroxiredoxins in OVX group would be synergistic behavior among peroxiredoxins, catalase and GPx. The reduction of catalase and GPX activities causes the increase of peroxiredoxins activity [64]. As Gpx is influenced by estrogen, and showed less activity in OVX group, the synergistic mechanism would lead to increased peroxiredoxins activity. Another enzyme that was analyzed and showed uniformity in their activity profile was the glutathione S-transferase (GST). Ovariectomized groups did not differ among

themselves and had GST activity increased compared to the SHAM group. This result can be explained by the fact that the GST expression is not related to estrogen levels [65]. The high GIST activity in the liver of ovariectomized rats may be related to the detoxification mechanisms of the organ, since the liver handles numerous problems associated with menopause and ovariectomy [66, 67]. The antioxidant supplementation showed a beneficial effect on the oxidative stress markers. Furthermore, it was able to influence the activity of antioxidant enzymes and although may have interfered with the absorption VitE in DHA and EPA group, the results are promising, since supplementation with omega-3 could be indicated if administered in non-coincident times to meals. While MDA levels of the DHA group were higher than those of OVX and EPA groups, their levels were equal to the SHAM group. This result indicates that MDA levels are within physiological levels and may not represent problems. In summary, the Omega-3 supplementation was beneficial for the liver of ovariectomized rats. Saved appropriate precautions, the results suggest a promising role in dietary supplementation with omega-3 in menopausal women.

REFERENCES

- [1] Tawfik SH, Mahmoud BF, Saad MI, Shehata M, Kamel MA, Helmy MH (2015) Similar and Additive Effects of Ovariectomy and Diabetes on Insulin Resistance and Lipid Metabolism. *Biochemistry Research International*
- [2] Siebert C, Kolling J, Scherer EBS, et al. (2014) Effect of physical exercise on changes in activities of creatine kinase, cytochrome c oxidase and ATP levels caused by ovariectomy. *Metabolic Brain Disease* 29: 825-835
- [3] Munoz-Castaneda JR, Muntane J, Herencia C, et al. (2006) Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. *Gynecological Endocrinology* 22: 74-79
- [4] Hansson P, Barregard L, Halltorp M, et al. (2015) Habitual high intake of fatty fish is related to lower levels of F-2-isoprostane in healthy women. *Nutrition* 31: 847-852
- [5] Chen C, Yu X, Shao S (2015) Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Glucose Control and Lipid Levels in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Plos One*

- [6] Dyall SC (2015) Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience* 7
- [7] McCarrey AC, Resnick SM (2015) Postmenopausal hormone therapy and cognition. *Hormones and Behavior* 74: 167-172
- [8] Levy BD, Serhan CN (2014) Resolution of Acute Inflammation in the Lung. *Annual Review of Physiology*, Vol 76 76: 467-492
- [9] Hong S, Lu Y (2013) Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. *Frontiers in Immunology* 4
- [10] Serhan CN, Chiang N (2008) Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British Journal of Pharmacology* 153: S200-S215
- [11] Pechenino AS, Lin L, Mbai FN, et al. (2011) Impact of aging vs. estrogen loss on cardiac gene expression: estrogen replacement and inflammation. *Physiological Genomics* 43: 1065-1073
- [12] Kireev RA, Tresguerres ACF, Garcia C, et al. (2010) Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. *Biogerontology* 11: 229-243
- [13] Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, et al. (2014) Changes in central and peripheral inflammatory responses to lipopolysaccharide in ovariectomized female rats. *Cytokine* 65: 65-73
- [14] Luo F, Ishigami M, Achiwa K, et al. (2015) Raloxifene Ameliorates Liver Fibrosis of Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by Choline-Deficient High-Fat Diet in Ovariectomized Mice. *Digestive Diseases and Sciences* 60: 2730-2739
- [15] Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, et al. (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* 399: 70-75
- [16] Abe C, Ikeda S, Uchida T, Yamashita K, Ichikawa T (2007) Triton WR1339, an inhibitor of lipoprotein lipase, decreases vitamin e concentration in some tissues of rats by inhibiting its transport to liver. *Journal of Nutrition* 137: 345-350
- [17] Takada T, Suzuki H (2010) Molecular mechanisms of membrane transport of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research* 54: 616-622
- [18] Wang Y, Viscarra J, Kim S-J, Sul HS (2015) Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16: 678-689

- [19] Kankofer M, Radzki RP, Bienko M, Albera E (2007) Anti-oxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 54: 225-229
- [20] Zhou X, Smith AM, Failla ML, Hill KE, Yu Z (2012) Estrogen status alters tissue distribution and metabolism of selenium in female rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23: 532-538
- [21] Zhang L, Fujii S, Kosaka H (2007) Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. *Journal of Hypertension* 25: 407-414
- [22] Baek I-J, Jung KY, Yon J-M, et al. (2011) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene is regulated via an estrogen and estrogen receptor signaling in cultured mouse fetuses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 47: 535-540
- [23] Liu Z, Gou Y, Zhang H, et al. (2014) Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall. *Redox Biology* 3: 88-99
- [24] Shimizu I, Ito S (2007) Protection of estrogens against the progression of chronic liver disease. *Hepatology Research* 37: 239-247
- [25] Prokai L, Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Simpkins JW (2005) Mechanistic insights into the direct antioxidant effects of estrogens. *Drug Development Research* 66: 118-125
- [26] Daak AA, Elderderly AY, Elbashir LM, et al. (2015) Omega 3 (n-3) fatty acids down-regulate nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) gene and blood cell adhesion molecule expression in patients with homozygous sickle cell disease. *Blood Cells Molecules and Diseases* 55: 48-55
- [27] Calder PC (2015) Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851: 469-484
- [28] Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H (2002) Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine Reviews* 23: 90-119
- [29] Spradley JM, Freeman ME, Wilson JL, Davis AJ (2008) The influence of a twice-a-day feeding regimen after photostimulation on the reproductive performance of broiler breeder hens. *Poultry Science* 87: 561-568

- [30] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents - Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 123: 1939-1951
- [31] Hackenhaar FS, Salomon TB, Gil Alabarse PV, Ehrenbrink G, Benfato MS (2009) Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochemistry and Function* 27: 378-382
- [32] Karatepe M (2004) Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America*: 104-106
- [33] Barbas C, Castro M, Bonet B, Viana M, Herrera E (1997) Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 778: 415-420
- [34] Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186: 464-478
- [35] Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR (1996) Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of NO; NO Synthase* 268: 237-246
- [36] Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126
- [37] Gutteridge S, Tsuchida NTMC (2000) *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. In: Oxford (ed), Oxford University Press, pp 83-85
- [38] Mescam M, Vinnakota KC, Beard DA (2011) Identification of the Catalytic Mechanism and Estimation of Kinetic Parameters for Fumarase. *Journal of Biological Chemistry* 286: 21100-21109
- [39] Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- [40] Liu M, Boussetta T, Makni-Maalej K, et al. (2014) Protectin DX, a Double Lipoxygenase Product of DHA, Inhibits Both ROS Production in Human Neutrophils and Cyclooxygenase Activities. *Lipids* 49: 49-57
- [41] Shoeb M, Yadav UCS, Srivastava SK, Ramana KV (2011) Inhibition of aldose reductase prevents endotoxin-induced inflammation by regulating the arachidonic acid pathway in murine macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 51: 1686-1696

- [42] Gdula-Argasinska J, Czepiel J, Wozniakiewicz A, et al. (2015) n-3 Fatty acids as resolvents of inflammation in the A549 cells. *Pharmacological Reports* 67: 610-615
- [43] Katakura M, Hashimoto M, Inoue T, et al. (2015) Chronic Arachidonic Acid Administration Decreases Docosahexaenoic Acid- and Eicosapentaenoic Acid-Derived Metabolites in Kidneys of Aged Rats. *Plos One* 10
- [44] Al-Gubory KH (2012) Mitochondria: Omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1569-1573
- [45] Weitzmann MN, Pacifici R (2006) Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *Journal of Clinical Investigation* 116: 1186-1194
- [46] Monteiro R, Teixeira D, Calhau C (2014) Estrogen Signaling in Metabolic Inflammation. *Mediators of Inflammation*
- [47] Odonnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, DarleyUsmar VM, Freeman BA (1997) Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: Kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* 36: 15216-15223
- [48] Patel RP, Levonen AL, Crawford JH, Darley-Usmar VM (2000) Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 47: 465-474
- [49] Kielar M, Penfield J, Sicher S, Che L, Lu C (1997) Docosahexaenoic acid (DHA) inhibits transcription of the gene for inducible nitric oxide synthase (iNOS) BY preventing activation of NF-kB and IRF-1 response elements of the promotor. *Journal of the American Society of Nephrology* 8: A2125-A2125
- [50] Theuer J, Shagdarsuren E, Muller DN, et al. (2005) Inducible NOS inhibition, eicosapentaenoic acid supplementation, and angiotensin II-induced renal damage. *Kidney International* 67: 248-258
- [51] van Rensburg SJ, Smuts CM, Hon D, et al. (2009) Changes in erythrocyte membrane fatty acids during a clinical trial of eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in schizophrenia. *Metabolic Brain Disease* 24: 659-672
- [52] Du Z-Y, Ma T, Liaset B, et al. (2013) Dietary eicosapentaenoic acid supplementation accentuates hepatic triglyceride accumulation in mice with impaired fatty acid oxidation capacity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831: 291-299

- [53] Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875
- [54] Baselga-Escudero L, Arola-Arnal A, Pascual-Serrano A, et al. (2013) Chronic Administration of Proanthocyanidins or Docosahexaenoic Acid Reverses the Increase of miR-33a and miR-122 in Dyslipidemic Obese Rats. *Plos One* 8
- [55] Rottiers V, Naar AM (2012) MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders (vol 13, pg 239, 2012). *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13: 281-281
- [56] Koo SI, Noh SK (2001) Phosphatidylcholine inhibits and lysophosphatidylcholine enhances the lymphatic absorption of alpha-tocopherol in adult rats. *Journal of Nutrition* 131: 717-722
- [57] Bjorneboe A, Bjorneboe GEA, Drevon CA (1990) Absorption, transport and distribution of vitamin-E. *Journal of Nutrition* 120: 233-242
- [58] Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Duce JA, Finkelstein DI (2007) 17 beta-Estradiol reduces nitrotyrosine immunoreactivity and increases SOD1 and SOD2 immunoreactivity in nigral neurons in male mice following MPTP insult. *Brain Research* 1164: 24-31
- [59] Rao AK, Dietrich AK, Ziegler YS, Nardulli AM (2011) 17 beta-Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: A mechanism to protect neurons from ischemia. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127: 382-389
- [60] Abdel-Wahab BA, Shaikh IA, Khateeb MM, Habeeb SM (2015) Omega 3 polyunsaturated fatty acids enhance the protective effect of levetiracetam against seizures, cognitive impairment and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 135: 105-113
- [61] Herrera EA, Farias JG, Gonzalez-Candia A, Short SE, Carrasco-Pozo C, Castillo RL (2015) omega 3 Supplementation and Intermittent Hypobaric Hypoxia Induce Cardioprotection Enhancing Antioxidant Mechanisms in Adult Rats. *Marine Drugs* 13: 838-860
- [62] Garrel C, Alessandri J-M, Guesnet P, Al-Gubory KH (2012) Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 123-131
- [63] Priyanka HP, Krishnan HC, Singh RV, Hima L, ThyagaRajan S (2013) Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-

dependent manner: Effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. *Molecular Immunology* 56: 328-339

[64] Molavian H, Tonekaboni AM, Kohandel M, Sivaloganathan S (2015) The Synergetic Coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and its Effect on the Concentration of H₂O₂. *Scientific Reports* 5

[65] Bellanti F, Matteo M, Rollo T, et al. (2013) Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. *Redox Biology* 1: 340-346

[66] Brady CW (2015) Liver disease in menopause. *World Journal of Gastroenterology* 21: 7613-7620

[67] Ryu S, Suh B-S, Chang Y, et al. (2015) Menopausal stages and non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 190: 65-70

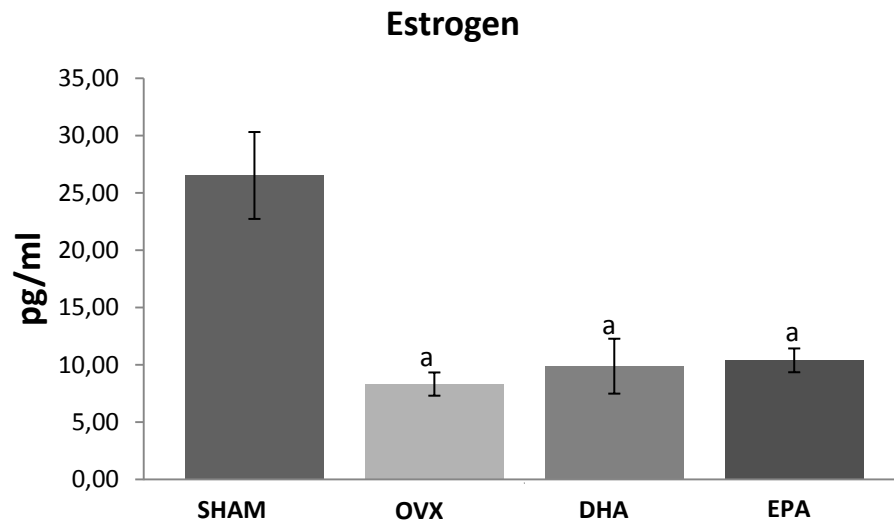
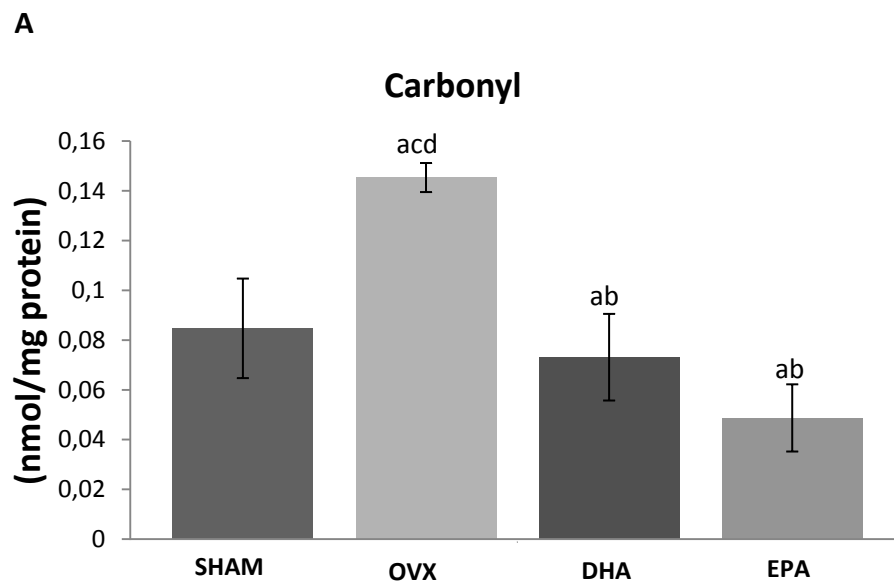


Fig.1. Comparison of estrogen levels among groups. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. a= is different from SHAM.



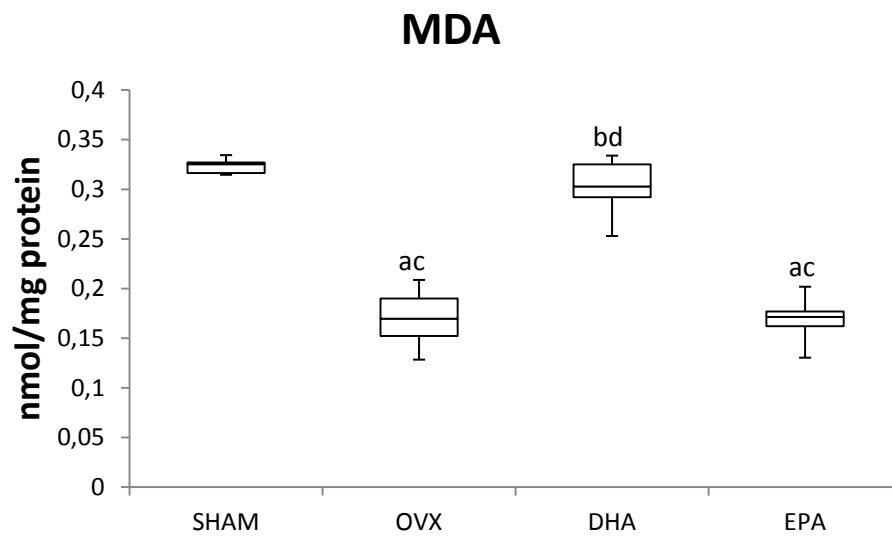
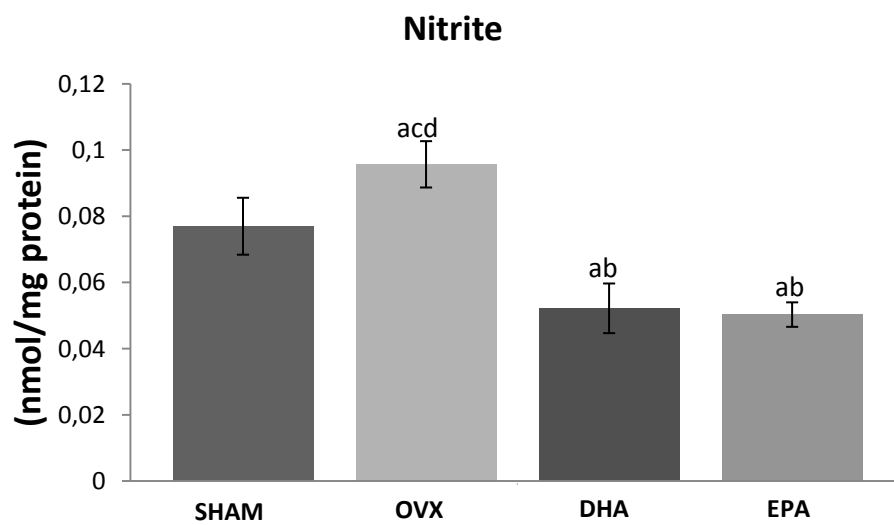
B

Fig. 2. Markers of oxidative damage. Oxidative damage levels in Proteins in A. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Oxidative damage levels in lipids in B. The results were analyzed using Kruskal–Wallis followed by Dunn test in order to determine statistical significance among the different groups. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. a= is different from SHAM; b= is different from OVX; c= is different from DHA and d= is different from EPA.

A

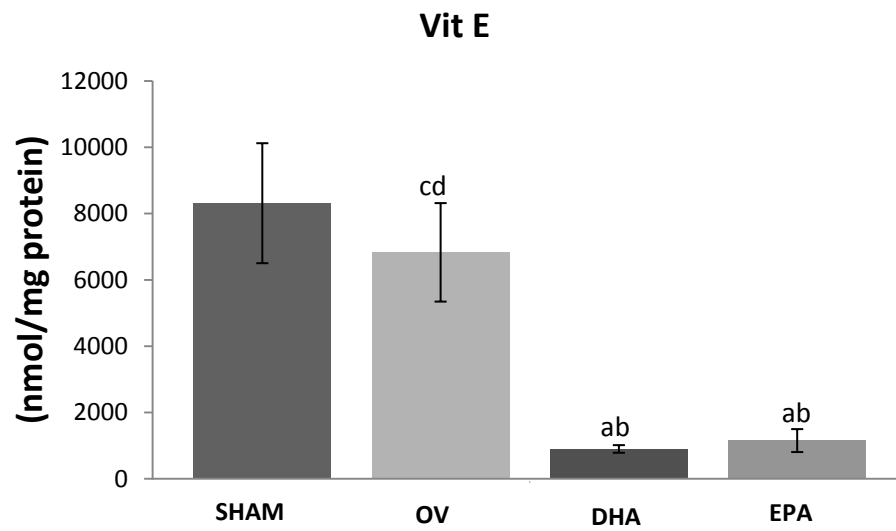
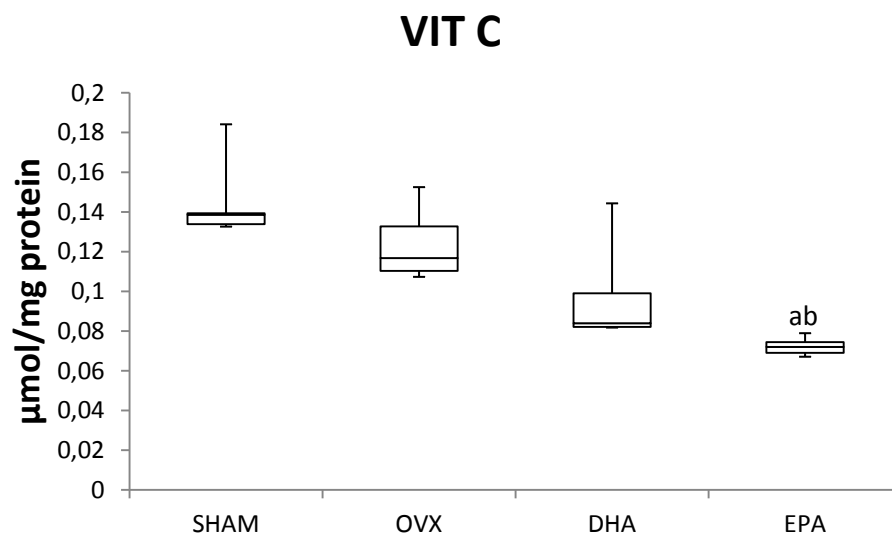
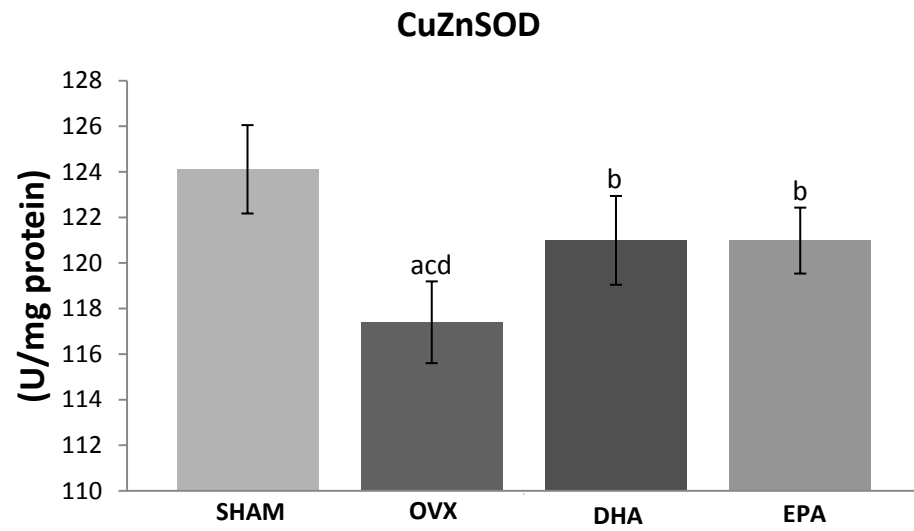
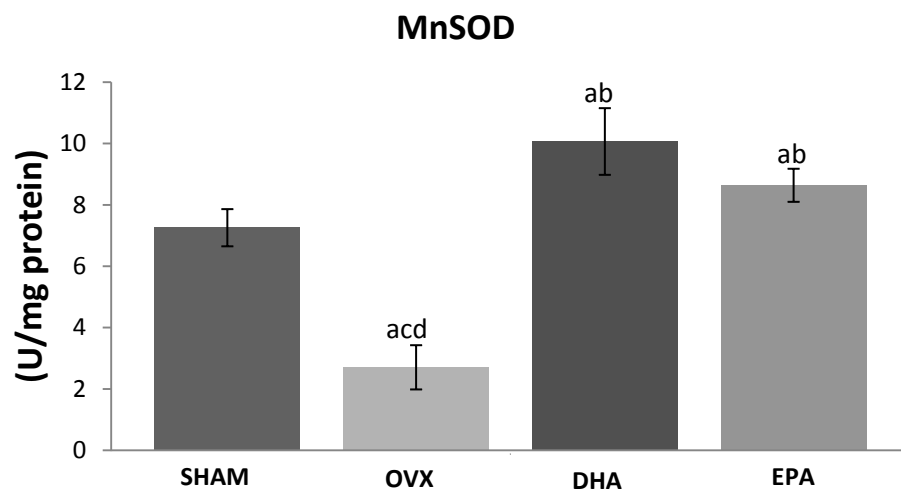
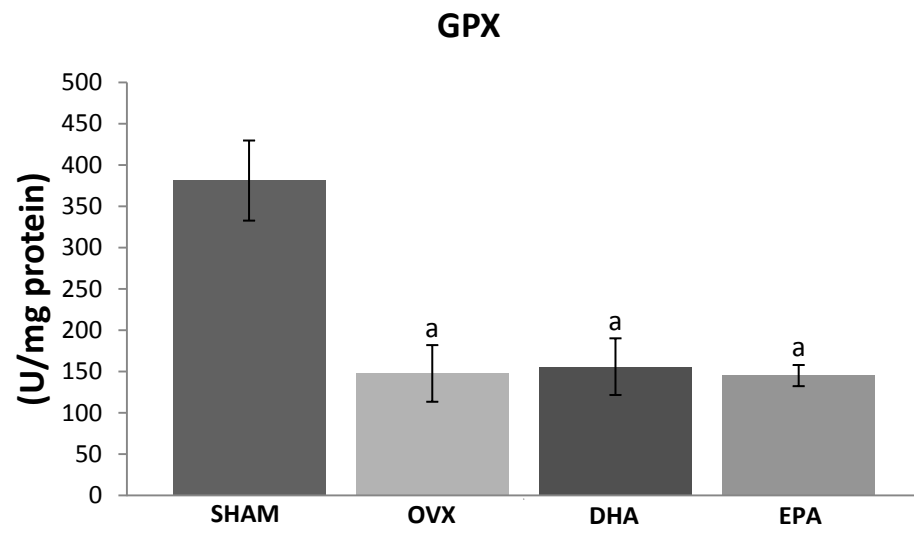
B**C**

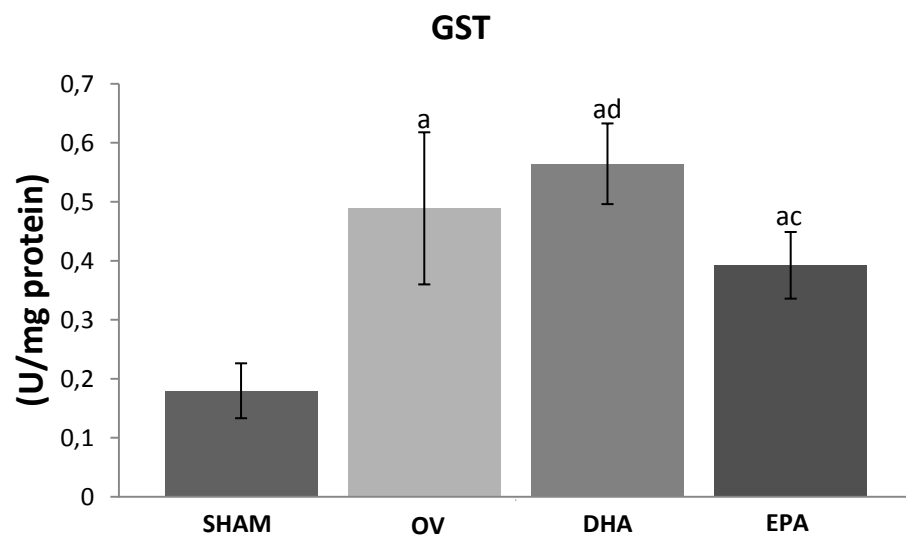
Fig. 3. Non-enzymatic antioxidants. Nitrite levels in A and Vit E levels in B. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Vit C levels in C. The results were analyzed using Kruskal–Wallis followed by Dunn test in order to determine statistical significance among the different groups. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. a= is different from SHAM; b= is different from OVX; c= is different from DHA and d= is different from EPA

A**B**

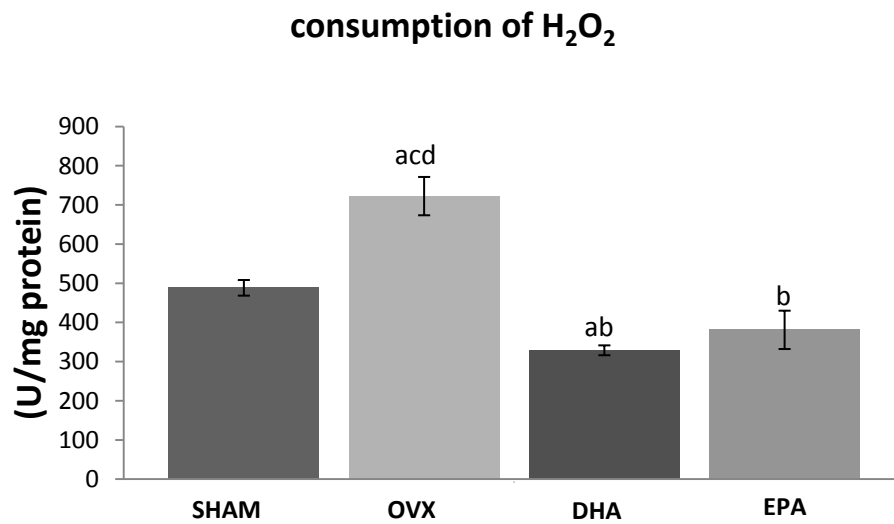
C



D



E



F

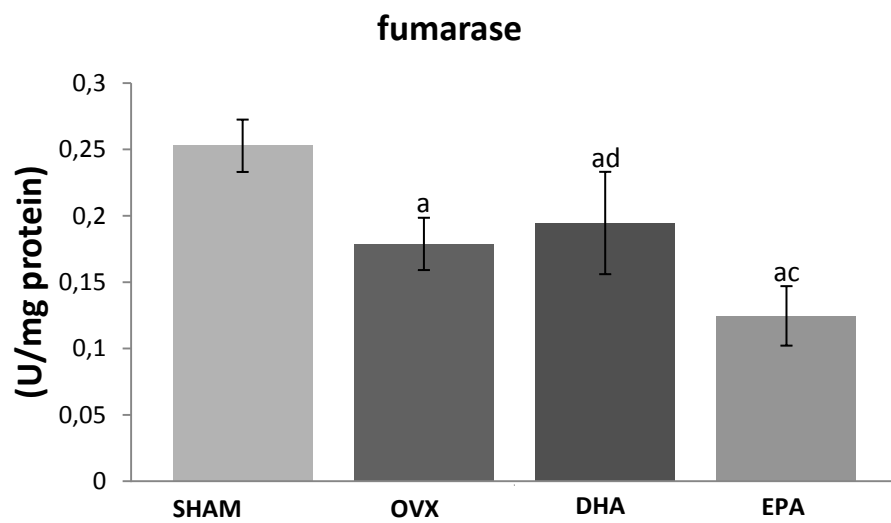


Fig. 4. Enzymatic activity analysis. CuZnSOD enzyme activity in A, MnSOD activity in B, GPx activity in C, GST activity in D, Consumption of H₂O₂ in E and fumarase activity in F. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using post hoc Tukey test. Differences were considered significant at $p \leq 0$. a= is different from SHAM; b= is different from OVX; c= is different from DHA and d= is different from EPA.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a suplementação da dieta com antioxidantes exerceu efeitos benéficos no modelo experimental de menopausa adotado pelo nosso grupo. Os níveis de dano oxidativo em proteínas se mostraram reduzidos nos animais suplementados com AL, DHA e EPA. Porém, o resultado mais surpreendente foi o fato do grupo OVX apresentar níveis de MDA inferiores aos grupos SHAM, AL e DHA, já que na ovariectomia há o aumento do risco para que ocorra estresse oxidativo. Não houve diferença nos níveis de MDA nos grupos SHAM, AL e DHA. Esse resultado indica que os níveis de MDA apresentados por esses três grupos poderiam estar dentro dos níveis fisiológicos deste marcador de dano oxidativo em lipídios, já que os níveis de MDA nos grupos AL e DHA se assemelham ao grupo SHAM que possui níveis normais de estrogênio. Na literatura, há estudos que demonstram maiores níveis de MDA em ratas ovariectomizadas, cadelas castradas e em mulheres na menopausa (Moreira *et al.* 2011; Vukovic *et al.* 2014; Szczubial *et al.* 2015). Mas, esses trabalhos, dentre outros, utilizam a técnica de TBARS para aferir os níveis de MDA sem a utilização de HPLC. Na literatura, também há trabalhos que utilizam TBARS e mostram que não há diferença nos níveis de MDA entre ratas ovariectomizadas e o grupo SHAM (Cury Rodrigues *et al.* 2013). Levando esses dados divergentes em conta, e considerando que neste trabalho a medida dos níveis de MDA foi aferida através da técnica de HPLC e que essa técnica é extremamente robusta e sensível para se analisar os níveis de MDA, entendemos que o que está sendo medido realmente seja MDA.

A explicação que melhor se encaixa no entendimento dos níveis de MDA inferiores apresentados pelo grupo OVX em relação aos grupos SHAM, AL e DHA pode ser devido aos altos níveis de NO apresentados pelo grupo OVX em relação aos demais grupos do estudo. O radical NO é uma molécula apolar que flui entre as frações lipídicas celulares e possui a capacidade de reagir rapidamente com o radical peróxil (LOO^{\bullet}) que após ser formado em uma reação de oxidação de uma molécula de AGPI, ataca um carbono adjacente e é responsável por dar sequência na reação em cadeia da peroxidação lipídica, que tem como um dos produtos finais o MDA. Vale lembrar, que a VitE é uma excelente molécula inibidora da peroxidação lipídica e que o NO possui energia cinética de reação com o LOO^{\bullet} dez mil vezes

maior do que a velocidade de reação da VitE com o LOO^{*} (Odonnell *et al.* 1997; Patel *et al.* 2000). Portanto, embora o NO não possua a capacidade de inibir o início da peroxidação lipídica como a VitE, ele tem a capacidade de interagir com o LOO^{*} durante a propagação do dano, impedindo que este culmine na formação do MDA. Toda via, a enzima ONe está inibida na menopausa e em modelos de ovariectomia por ter a sua transcrição influenciada pelo estrogênio (El-Mas *et al.* 2011). O estrogênio regula a transcrição do gene que codifica a ONe por estimular fatores de transcrição que respondem a estrogênio (Min 2007). Além disso, em mulheres grávidas, a síntese de ONe aumenta ao longo da gestação em virtude da interação do estrogênio com os seus receptores (RE- α e RE- β) que sinalizam para que a transcrição da ONe ocorra (Kakui *et al.* 2004). Sendo assim, levando em conta que ONe está inibida por conta da ovariectomia, e que o fígado é um órgão que possui muitas células de defesa do organismo contra patógenos externos, somente a ONi poderia estar atuando no fígado das ratas ovariectomizadas. Na literatura, há trabalhos que mostram o aumento de citocinas inflamatórias após a menopausa e após a ovariectomia (Bupp 2015; Shivers *et al.* 2015). Há trabalhos demonstrando que a reposição hormonal e a suplementação com fitoestrógenos, ômega 3 e AL, reduzem os níveis de citocinas inflamatórias que estão aumentadas na menopausa e na ovariectomia, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e, também o NO, o que demonstra redução no processo inflamatório e regulação da atividade da ONi (Kielar *et al.* 1997; Fan *et al.* 2009; Koriyama *et al.* 2013; Li *et al.* 2015). Todos os trabalhos recém citados utilizaram AL, ômega-3 e estrogênio para diminuir a transcrição da ONi, já que ela não é constitutiva e depende de sinalização inflamatória para ser transcrita. No entanto, apesar do controle negativo da transcrição da ONi ser benéfico em muitos casos, na geração de MDA pode ser o oposto. No nosso estudo, o fato dessa enzima estar (provavelmente) ativa no grupo OVX, fez com que os níveis de MDA fossem menores em virtude do aumento dos níveis de NO. Mas, essa situação pode ser danosa se analisarmos outros tipos de danos moleculares que não foram avaliados nesse trabalho. Como as atividades da MnSOD e CuSOD estão significativamente reduzidas no grupo OVX, a produção do peroxinitrito poderia estar ocorrendo de maneira perigosa para as biomoléculas desse grupo em virtude da falta de controle do radical superóxido. Já em relação à suplementação com EPA, que apresentou baixos níveis de MDA e de NO, um dos mecanismos que evitou a formação do MDA é o fato do EPA, assim como o DHA, ter a capacidade de

se infiltrar nas membranas celulares e alterar o perfil lipídico das mesmas (van Rensburg *et al.* 2009).

No entanto, somente a infiltração nas membranas não basta, pois como demonstrado, neste estudo os níveis de MDA aumentaram no grupo suplementado com DHA, evidenciando que outros fatores podem influenciar o aumento ou a redução do MDA. Porém, para evitar a peroxidação lipídica, é necessário que ocorra essa infiltração. Sendo assim, a suplementação de EPA não modificou os níveis de MDA, em relação ao grupo OVX, mesmo com níveis de NO baixos. Uma hipótese para explicar esse fato, é que a suplementação com EPA pode causar diminuição da β -oxidação e acúmulo de triglicerídios no fígado (Du *et al.* 2013). Além disso, EPA compete com AA na síntese de prostaglandinas pelas enzimas cicloxigenases. As células sintetizam prostaglandinas em resposta a citocinas pró-inflamatórias e não são capazes de armazená-las (Funk 2001). Desta forma, o EPA atuaria na redução dos níveis de prostaglandinas no grupo suplementado. Essa situação, juntamente com a capacidade antioxidante do EPA, reduziria a formação de MDA e ao mesmo tempo, protege as proteínas do dano oxidativo que poderia ser gerado pela inflamação. Mas, ao contrário do que houve no grupo suplementado com EPA, os níveis de MDA subiram em relação ao grupo OVX no grupo suplementado com DHA, mesmo com o DHA possuindo propriedades antiinflamatórias e sendo uma molécula antioxidante. Todavia, embora os níveis de MDA tenham aumentado em relação ao grupo OVX, os níveis de MDA não foram maiores do que os níveis do grupo SHAM. Na literatura, o DHA auxilia na proteção contra dano oxidativo, mas, os efeitos protetores do DHA são mais evidentes no cérebro, já que este órgão possui baixa capacidade de síntese de DHA e alta capacidade de retenção deste AGPI, ficando para o fígado a função de supri-lo com DHA (Kim 2007; Little *et al.* 2007).

Embora o DHA exerça um papel importante no cérebro, também exerceu proteção nas proteínas do fígado, reduzindo os níveis de carbonilação. Como dito anteriormente, os níveis de MDA aumentaram em relação aos níveis do grupo OVX. É importante destacar que o DHA é capaz de diminuir a expressão dos miRNAs miRNA33a e miRNA122 no fígado de ratos (Baselga-Escudero *et al.* 2013). Esses miRNAs são muito importantes na regulação do metabolismo lipídico no fígado. A utilização de antagonistas destes miRNAs diminui a síntese de lipídios e aumenta a β -oxidação (Rottiers and Naar 2012). Sendo assim, o DHA seria capaz de proteger

as proteínas do fígado do dano oxidativo, mas, embora possua a capacidade de proteger os lipídios da peroxidação lipídica, também atua de maneira positiva na β -oxidação e isso poderia aumentar os níveis de Acetil-CoA e aumentar a peroxidação lipídica por elevar a produção de espécies reativas na mitocôndria. Mas, o aumento dos níveis de MDA encontrado no grupo DHA se assemelha aos níveis do grupo SHAM. Sendo assim, esse aumento, poderia ser considerado dentro dos níveis normais de MDA, já que o metabolismo do grupo SHAM estaria dentro dos níveis normais. Vale destacar, que a atividade da enzima fumarase está maior no grupo suplementado com DHA em relação ao grupo suplementado com EPA. Esse resultado pode indicar maior atividade mitocondrial no grupo DHA em relação ao grupo EPA. Levando em consideração esses dados e a literatura referente a suplementação com DHA, pode-se supor que a suplementação com DHA poderia auxiliar no controle do acúmulo de lipídios nas vísceras.

No entanto, essa explicação não leva em conta o comportamento das defesas antioxidantes. A suplementação com antioxidantes não exerceu efeito protetor somente pela ação intrínseca das moléculas suplementadas. Na literatura, há fortes evidências de que as moléculas escolhidas para a suplementação das ratas deste trabalho exercem influência sobre a atividade, transcrição e tradução de enzimas antioxidantes.

As atividades e a expressão das enzimas CuZnSOD e MnSOD sofrem influência do estrogênio. Os nossos resultados mostram que a atividade da CuZnSOD está reduzida no grupo OVX e no grupo AL. No entanto, os grupos suplementados com DHA e EPA possuem a atividade semelhante ao grupo SHAM. Na literatura, há trabalhos que mostram que o estrogênio aumenta a expressão das enzimas CuZnSOD e MnSOD (Tripanichkul *et al.* 2007; Rao *et al.* 2011; Liu *et al.* 2014b). Estudos também mostram que a suplementação com ômega-3 aumenta a atividade das SODs em cérebro de ratos machos (Abdel-Wahab *et al.* 2015), no coração de ratos machos em modelo de hipóxia (Herrera *et al.* 2015) e no fígado (Garrel *et al.* 2012), também em ratos machos. Esses trabalhos realizados em machos demonstram que os AGPI são capazes de aumentar a atividade das SODs sem a influência dos altos níveis de estrogênio que ocorre nas fêmeas em situações fisiológicas normais. Portanto, o que pode explicar a atividade mais elevada das SODs nos grupos DHA e EPA seria a sua influência direta ou indireta sobre a

atividade das enzimas, o que precisa ser melhor estudado, já que o estrogênio não parece estar atuando de forma evidente na atividade das SODs de ratos machos. Já o grupo SHAM apresenta atividade alta devido a presença dos níveis fisiológicos de estrogênio.

A suplementação com AL se mostrou distinta quanto a atividade da CuZnSOD e MnSOD. Como dito anteriormente, as enzimas são controladas positivamente pelo estrogênio. O grupo AL apresenta níveis de estrogênio de ratas que representam o modelo experimental de menopausa. Sendo assim, o estrogênio não influencia a atividade da CuZnSOD e da MnSOD no grupo AL de forma positiva, já que houve a ovariectomia. Todavia, o AL estimula a atividade e a expressão da MnSOD ao atuar conjuntamente com duas proteínas das famílias das sirtuínas: Sirt1 e Sirt3. As sirtuínas são uma família conservada de proteínas que controlam o relaxamento e a contração da cromatina através dos níveis de acetilação das histonas, o que provoca a transcrição de outros fatores de transcrição. Elas estão envolvidas em inúmeros papéis fisiológicos e também, patológicos, incluindo síndrome metabólica, envelhecimento e sobrevivência celular, além de muitas outras funções. Elas exercem esse papel através da desacetilação de inúmeros substratos. A Sirt3 é expressa no núcleo e localiza-se na mitocôndria, podendo migrar até o núcleo em situações de estresse (Haigis and Sinclair 2010). A Sirt3 atua na desacetilação do fator de transcrição forkheadbox O3a- dependente (Foxo3a), que atua na transcrição do gene da MnSOD (Sundaresan *et al.* 2009). Além disso, o AL aumenta os níveis do mRNA de Sirt1, que exerce efeito na proliferação mitocondrial (Pilar Valdecantos *et al.* 2012). O AL também provoca o aumento dos níveis da proteína Sirt3 e do mRNA do Foxo3a, o que aumenta a interação entre eles, induzindo a expressão da MnSOD. Portanto, o AL é capaz de aumentar a expressão e a atividade da MnSOD, através da interação da Sirt3 com o Foxo3a e através da ativação da Sirt1, provocar a replicação mitocondrial (Pilar Valdecantos *et al.* 2012). Portanto, a maior atividade da MnSod apresentada pelo grupo AL pode ser devido às interações citadas acima. No entanto, não há estudos que avaliem se DHA e EPA também poderiam atuar de maneira similar ao AL, já que as SODs também apresentaram alta atividade no fígado das ratas suplementadas com DHA e EPA do nosso estudo.

Assim como as enzimas SODs, a GPx (sobretudo a Gpx1, a mais abundante e está localizada no citosol e na matriz mitocondrial) também responde aos níveis de

estrogênio circulantes no organismo (Priyanka *et al.* 2013). Os nossos resultados foram ao encontro da literatura e a atividade da Gpx foi significativamente menor em todos os grupos que passaram pela ovariectomia quando comparados ao grupo SHAM. No entanto, embora o grupo suplementado com AL tenha apresentado menor atividade da GPx em relação ao grupo SHAM, o grupo AL apresentou maior atividade da Gpx em relação aos demais grupos. Mas, os grupos suplementados com DHA e EPA e o grupo OVX, não apresentaram diferença entre si.

Outra medida de defesa antioxidante do estudo foi acessada pela capacidade de consumo de peróxido de hidrogênio. As enzimas capazes de consumir peróxido de hidrogênio estão presentes no citosol, mitocôndria, peroxissomos e no meio extracelular. Portanto, como o ensaio de decomposição do peróxido de hidrogênio foi realizado em um extrato celular, a medida abrange a atividade das enzimas, GPx, catalase e peroxiredoxinas simultaneamente. Embora as peroxiredoxinas tenham sido primeiramente identificadas em leveduras, há seis genes que codificam peroxiredoxinas em mamíferos e elas podem estar presentes no citosol, mitocôndrias e peroxissomos, e uma característica importantíssima dessas enzimas, é a sua capacidade de decompor peroxinitrito além de peróxido de hidrogênio (Rhee *et al.* 2005). Embora essas enzimas estejam majoritariamente no citosol, elas também estão associadas a membranas e ao núcleo, além de poderem ser exportadas para o meio extracelular (Wood *et al.* 2003). Como a catalase está localizada nos peroxissomos, a defesa celular enzimática contra os altos níveis de peróxidos é exercida cooperativamente entre as peroxiredoxinas e a GPx. Os níveis de atividade de decomposição do peróxido de hidrogênio se mostraram menores nos grupos ovariectomizados suplementados com AGPI e no grupo SHAM, quando comparados ao grupo OVX. Esse resultado pode indicar que a suplementação com antioxidantes pode ter atuado de maneira protetora e a síntese de peroxiredoxina não se fez necessária nesses grupos, já que os níveis de estrogênio não exercem influência na transcrição destas enzimas e o aumento da transcrição poderia ser uma maneira de se adaptar aos níveis de ERO e ERN, já que as peroxiredoxinas decompõem peroxinitrito e as enzimas SODs estão com baixa atividade no grupo OVX. No grupo OVX, a síntese de peroxiredoxinas pode ter sofrido estímulo para compensar a ausência da proteção exercida pelos antioxidantes nos grupos suplementados e pelo estrogênio no grupo SHAM. O que

pode explicar a alta atividade das peroxiredoxinas no grupo OVX, é que em situações nas quais os níveis de peróxido de hidrogênio poderiam estar maiores pela diminuição da atividade de outros antioxidantes, que poderiam neutralizar o peróxido de hidrogênio, a sinergia entre peroxiredoxinas e Gpx, leva as peroxiredoxinas a aumentar a sua atividade (Molavian *et al.* 2015). Como a Gpx é influenciada pelo estrogênio, e apresentou menor atividade no grupo OVX, o mecanismo sinérgico levaria a um aumento da atividade das peroxiredoxinas. Esse mecanismo sinérgico está bem evidente nos nossos resultados, embora não tenhamos quantificado os níveis de peroxiredoxinas. Vale lembrar, que as condições para que o superóxido e o NO reajam está favorável, visto que há níveis altos de NO e atividade baixa das SODs no grupo OVX.

Outra enzima que foi analisada e que demonstrou uniformidade no seu perfil de atividade foi a glutathione-S transferase (GST). Os grupos ovariectomizados não tiveram diferença entre si e tiveram a atividade da GST aumentada em relação ao grupo SHAM. Esse resultado pode indicar que não houve influência da suplementação com antioxidante e pode ser devido ao fato de que a expressão da GST não se relaciona aos níveis de estrogênio (Bellanti *et al.* 2013). A maior atividade de GST no fígado das ratas ovariectomizadas pode estar relacionado aos mecanismos de detoxificação do órgão, já que o fígado lida com inúmeros problemas inerentes à menopausa e a ovariectomia (Brady 2015; Ryu *et al.* 2015).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, os resultados dos níveis das vitaminas C e E, não demonstraram significância entre o grupo OVX e o grupo SHAM. Em mamíferos que podem sintetizar Vitamina C, a capacidade de aumentar a síntese dessa molécula conforme houver necessidade é desempenhada em tais momentos de necessidade. Um exemplo da modulação da síntese ocorre durante a prenhes, quando existe a necessidade de suprir os embriões através da síntese materna (Corpe *et al.* 2010). Esse aumento de síntese durante a gravidez pode ser controlado por estrogênio, mas o mecanismo não é conhecido. O que se sabe, é que os níveis de ácido ascórbico no plasma possuem relação diretamente proporcional aos níveis de estrogênio. Em mulheres, fica muito clara essa associação ao longo do ciclo menstrual (Michos *et al.* 2006). Os níveis de Vitamina C nos fígados das ratas deste estudo não foram significativamente distintos entre os grupos SHAM e OVX. Esse fato pode ser explicado devido ao fato de o fígado ser o órgão que sintetiza a

Vitamina C e os níveis deste antioxidante, apesar de variarem no plasma, não variam no órgão fonte. O que fica evidente no cérebro das mesmas ratas que foi objeto de estudo do nosso grupo em um trabalho anterior (Behling *et al.* 2015), em que os níveis de Vitamina C foram significativamente menores no grupo OVX em relação ao SHAM. No entanto, houve diferença entre todos os grupos suplementados em relação ao SHAM. Esse resultado pode ser devido ao fato de não haver a necessidade da síntese deste antioxidante, já que a suplementação exerceria a defesa antioxidante no órgão e os níveis de vitamina C apresentados seriam suficientes para que as outras funções da Vitamina C pudessem ser desempenhadas. No caso da VitE, os grupos SHAM, OVX e AL não apresentaram diferença entre si. No entanto, a suplementação com AGPI fez com que pouca VitE fosse absorvida e/ou retornasse ao fígado. Esse fato ocorreu em virtude da suplementação de AGPI de cadeia longa ter sido feita na ração dos animais e isso pode ter comprometido significativamente a absorção desta vitamina lipofílica ou o retorno da mesma para o fígado já que os AGPI de cadeia longa dificultam a absorção de VitE através das quilomicrons nos vasos linfáticos (Koo and Noh 2001), podendo fazer com que a Vitamina E seja excretada. Outra hipótese leva em conta a distribuição da VitE. A absorção dessa vitamina segue o processo do metabolismo lipídico pela dependência da ação dos sais biliares, formação de micelas e a incorporação aos quilomicrons nos enterócitos para posterior transporte na linfa. Alguns fatores dietéticos têm sido apontados como redutores da biodisponibilidade da VitE. Tem-se estabelecido que, tanto em animais quanto em humanos, um aumento na ingestão de gorduras insaturadas, especialmente os AGPI de cadeia longa, faz com que aumente a necessidade de ingestão de vitamina E devido ao fato de os AGPI de cadeia longa estarem preferencialmente nas membranas celulares, onde eles têm uma capacidade de sequestrar vitamina E para manter sua estabilidade oxidativa (Bjorneboe *et al.* 1990). Pode-se perceber que, embora os grupos DHA e EPA tenham apresentado menores níveis de Vitamina E no fígado em relação aos outros grupos, os níveis não diferem entre esses dois grupos. No entanto, o grupo EPA apresentou níveis inferiores de MDA em relação ao grupo DHA, o que demonstra diferente eficácia na proteção contra a formação do MDA. O DHA, é uma molécula que se insere nas bicamadas lipídicas e mantém a estrutura e a função da célula e das organelas (Al-Gubory 2012). Mas, o aumento dos níveis de

MDA não é superior aos dos grupos SHAM. Isso faz com que esses níveis possam ser considerados fisiológicos e, portanto, dentro do normal.

A suplementação com antioxidantes demonstrou efeito benéfico em relação a marcadores de estresse oxidativo, tendo sido capaz de influenciar a atividade de enzimas antioxidantes e, embora tenha interferido na absorção ou retorno de VitE ao fígado, nos grupos DHA e EPA, os resultados são promissores, já que a suplementação com ômega-3 poderia ser indicada se suplementada em horários não coincidentes aos das refeições. Outro fator importante que deve ser levado em conta na interpretação dos resultados deste estudo é a atividade mitocondrial, pois a atividade mitocondrial é a principal fonte de ERO celular. Para acessar a atividade mitocondrial, nós monitoramos a atividade da enzima fumarase. A fumarase é uma enzima codificada no DNA nuclear e atua na conversão de fumarato a malato no ciclo de Krebs e está presente tanto na matriz mitocondrial, quanto no citosol, sobretudo em leveduras (Stein *et al.* 1994), mas em mamíferos, é muito mais abundante na matriz mitocondrial (Bowes *et al.* 2007). No entanto, a discussão sobre a localização da fumarase ainda é muito forte e há muitas controvérsias sobre as concentrações citosólicas e mitocondriais (Yogev *et al.* 2011). Portanto, o resultado da fumarase pode gerar falso positivo em relação à atividade mitocondrial, mas poderia sugerir que as ratas dos grupos OVX, DHA e EPA estão com a mitocôndria com atividade reduzida em relação aos grupos SHAM e AL. Como citado anteriormente, tanto na menopausa, quanto em modelos experimentais de menopausa, há redução na atividade mitocondrial. Outro fato citado anteriormente, o AL é cofator de enzimas envolvidas no metabolismo mitocondrial e por conta disso, pode ter sido o responsável pela manutenção da atividade mitocondrial. Além disso, o AL também atua na regulação da expressão da MnSOD e isso pode auxiliar na integridade mitocondrial em virtude da dismutação do $O_2^{\cdot-}$. Outra relação importante que o AL possui com a mitocôndria está relacionado a algumas proteínas sirtuínas, com citado anteriormente.

Portanto, a suplementação com antioxidantes ministrada na dieta das ratas deste estudo apresentou-se efetiva na defesa antioxidante e influenciou a atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, corroborou com os estudos que apontam AL, DHA e EPA como moléculas anti-inflamatórias ao passo que os grupos suplementados com esses antioxidantes diminuíram a síntese de NO. Quando se

analisa a medida de NO em ratas ovariectomizadas, que de acordo com a literatura estariam com os níveis de expressão da ONe extremamente reduzidos, a síntese de NO estaria diretamente relacionada à indução da ONi através do aumento das citocinas pró-inflamatórias que tendem a estar aumentadas na menopausa e em ratas ovariectomizadas. Os grupos suplementados apresentaram níveis de NO significativamente inferiores aos grupos SHAM e OVX. Esse resultado nos permite supor que essas moléculas realmente inibem a indução da ONi. No entanto, esses resultados, apesar de não serem capazes de avaliar outros marcadores de danos e outros tipos de defesas antioxidantes, se mostram promissores na tentativa de amenizar os efeitos deletérios da menopausa. Na literatura, muitos trabalhos associam o estresse oxidativo a inúmeras doenças que são mais evidentes na menopausa. Sendo assim, a utilização dos antioxidantes que foram ministrados no nosso estudo, poderia amenizar o risco de desenvolvimento de acúmulo de gordura visceral, já que na menopausa há aumento de gordura visceral e a suplementação com AL e ômega 3, sobretudo o DHA, exercem efeitos benéficos em relação ao acúmulo de gordura visceral e em relação à resistência à insulina, que aumenta o risco de acúmulo de gordura visceral. Além disso, o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias é maior em mulheres após a menopausa, como a aterosclerose e doenças neurodegenerativas. Os antioxidantes utilizados neste estudo também exercem efeitos protetores em relação a essas complicações que, embora surjam ao longo do envelhecimento, se tornam mais evidentes após a menopausa. Sendo assim, esse estudo demonstrou que a suplementação com AL e ômega 3 (DHA e EPA) pode ser de grande valia no combate ao estresse oxidativo, já que a suplementação restaurou a atividade de enzimas que são sensíveis aos níveis de estrogênio, como as SODs. No caso da suplementação com DHA e EPA as duas SODs, e no caso da suplementação com AL, somente a MnSOD. Em relação à GPx, somente a suplementação com AL foi capaz de estimular a atividade dessa enzima, mesmo com os níveis baixos de estrogênio, fazendo com que haja maior proteção contra as ERO na falta deste hormônio. Além disso, a própria característica molecular das moléculas escolhidas para a suplementação da dieta, fazem com que elas possam neutralizar muitos tipos de ERO.

7 CONCLUSÃO

A suplementação com antioxidantes exerceu efeito protetor em relação ao estresse oxidativo em proteínas e manteve os níveis de MDA dos grupos AL e DHA similares aos níveis do grupo SHAM. A atividade das enzimas CuZnSOD, MnSOD, que são controladas por estrogênio, tiveram a atividade recuperada nos grupos suplementados com DHA e EPA. As enzimas MnSOD, GPx (também controlada por estrogênio) e fumarase tiveram a sua atividade aumentada com a suplementação de AL. Esse estudo demonstrou que a suplementação com AL, DHA e EPA pode ser de grande ajuda para amenizar os problemas simultâneos relacionados à menopausa e ao estresse oxidativo, já que esses antioxidantes restauraram a atividade de enzimas que seriam positivamente controladas por estrogênio e o estrogênio é por si só, uma molécula antioxidante. No entanto, nem todas as enzimas responderam positivamente ao tratamento, mas a própria capacidade antioxidante dos suplementos pode ter atuado na defesa do fígado das ratas suplementadas e o aumento da síntese dessas enzimas pode não ter sido necessário. Um efeito importante relacionado à suplementação com os ômega-3, foi diminuição dos níveis de VitE apresentados por esses grupos. Uma alternativa para normalizar os níveis de VitE seria a suplementação da dieta com DHA e EPA em momentos diferentes aos das refeições. Os resultados relacionados ao aumento simultâneo da atividade da fumarase e da MnSOD no grupo suplementado com AL, pode estar relacionado ao aumento das cópias mitocondriais que possui forte relação com as proteínas Sirt1 e Sirt3. Como a atividade da MnSOD também foi aumentada nos grupos suplementados com DHA e EPA, seria importante analisar a interação que esses suplementos poderiam possuir com as Sirt1 e Sirt3, embora a atividade da fumarase aparentemente não tenha sido estimulada por esses suplementos. No entanto, sabe-se que o EPA reduz a β -oxidação e que o DHA estimula a atividade mitocondrial por estimular a β -oxidação. No entanto, o DHA pode não possuir o mesmo poder de estímulo mitocondrial que o AL exerce. O AL atua no aumento do número de cópias mitocondriais e também é cofator para as enzimas do ciclo do Krebs, o que estimularia a fumarase. Essas características fazem com que o AL atue de forma muito mais evidente na restauração do metabolismo celular do que os ômega-3. No entanto, o efeito dos ômega-3 utilizados na suplementação, pode ter diminuído em função da retenção e da interação que as suas moléculas teriam com

as membranas celulares. Portanto, se as quantidades dos ômega-3 fossem maiores, os efeitos sobre as mitocôndrias poderiam estar mais evidentes. Mas, como a atividade da MnSOD foi restaurada, pode ser que haja interação dos ômega-3 com as sirtuínas. Se essa interação existir, haveria aumento no número de cópias mitocondriais e proteção das frações lipídicas das células, embora a atividade mitocondrial não sofra um aumento tão evidente quanto o AL foi capaz de induzir. Deste modo, este trabalho mostrou que a suplementação com esses antioxidantes foi efetiva no combate ao estresse oxidativo e também pode atuar de maneira decisiva na restauração do metabolismo energético celular após à menopausa, já que poderia estar atuando nas Sirt1 e 3. Mas, essa interação deve ser aferida em relação aos ômega-3.

8 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados desse estudo, há a necessidade de se averiguar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, o aumento da síntese da ONi e a redução da síntese de ONe, o aumento das sirtuínas 1 e 3 nos grupos suplementados, a expressão dos mir-33 e mir-122, além da expressão do mir-146a, que possui o mRNA da MnSOD como alvo e poderia estar aumentado na redução dos níveis de estrogênio (a atividade da MnSOD reduziu drasticamente no grupo OVX). Essas análises são importantes para que os efeitos das suplementações utilizadas nesse estudo sejam compreendidos de forma mais completa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Wahab, BA, Shaikh, IA, Khateeb, MM, Habeeb, SM (2015) Omega 3 polyunsaturated fatty acids enhance the protective effect of levetiracetam against seizures, cognitive impairment and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 135, 105-113.

Abe, C, Ikeda, S, Uchida, T, Yamashita, K, Ichikawa, T (2007) Triton WR1339, an inhibitor of lipoprotein lipase, decreases vitamin e concentration in some tissues of rats by inhibiting its transport to liver. *Journal of Nutrition* 137, 345-350.

Abildgaard, J, Pedersen, AT, Green, CJ, Harder-Lauridsen, NM, Solomon, TP, Thomsen, C, Juul, A, Pedersen, M, Pedersen, JT, Mortensen, OH, Pilegaard, H, Pedersen, BK, Lindegaard, B (2013) Menopause is associated with decreased whole body fat oxidation during exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 304,1227-1236.

Abreu, IA, Cabelli, DE (2010) Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1804, 263-274.

Aebi, H (1984) CATALASE INVITRO. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

Al-Gubory, KH (2012) Mitochondria: Omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 1569-1573.

Al-Rimawi, F (2015) Development and Validation of a Simple Reversed-Phase HPLC-UV Method for Determination of Malondialdehyde in Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 92, 933-937.

Anderson, MM, Hazen, SL, Hsu, FF, Heinecke, JW (1997) Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein - A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 99, 424-432

Arambasic, J, Mihailovic, M, Uskokovic, A, Dinic, S, Grdovic, N, Markovic, J, Poznanovic, G, Bajec, D, Vidakovic, M (2013) Alpha-lipoic acid upregulates antioxidant enzyme gene expression and enzymatic activity in diabetic rat kidneys through an O-GlcNAc-dependent mechanism. *European Journal of Nutrition* 52, 1461-1473.

Artaudwild, SM, Connor, SL, Sexton, G, Connor, WE (1993) differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in france and finland - a paradox. *Circulation* 88, 2771-2779.

Aubourg, SP (1999) Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species. *Food Research International* 32, 497-502.

Ayala, A, Perrin, MM, Ertel, W, Chaudry, IH (1992) differential-effects of hemorrhage on kupffer cells - decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (il-1, il-6 and tnf) release. *Cytokine* 4, 66-75.

Baek, I-J, Jung, KY, Yon, J-M, Lee, S-R, Lee, BJ, Yun, YW, Nam, S-Y (2011) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene is regulated via an estrogen and estrogen receptor signaling in cultured mouse fetuses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 47, 535-540.

Baeza, I, De Castro, NM, Gimenez-Llort, L, De la Fuente, M (2010) Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *Journal of Neuroimmunology* 219, 90-99.

Bakewell, L, Burdge, GC, Calder, PC (2006) Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets. *British Journal of Nutrition* 96, 93-99.

Barbas, C, Castro, M, Bonet, B, Viana, M, Herrera, E (1997) Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 778, 415-420.

Baselga-Escudero L, Arola-Arnal A, Pascual-Serrano A, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvadó M-J, et al. (2013) Chronic Administration of Proanthocyanidins or Docosahexaenoic Acid Reverses the Increase of miR-33a and miR-122 in Dyslipidemic Obese Rats. *PLoS ONE* 8(7): e69817. doi:10.1371/journal.pone.0069817.

Beavers, KM, Serra, MC, Beavers, DP, Cooke, MB, Willoughby, DS (2009) Soymilk supplementation does not alter plasma markers of inflammation and oxidative stress in postmenopausal women. *Nutrition Research* 29, 616-622.

Beckman, JS, Koppenol, WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 271, 1424 - 1437.

Behling, CS, Andrade, AS, Putti, JS, Mahl, CD, Hackenhaar, FS, Silva, ACA, Silva, MNCe, Salomon, TB, Santos, CEId, Dias, JF, Benfato, MS, 2015. Treatment of oxidative stress in brain of ovariectomized rats with omega-3 and lipoic acid. *Molecular Nutrition Food and Research*. 59: 2547-2555.

Bellanti, F, Matteo, M, Rollo, T, De Rosario, F, Greco, P, Vendemiale, G, Serviddio, G (2013) Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. *Redox Biology* 1, 340-346.

Biewenga, GP, Haenen, G, Bast, A (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology* 29, 315-331.

Bjorneboe, A, Bjorneboe, GEA, Drevon, CA (1990) absorption, transport and distribution of vitamin-e. *Journal of Nutrition* 120, 233-242.

Borras, C, Gambini, J, Gomez-Cabrera, MC, Sastre, J, Pallardo, FV, Mann, GE, Vina, J (2005) 17 beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2 (MAPK)/NF kappa B cascade. *Aging Cell* 4, 113-118.

Borras, C, Sastre, J, Garcia-Sala, D, Lloret, A, Pallardo, FV, Vina, J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 546-552.

Bowes, T, Singh, B, Gupta, RS (2007) Subcellular localization of fumarase in mammalian cells and tissues. *Histochemistry and Cell Biology* 127, 335-346.

Bradford, MM (1976) rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brady, CW (2015) Liver disease in menopause. *World Journal of Gastroenterology* 21, 7613-7620.

Bupp, MRG (2015) Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cellular Immunology* 294, 102-110.

Burdge, GC, Calder, PC (2006) Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutrition Research Reviews* 19, 26-52.

Calder, PC (2015) Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 469-484.

Calder, PC, Yaqoob, P (2009) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors* 35, 266-272.

Caliman IF, Lamas AZ, Dalpiaz PLM, Medeiros ARS, Abreu GR, Gomes Figueiredo S, et al. (2013) Endothelial Relaxation Mechanisms and Oxidative Stress Are Restored by Atorvastatin Therapy in Ovariectomized Rats. *PLoS ONE* 8(11): e80892. doi:10.1371/journal.pone.0080892.

Carr, MC (2003) The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 2404-2411.

Ce, C, Zhou, L-y, Ma, Y, Zhu, L, Yu, D, Zhao, Y-w, Yang, N-h (2014) Effect of ovariectomy on serum adiponectin levels and visceral fat in rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences* 34, 825-829.

Chen C, Yu X, Shao S (2015) Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Glucose Control and Lipid Levels in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 10(10): e0139565. doi:10.1371/journal.pone.0139565.

Commoner, B, Townsend, J, Pake, GE (1954) free radicals in biological materials. *Nature* 174, 689-691.

Corpe, CP, Tu, H, Eck, P, Wang, J, Faulhaber-Walter, R, Schnermann, J, Margolis, S, Padayatty, S, Sun, H, Wang, Y, Nussbaum, RL, Espey, MG, Levine, M (2010) Vitamin C transporter Slc23a1 links renal reabsorption, vitamin C tissue accumulation, and perinatal survival in mice. *Journal of Clinical Investigation* 120, 1069-1083.

Cury Rodrigues, MF, Stotzer, US, Domingos, MM, Deminice, R, Shiguemoto, GE, Tomaz, LM, Frade de Sousa, NM, Ferreira, FC, Leite, RD, Selistre-de-Araujo, HS, Jordao-Junior, AA, Baldissera, V, de Andrade Perez, SE (2013) Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. *Clinics* 68, 1247-1254.

Daak, AA, Elderbery, AY, Elbashir, LM, Mariniello, K, Mills, J, Scarlett, G, Elbashir, MI, Ghebremeskel, K (2015) Omega 3 (n-3) fatty acids down-regulate nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) gene and blood cell adhesion molecule expression in patients with homozygous sickle cell disease. *Blood Cells Molecules and Diseases* 55, 48-55.

Davis, SR, Castelo-Branco, C, Chedraui, P, Lumsden, MA, Nappi, RE, Shah, D, Villaseca, P, *Int Menopause Soc World, M* (2012) Understanding weight gain at menopause. *Climacteric* 15, 419-429.

Derosa, G, Preciado Limas, C, Ceballos Macias, P, Estrella, A, Maffioli, P (2014) Dietary and nutraceutical approach to type 2 diabetes. *Archives of Medical Science* 10, 336-344.

Despres, JP (1993) ABDOMINAL OBESITY AS IMPORTANT COMPONENT OF INSULIN-RESISTANCE SYNDROME. *Nutrition* 9, 452-459.

Domenichiello, AF, Chen, CT, Trepanier, M-O, Stavro, PM, Bazinet, RP (2014) Whole body synthesis rates of DHA from alpha-linolenic acid are greater than brain DHA accretion and uptake rates in adult rats. *Journal of Lipid Research* 55, 62-74.

Donato, GB, Fuchs, SC, Oppermann, K, Bastos, C, Spritzer, PM (2006) Association between menopause status and central adiposity measured at different cutoffs of waist circumference and waist-to-hip ratio. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society* 13, 280-285.

Draper, HH, Hadley, M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid-peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421-431.

Du, Z-Y, Ma, T, Liaset, B, Keenan, AH, Araujo, P, Lock, E-J, Demizieux, L, Degrace, P, Froyland, L, Kristiansen, K, Madsen, L (2013) Dietary eicosapentaenoic acid supplementation accentuates hepatic triglyceride accumulation in mice with impaired fatty acid oxidation capacity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831, 291-299.

Dyall, SC (2015) Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience* 7.

El-Mas, MM, El-gowilly, SM, Gohar, EY, Ghazal, A-RM, Abdel-Rahman, AA (2011) Estrogen dependence of the renal vasodilatory effect of nicotine in rats: Role of alpha (7) nicotinic cholinergic receptor/eNOS signaling. *Life Sciences* 88, 187-193.

Evans, RM, Mangelsdorf, DJ (2014) Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* 157, 255-266.

Fan, G-W, Gao, X-M, Wang, H, Zhu, Y, Zhang, J, Hu, L-M, Su, Y-F, Kang, L-Y, Zhang, B-L (2009) The anti-inflammatory activities of Tanshinone IIA, an active component of TCM, are mediated by estrogen receptor activation and inhibition of iNOS. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 113, 275-280.

Farago, N, Feher, LZ, Kitajka, K, Das, UN, Puskas, LG (2011) MicroRNA profile of polyunsaturated fatty acid treated glioma cells reveal apoptosis-specific expression changes. *Lipids in Health and Disease* 10.

Fernandez-Galilea, M, Perez-Matute, P, Prieto-Hontoria, PL, Houssier, M, Burrell, MA, Langin, D, Martinez, JA, Moreno-Aliaga, MJ (2015) alpha-Lipoic acid treatment increases mitochondrial biogenesis and promotes beige adipose features in subcutaneous adipocytes from overweight/obese subjects. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 273-281.

Flint, DH, Smykrandall, E, Tuminello, JF, Draczynskalusiak, B, Brown, OR (1993a) the inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in escherichia-coli treated with

hyperbaric-oxygen occurs because of the destruction of its fe-s cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *Journal of Biological Chemistry* 268, 25547-25552.

Flint, DH, Tuminello, JF, Emptage, MH (1993b) the inactivation of fe-s cluster containing hydro-lyases by superoxide. *Journal of Biological Chemistry* 268, 22369-22376.

Funk, CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.

Gabriel Camporez, JP, Akamine, EH, Davel, AP, Franci, CR, Rossoni, LV, de Oliveira Carvalho, CR (2011) Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *Journal of Physiology-London* 589, 2585-2596.

Garrel, C, Alessandri, J-M, Guesnet, P, Al-Gubory, KH (2012) Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 123-131.

Gavin, KM, Seals, DR, Silver, AE, Moreau, KL (2009) Vascular Endothelial Estrogen Receptor alpha Is Modulated by Estrogen Status and Related to Endothelial Function and Endothelial Nitric Oxide Synthase in Healthy Women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94, 3513-3520.

Gdula-Argasinska, J, Czepiel, J, Wozniakiewicz, A, Wojton, K, Grzywacz, A, Wozniakiewicz, M, Jurczyszyn, A, Perucki, W, Librowski, T (2015) n-3 Fatty acids as resolvents of inflammation in the A549 cells. *Pharmacological Reports* 67, 610-615.

Gebka, A, Serkies-Minuth, E, Raczynska, D (2014) Effect of the Administration of Alpha-Lipoic Acid on Contrast Sensitivity in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes. *Mediators of Inflammation* Volume 2014 (2014), 7 pages.

Geller, DA (1995) hot papers molecular-biology - molecular-cloning and expression of inducible nitric-oxide synthase from human hepatocytes by Geller,D.A., Lowenstein,C.J., Shapiro,R.A., Nussler,A.K., Disilvio,M., Wang,S.C., Nakayama, D.K., Simmons,R.L., Snyder,S.H., Billiar,T.R. *Scientist* 9, 14-14.

Gerin, I, Clerbaux, L-A, Haumont, O, Lanthier, N, Das, AK, Burant, CF, Leclercq, IA, MacDougald, OA, Bommer, GT (2010) Expression of miR-33 from an SREBP2 Intron Inhibits Cholesterol Export and Fatty Acid Oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 33652-33661.

Gerschman, R, Gilbert, DL, Nye, SW, Dwyer, P, Fenn, WO (1954) oxygen poisoning and x-irradiation - a mechanism in common. *Science* 119, 623-626.

Ghilarducci, DP, Tjeerdema, RS (1995) Fate and effects of acrolein. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 144 144, 95-146.

Gil-Zamorano, J, Martin, R, Daimiel, L, Richardson, K, Giordano, E, Nicod, N, Garcia-Carrasco, B, Soares, SMA, Iglesias-Gutierrez, E, Lasuncion, MA, Sala-Vila, A, Ros, E, Ordovas, JM, Visioli, F, Davalos, A (2014) Docosahexaenoic Acid Modulates the Enterocyte Caco-2 Cell Expression of MicroRNAs Involved in Lipid Metabolism. *Journal of Nutrition* 144, 575-585.

Gomes, MB, Negrato, CA (2014) Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 6.

Grygiel-Gorniak, B, Marcinkowska, J, Szczepanik, A, Przyslawski, J (2014) Nutritional habits and oxidative stress in postmenopausal age. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej-Polish Archives of Internal Medicine* 124, 298-305.

Hackenhaar, FS, Salomon, TB, Gil Alabarse, PV, Ehrenbrink, G, Benfato, MS (2009) Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochemistry and Function* 27, 378-382.

Haigis, MC, Sinclair, DA (2010) Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease* 5, 253-295.

Hansson, P, Barregard, L, Halltorp, M, Sibthorpe, S, Svelander, C, Sandberg, A-S, Basu, S, Hoppe, MR, Hulthen, L (2015) Habitual high intake of fatty fish is related to lower levels of F-2-isoprostane in healthy women. *Nutrition* 31, 847-852.

Hao, L, Wang, Y, Duan, Y, Bu, S (2010) Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment. *European Journal of Applied Physiology* 109, 879-886.

Harman, D (1956) AGING - a theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journals of Gerontology* 11, 298-300.

Hausladen, A, Fridovich, I (1994) superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric-oxide does not. *Journal of Biological Chemistry* 269, 29405-29408.

Herrera, EA, Farias, JG, Gonzalez-Candia, A, Short, SE, Carrasco-Pozo, C, Castillo, RL (2015) omega 3 Supplementation and Intermittent Hypobaric Hypoxia Induce Cardioprotection Enhancing Antioxidant Mechanisms in Adult Rats. *Marine Drugs* 13, 838-860.

Hiller, S, DeKroon, R, Xu, L, Robinette, J, Winnik, W, Alzate, O, Simington, S, Maeda, N, Yi, X (2014) alpha-Lipoic acid protects mitochondrial enzymes and attenuates lipopolysaccharide-induced hypothermia in mice. *Free Radical Biology and Medicine* 71, 362-367.

Hirayama, T, Yamada, N, Nohara, M, Fukui, S (1983) high-performance liquid-chromatographic determination of malondialdehyde in vegetable-oils. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 66, 304-308.

Hoff, HF, Oneil, J, Chisolm, GM, Cole, TB, Quehenberger, O, Esterbauer, H, Jurgens, G (1989) modification of low-density lipoprotein with 4-hydroxynonenal induces uptake by macrophages. *Arteriosclerosis* 9, 538-549.

Hoki, T, Miyanishi, K, Tanaka, S, Takada, K, Kawano, Y, Sakurada, A, Sato, M, Kubo, T, Sato, T, Sato, Y, Takimoto, R, Kobune, M, Kato, J (2015) Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 62, 751-761.

Holzerova, E, Prokisch, H (2015) Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 63, 16-20.

Hong, S, Lu, Y (2013) Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. *Frontiers in Immunology* 4.

Hou, Y, Zhang, S, Wang, L, Li, J, Qu, G, He, J, Rong, H, Ji, H, Liu, S (2012) Estrogen regulates iron homeostasis through governing hepatic hepcidin expression via an estrogen response element. *Gene* 511, 398-403.

Innis, SM (2005) Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 26, 70-75.

Iwasa, T, Matsuzaki, T, Kinouchi, R, Gereltsetseg, G, Murakami, M, Munkhzaya, M, Altankhuu, T, Kuwahara, A, Yasui, T, Irahara, M (2014) Changes in central and peripheral inflammatory responses to lipopolysaccharide in ovariectomized female rats. *Cytokine* 65, 65-73.

Jasin, HE (1983) generation of igg aggregates by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system. *Journal of Immunology* 130, 1918-1923.

Jia, M, Dahlman-Wright, K, Gustafsson, J-A (2015) Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29, 557-568.

Jian, J, Pelle, E, Huang, X (2009) Iron and Menopause: Does Increased Iron Affect the Health of Postmenopausal Women? *Antioxidants & Redox Signaling* 11, 2939-2943.

Kagan, VE, Shvedova, A, Serbinova, E, Khan, S, Swanson, C, Powell, R, Packer, L (1992) dihydrolipoic acid - a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase - reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochemical Pharmacology* 44, 1637-1649.

Kakuda, Y, Stanley, DW, Vandervoort, FR (1981) the determination of tba-number by high-performance liquid-chromatography. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal-Journal De L Institut Canadien De Science Et Technologie Alimentaires* 14, 168-168.

Kakui, K, Itoh, H, Sagawa, N, Yura, S, Korita, D, Takemura, M, Miyamaoto, Y, Saito, Y, Nakao, K, Fujii, S (2004) Augmented endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein expression in human pregnant myometrium: possible involvement of eNOS promoter activation by estrogen via both estrogen receptor (ER)alpha and ER beta. *Molecular Human Reproduction* 10, 115-122.

Kandeil, MA, Amin, KA, Hassanin, KA, Ali, KM, Mohammed, ET (2011) Role of lipoic acid on insulin resistance and leptin in experimentally diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications* 25, 31-38.

Kang, DH, Lee, DJ, Lee, KW, Park, YS, Lee, JY, Lee, S-H, Koh, YJ, Koh, G-Y, Choi, C, Yu, D-Y, Kim, J, Kang, SW (2011) Peroxiredoxin II Is an Essential Antioxidant Enzyme that Prevents the Oxidative Inactivation of VEGF Receptor-2 in Vascular Endothelial Cells. *Molecular Cell* 44, 545-558.

Kankofer, M, Radzki, RP, Bienko, M, Albera, E (2007) Anti-oxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 54, 225-229.

Karabay, AZ, 2015. Inhibitory effects of indole α -lipoic acid derivatives on nitric oxide production in LPS/IFN γ activated RAW 264.7 macrophages. *cell biochemistry and function*. 33: 121–127.

Karatepe, M (2004) Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America* 104-106.

Karpuzoglu, E, Ahmed, SA (2006) Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 15, 177-186.

Katakura M, Hashimoto M, Inoue T, Mamun AA, Tanabe Y, Arita M, et al. (2015) Chronic Arachidonic Acid Administration Decreases Docosahexaenoic Acid- and Eicosapentaenoic Acid-Derived Metabolites in Kidneys of Aged Rats. *PLoS ONE* 10(10): e0140884. doi:10.1371/journal.pone.0140884.

Kielar, M, Penfield, J, Sicher, S, Che, L, Lu, C (1997) Docosahexaenoic acid (DHA) inhibits transcription of the gene for inducible nitric oxide synthase (iNOS) BY preventing activation of NF-kB and IRF-1 response elements of the promotor. *Journal of the American Society of Nephrology* 8, 2125-2125.

Kim, H-Y (2007) Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. *Journal of Biological Chemistry* 282, 18661-18665.

Kim, JH, Cho, HT, Kim, YJ (2014) The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocrine Journal* 61, 1055-1067.

Kireev, RA, Tresguerres, ACF, Garcia, C, Ariznavarreta, C, Vara, E, Tresguerres, JAF (2008) Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. *Journal of Pineal Research* 45, 394-402.

Kireev, RA, Tresguerres, ACF, Garcia, C, Borrás, C, Ariznavarreta, C, Vara, E, Vina, J, Tresguerres, JAF (2010) Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. *Biogerontology* 11, 229-243.

Kishida, E, Oribe, M, Mochizuki, K, Kojo, S, Iguchi, H (1990) determination of malondialdehyde with chemical derivatization into the pyrimidine compound and HPLC. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1045, 187-188.

Kitson, AP, Stroud, CK, Stark, KD (2010) Elevated production of docosahexaenoic acid in females: Potential Molecular Mechanisms. *Lipids* 45, 209-224.

Koo, SI, Noh, SK (2001) Phosphatidylcholine inhibits and lysophosphatidylcholine enhances the lymphatic absorption of alpha-tocopherol in adult rats. *Journal of Nutrition* 131, 717-722.

Koopman, WJH, Nijtmans, LGJ, Dieteren, CEJ, Roestenberg, P, Valsecchi, F, Smeitink, JAM, Willems, PHGM (2010) Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation. *Antioxidants & Redox Signaling* 12, 1431-1470.

Korbashi, P, Kohen, R, Katzhendler, J, Chevion, M (1986) iron mediates paraquat toxicity in *escherichia-coli*. *Journal of Biological Chemistry* 261, 2472-2476.

Koriyama, Y, Nakayama, Y, Matsugo, S, Sugitani, K, Ogai, K, Takadera, T, Kato, S (2013) Anti-inflammatory effects of lipoic acid through inhibition of GSK-3 beta in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. *Neuroscience Research* 77, 87-96.

Kris-Etherton, PM, Taylor, DS, Yu-Poth, S, Huth, P, Moriarty, K, Fishell, V, Hargrove, RL, Zhao, GX, Etherton, TD (2000) Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 179-188.

Kumar, A, Sushama, A, Manral, S, Sinha, R, Joshi, R, Singh, U, Rohil, V, Prasad, AK, Parmar, VS, Raj, HG (2012) Calreticulin Transacetylase mediated activation of human platelet nitric oxide synthase by acetyl group donor compounds. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 26, 9-19.

Kumral, ZNO, Memi, G, Ercan, F, Yegen, BC (2014) Estrogen alleviates acetic acid-induced gastric or colonic damage via both ER alpha- and ER beta-Mediated and Direct Antioxidant Mechanisms in Rats. *Inflammation* 37, 694-705.

Lang, J, Celotto, C, Esterbauer, H (1985) quantitative-determination of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal by high-performance liquid-chromatography. *Analytical Biochemistry* 150, 369-378.

Levine, RL, Garland, D, Oliver, CN, Amici, A, Climent, I, Lenz, AG, Ahn, BW, Shaltiel, S, Stadtman, ER (1990) determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464-478.

Levy, BD, Serhan, CN (2014) Resolution of Acute Inflammation in the Lung. *Annual Review of Physiology*, Vol 76 76, 467-492.

Li, G, Fu, J, Zhao, Y, Ji, K, Luan, T, Zang, B (2015) Alpha-Lipoic Acid Exerts Anti-Inflammatory Effects on Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Mesangial Cells via Inhibition of Nuclear Factor Kappa B (NF-kappa B) Signaling Pathway. *Inflammation* 38, 510-519.

Li, P, Ding, G, Deng, Y, Punyapitak, D, Li, D, Cao, Y (2013) Determination of malondialdehyde in biological fluids by high-performance liquid chromatography using rhodamine B hydrazide as the derivatization reagent. *Free Radical Biology and Medicine* 65, 224-231.

Li, Y, Ma, Q-G, Zhao, L-H, Wei, H, Duan, G-X, Zhang, J-Y, Ji, C (2014) Effects of Lipoic Acid on Immune Function, the Antioxidant Defense System, and Inflammation-Related Genes Expression of Broiler Chickens Fed Aflatoxin Contaminated Diets. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 5649-5662.

Lii, CK, Chai, YC, Zhao, W, Thomas, JA, Hendrich, S (1994) s-thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic-anhydrase-iii during oxidative stress - a method for studying protein modification in intact-cells and tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 308, 231-239.

Linnane, AW, Kios, M, Vitetta, L (2007) 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.

Little, SJ, Lynch, MA, Manku, M, Nicolaou, A (2007) Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: A lipidomic analysis. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 77, 155-162.

Liu, M, Boussetta, T, Makni-Maalej, K, Fay, M, Driss, F, El-Benna, J, Lagarde, M, Guichardant, M (2014a) Protectin DX, a Double Lipoxygenase Product of DHA, Inhibits Both ROS Production in Human Neutrophils and Cyclooxygenase Activities. *Lipids* 49, 49-57.

Liu, Z, Gou, Y, Zhang, H, Zuo, H, Zhang, H, Liu, Z, Yao, D (2014b) Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall. *Redox Biology* 3, 88-99.

Liu, ZF, Minkler, PE, Sayre, LA (2003) Mass spectroscopic characterization of protein modification by 4-Hydroxy-2-(E)-nonenal and 4-Oxo-2-(E)-nonenal. *Chemical Research in Toxicology* 16, 901-911.

Lovejoy, JC, Champagne, CM, de Jonge, L, Xie, H, Smith, SR (2008) Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *International Journal of Obesity* 32, 949-958.

Luo, F, Ishigami, M, Achiwa, K, Ishizu, Y, Kuzuya, T, Honda, T, Hayashi, K, Ishikawa, T, Katano, Y, Goto, H (2015) Raloxifene Ameliorates Liver Fibrosis of Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by Choline-Deficient High-Fat Diet in Ovariectomized Mice. *Digestive Diseases and Sciences* 60, 2730-2739.

Lyons, CR, Orloff, GJ, Cunningham, JM (1992) Molecular-cloning and functional expression. Of na inducible nitric-oxide synthase from a murine macrophage cell-line. *Journal of Biological Chemistry* 267, 6370-6374.

Maczurek, A, Hager, K, Kenklies, M, Sharman, M, Martins, R, Engel, J, Carlson, DA, Muench, G (2008) Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1463-1470.

Marchesini, G, Brizi, M, Bianchi, G, Tomassetti, S, Bugianesi, E, Lenzi, M, McCullough, AJ, Natale, S, Forlani, G, Melchionda, N (2001) Nonalcoholic fatty liver disease - A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50, 1844-1850.

Margolis, KL, Bonds, DE, Rodabough, RJ, Tinker, L, Phillips, LS, Allen, C, Bassford, T, Burke, G, Torrens, J, Howard, BV, Women's Hlth Initiative, I (2004) Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* 47, 1175-1187.

Marino, M, Galluzzo, P, Ascenzi, P (2006) Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current Genomics* 7, 497-508.

Mason, JK, Kharotia, S, Wiggins, AKA, Kitson, AP, Chen, J, Bazinet, RP, Thompson, LU (2014) 17 beta-Estradiol Increases Liver and Serum Docosahexaenoic Acid in Mice Fed Varying Levels of alpha-Linolenic Acid. *Lipids* 49, 745-756.

McCarrey, AC, Resnick, SM (2015) Postmenopausal hormone therapy and cognition. *Hormones and Behavior* 74, 167-172.

Mendonca, LdS, Fernandes-Santos, C, Mandarim-de-Lacerda, CA (2007) Cardiac and aortic structural alterations due to surgically-induced menopause associated with renovascular hypertension in rats. *International Journal of Experimental Pathology* 88, 301-309.

Mescam, M, Vinnakota, KC, Beard, DA (2011) Identification of the Catalytic Mechanism and Estimation of Kinetic Parameters for Fumarase. *Journal of Biological Chemistry* 286, 21100-21109.

Michos, C, Kiortsis, DN, Evangelou, A, Karkabounas, S (2006) Antioxidant protection during the menstrual cycle: the effects of estradiol on ascorbic-dehydroascorbic acid plasma levels and total antioxidant plasma status in eumenorrhic women during the menstrual cycle. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* 85, 960-965.

Milman, N (1996) Serum ferritin in Danes: Studies of iron status from infancy to old age, during blood donation and pregnancy. *International Journal of Hematology* 63, 103-135.

Min, J (2007) 17 beta-Estradiol-Stimulated eNOS gene transcriptional activation is regulated through the estrogen-responsive element in eNOS promoter. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12, 446-449.

Moiety, Fady M.S, Salem, Heshan A, Mahana, Radwa A (2015) Comparative study on induction and effects of surgical menopause in a female rat model: a prospective case control study. *International journal of clinical and experimental medicine*. 6 9403-9411

Molavian, H, Tonekaboni, AM, Kohandel, M, Sivaloganathan, S (2015) The Synergetic Coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and its Effect on the Concentration of H₂O₂. *Scientific Reports* 5.

Monteiro, R, Teixeira, D, Calhau, C (2014) Estrogen Signaling in Metabolic Inflammation. *Mediators of Inflammation*

Moreau, KL, Hildreth, KL, Meditz, AL, Deane, KD, Kohrt, WM (2012) Endothelial Function Is Impaired across the Stages of the Menopause Transition in Healthy Women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, 4692-4700.

Moreira, PI, Custodio, JBA, Nunes, E, Oliveira, PJ, Moreno, A, Seica, R, Oliveira, CR, Santos, MS (2011) Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17 beta-estradiol and tamoxifen. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 123, 8-16.

Morel, I, Cillard, J, Lescoat, G, Sergent, O, Padeloup, N, Ocaktan, AZ, Abdallah, MA, Brissot, P, Cillard, P (1992) antioxidant and free-radical scavenging activities of the iron chelators pyoverdin and hydroxypyrid-4-ones in iron-loaded hepatocyte

cultures - comparison of their mechanism of protection with that of desferrioxamine. *Free Radical Biology and Medicine*. 13, 499-508.

Morschl, E, Pavo, I, Varga, G, Nemcsik, J, Laszlo, F, Whittle, BJR (2001) Endogenous bacteria-triggered inducible nitric oxide synthase activation protects the ovariectomized rat stomach. *Journal of Physiology-Paris* 95, 137-140.

Mostoslavsky, R, Chua, KF, Lombard, DB, Pang, WW, Fischer, MR, Gellon, L, Liu, PF, Mostoslavsky, G, Franco, S, Murphy, MM, Mills, KD, Patel, P, Hsu, JT, Hong, AL, Ford, E, Cheng, HL, Kennedy, C, Nunez, N, Bronson, R, Frendewey, D, Auerbach, W, Valenzuela, D, Karow, M, Hottiger, MO, Hursting, S, Barrett, JC, Guarente, L, Mulligan, R, Demple, B, Yancopoulos, GD, Alt, FW (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124, 315-329.

Munoz-Castaneda, JR, Muntane, J, Herencia, C, Munoz, MC, Bujalance, I, Montilla, P, Tunez, I (2006) Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. *Gynecological Endocrinology* 22, 74-79.

O'Sullivan, AJ, Ho, KKY (2000) Route-dependent endocrine and metabolic effects of estrogen replacement therapy. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 13, 1457-1466.

Odonnell, VB, Chumley, PH, Hogg, N, Bloodsworth, A, DarleyUsmar, VM, Freeman, BA (1997) Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: Kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* 36, 15216-15223.

Pacher, P, Beckman, JS, Liaudet, L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 87, 315-424.

Padmalayam, I, Hasham, S, Saxena, U, Pillarisetti, S (2009) Lipoic Acid Synthase (LASY) A Novel Role in Inflammation, Mitochondrial Function, and Insulin Resistance. *Diabetes* 58, 600-608.

Park, K-G, Min, A-K, Koh, EH, Kim, HS, Kim, M-O, Park, H-S, Kim, Y-D, Yoon, T-S, Jang, BK, Hwang, JS, Kim, JB, Choi, H-S, Park, J-Y, Lee, I-K, Lee, K-U (2008) Alpha-Lipoic Acid Decreases Hepatic Lipogenesis Through Adenosine Mono phosphate-Activated Protein Kinase (AMPK)-Dependent and AMPK-Independent Pathways. *Hepatology* 48, 1477-1486.

Pashaj, A, Xia, M, Canny, S, Riethoven, J-JM, Moreau, R (2013) Characterization of genome-wide transcriptional changes in liver and adipose tissues of ZDF (fa/fa) rats fed R-alpha-lipoic acid by next-generation sequencing. *Physiological Genomics* 45, 1136-1143.

Patel, RP, Levonen, AL, Crawford, JH, Darley-Usmar, VM (2000) Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 47, 465-474.

Pechenino, AS, Lin, L, Mbai, FN, Lee, AR, He, X-M, Stallone, JN, Knowlton, AA (2011) Impact of aging vs. estrogen loss on cardiac gene expression: estrogen replacement and inflammation. *Physiological Genomics* 43, 1065-1073.

Peng, ZQ, Vaananen, HK, Zhang, HX, Tuukkanen, J (1997) Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* 20, 207-212.

Pfeilschifter, J, Koditz, R, Pfohl, M, Schatz, H (2002) Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine Reviews* 23, 90-119.

Pilar Valdecantos, M, Perez-Matute, P, Gonzalez-Muniesa, P, Prieto-Hontoria, PL, Moreno-Aliaga, MJ, Martinez, JA (2012) Lipoic Acid Improves Mitochondrial Function in Nonalcoholic Steatosis Through the Stimulation of Sirtuin 1 and Sirtuin 3. *Obesity* 20, 1974-1983.

Pinna, C, Cignarella, A, Sanvito, P, Pelosi, V, Bolego, C (2008) Prolonged ovarian hormone deprivation impairs the protective vascular actions of estrogen receptor alpha Agonists. *Hypertension* 51, 1210-1217.

Princiotta, MF, Finzi, D, Qian, SB, Gibbs, J, Schuchmann, S, Buttgereit, F, Bennink, JR, Yewdell, JW (2003) Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354.

Priyanka, HP, Krishnan, HC, Singh, RV, Hima, L, ThyagaRajan, S (2013) Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: Effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. *Molecular Immunology* 56, 328-339.

Priyanka, HP, Singh, RV, Pratap, UP, ThyagaRajan, S (2014) Estrogen modulates beta (2)-adrenoceptor-induced cell-mediated and inflammatory immune responses through ER-alpha involving distinct intracellular signaling pathways, antioxidant enzymes, and nitric oxide. *Cellular Immunology* 292, 1-8.

Prokai, L, Prokai-Tatrai, K, Perjesi, P, Simpkins, JW (2005) Mechanistic insights into the direct antioxidant effects of estrogens. *Drug Development Research* 66, 118-125.

Qian, Y, Yin, C, Chen, Y, Zhang, S, Jiang, L, Wang, F, Zhao, M, Liu, S (2015) Estrogen contributes to regulating iron metabolism through governing ferroportin signaling via an estrogen response element. *Cellular Signalling* 27, 934-942.

Racine, RA, Deckelbaum, RJ (2007) Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 10, 123-128.

Radi, R, Bush, KM, Cosgrove, TP, Freeman, BA (1991) reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 286, 117-125.

Radmard, AR, Poustchi, H, Dadgostar, M, Yoonessi, A, Kooraki, S, Jafari, E, Taheri, APH, Malekzadeh, R, Merat, S (2015) Liver Enzyme Levels and Hepatic Iron Content in Fatty Liver: A Noninvasive Assessment in General Population by T2* Mapping. *Academic Radiology* 22, 714-721.

Rao, AK, Dietrich, AK, Ziegler, YS, Nardulli, AM (2011) 17 beta-Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: A mechanism to protect neurons from ischemia. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, 382-389.

Rapoport, SI, Igarashi, M, Gao, F (2010) Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82, 273-276.

Reed, LJ (1998) From lipoic acid to multi-enzyme complexes. *Protein Science* 7, 220-224.

Reeves, PG, Nielsen, FH, Fahey, GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents - final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 123, 1939-1951.

Rettberg, JR, Yao, J, Brinton, RD (2014) Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 8-30.

Rhee, SG, Chae, HZ, Kim, K (2005) Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 38, 1543-1552.

Rochette, L, Zeller, M, Cottin, Y, Vergely, C (2014) Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1840, 2709-2729.

Rottiers, V, Naar, AM (2012) MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders (vol 13, pg 239, 2012). *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 281-281.

Ruizlarrea, B, Leal, A, Martin, C, Martinez, R, Lacort, M (1995) Effects of estrogens on the redox chemistry of iron - a possible mechanism of the antioxidant action of estrogens. *Steroids* 60, 780-783.

Ryu, S, Suh, B-S, Chang, Y, Kwon, M-J, Yun, KE, Jung, H-S, Kim, C-W, Kim, B-K, Kim, YJ, Choi, Y, Ahn, J, Cho, YK, Kim, K-H, Ahn, Y, Park, H-Y, Chung, EC, Shin, H, Cho, J (2015) Menopausal stages and non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 190, 65-70.

Salazar, M, Hernandez, L, Ramos, AL, Micheletti, KR, Albino, CC, Nakamura Cuman, RK (2011) Effect of teriparatide on induced tooth displacement in ovariectomized rats: A histomorphometric analysis. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 139, E337-E344.

Sankar, P, Zachariah, B, Vickneshwaran, V, Jacob, SE, Sridhar, MG (2015) Amelioration of oxidative stress and insulin resistance by soy isoflavones (from

Glycine max) in ovariectomized Wistar rats fed with high fat diet: The molecular mechanisms. *Experimental Gerontology* 63, 67-75.

Santen, RJ, Boyd, NF, Chlebowski, RT, Cummings, S, Cuzick, J, Dowsett, M, Easton, D, Forbes, JF, Key, T, Hankinson, SE, Howell, A, Ingle, J (2007) Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocrine-Related Cancer* 14, 169-187.

Santen, RJ, Yue, W, Wang, J-P (2015) Estrogen metabolites and breast cancer. *Steroids* 99, 61-66.

Schaefer, EJ (2002) Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 75, 191-212.

Schunkert, H, Danser, AHJ, Hense, HW, Derkx, FHM, Kurzinger, S, Riegger, GAJ (1997) Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 95, 39-45.

Selley, ML, Bartlett, MR, McGuinness, JA, Hapel, AJ, Ardlie, NG, Lacey, MJ (1989) determination of the lipid-peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high-performance liquid-chromatography and combined capillary column gas chromatography negative-ion chemical ionization mass-spectrometry. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 488, 329-340.

Serhan, CN, Chiang, N (2008) Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British Journal of Pharmacology* 153, S200-S215.

Shacter, E (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews* 32, 307-326.

Shao, BH, O'Brien, KD, McDonald, TO, Fu, XY, Oram, JF, Uchida, K, Heinecke, JW (2005) Acrolein modifies apolipoprotein A-I in the human artery wall. *Maillard Reaction: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease* 1043, 396-403.

Shay, KP, Moreau, RF, Smith, EJ, Smith, AR, Hagen, TM (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1790, 1149-1160.

Shimizu, I (2003) Impact of oestrogens on the progression of liver disease. *Liver International* 23, 63-69.

Shimizu, I, Ito, S (2007) Protection of estrogens against the progression of chronic liver disease. *Hepatology Research* 37, 239-247.

Shivers, K-Y, Amador, N, Abrams, L, Hunter, D, Jenab, S, Quinones-Jenab, V (2015) Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Cytokine* 72, 121-129.

Shoeb, M, Yadav, UCS, Srivastava, SK, Ramana, KV (2011) Inhibition of aldose reductase prevents endotoxin-induced inflammation by regulating the arachidonic acid pathway in murine macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 51, 1686-1696.

Siebert, C, Kolling, J, Scherer, EBS, Schmitz, F, da Cunha, MJ, Mackedanz, V, de Andrade, RB, Wannmacher, CMD, Wyse, ATS (2014) Effect of physical exercise on changes in activities of creatine kinase, cytochrome c oxidase and ATP levels caused by ovariectomy. *Metabolic Brain Disease* 29, 825-835.

Simopoulos, AP (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 365-379.

Singh, M, Kapoor, A, Bhatnagar, A (2015) Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-Biological Interactions* 234, 261-273.

Smith, MS, Freeman, ME, Neill, JD (1975) control of progesterone secretion during estrous-cycle and early pseudopregnancy in rat - prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of corpus-luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96, 219-226.

Souza, GF de, Saldanha, GB, de Freitas, RM (2010) Lipoic acid increases glutathione peroxidase, Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures? *Arquivos De Neuro-Psiquiatria* 68, 586-591.

Spradley, JM, Freeman, ME, Wilson, JL, Davis, AJ (2008) The influence of a twice-a-day feeding regimen after photostimulation on the reproductive performance of broiler breeder hens. *Poultry Science* 87, 561-568.

Stadtman, ER (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins – Biochemical-mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* 9, 315-325.

Stanković Milena N., Mladenović Dušan, Ninković Milica, Đuričić Ivana, Šobajić Slađana, Jorgačević Bojan, de Luka Silvio, Vukicevic Rada Jesic, and Radosavljević Tatjana S.. *Journal of Medicinal Food*. February 2014, 17(2): 254-261. doi:10.1089/jmf.2013.0111.

Stein, I, Peleg, Y, Evenram, S, Pines, O (1994) the single translation product of the *fum1* gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *saccharomyces-cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 14, 4770-4778.

Sullivan, JL (1988) iron, plasma antioxidants, and the oxygen radical disease of prematurity. *American Journal of Diseases of Children* 142, 1341-1344.

Sullivan, JL (2004) Is stored iron safe? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 144, 280-284.

Sundaresan, NR, Gupta, M, Kim, G, Rajamohan, SB, Isbatan, A, Gupta, MP (2009) Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *Journal of Clinical Investigation* 119, 2758-2771.

Szczubial, M, Kankofer, M, Bochniarz, M, Dabrowski, R (2015) Effects of Ovariohysterectomy on Oxidative Stress Markers in Female Dogs. *Reproduction in Domestic Animals* 50, 393-399.

Takada, T, Suzuki, H (2010) Molecular mechanisms of membrane transport of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research* 54, 616-622.

Takahashi, M, Tsuboyama-Kasaoka, N, Nakatani, T, Ishii, M, Tsutsumi, S, Aburatani, H, Ezaki, O (2002) Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR alpha activation and ROS production. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 282, G338-G348.

Tamura, K, Yamaguchi, K, Kogo, H (2000) 17 beta-estradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo. *Life Sciences* 66, PL259-PL264.

Tanaka, Y, Kaibori, M, Miki, H, Nakatake, R, Tokuhara, K, Nishizawa, M, Okumura, T, Kwon, AH (2015) Alpha-lipoic acid exerts a liver-protective effect in acute liver injury rats. *Journal of Surgical Research* 193, 675-683.

Tawfik, SH, Mahmoud, BF, Saad, MI, Shehata, M, Kamel, MA, Helmy, MH (2015) Similar and Additive Effects of Ovariectomy and Diabetes on Insulin Resistance and Lipid Metabolism. *Biochemistry Research International*

Theuer, J, Shagdarsuren, E, Muller, DN, Kaergel, E, Honeck, H, Park, JK, Fiebeler, A, Dechend, R, Haller, H, Luft, FC, Schunck, WH (2005) Inducible NOS inhibition, eicosapentaenoic acid supplementation, and angiotensin II-induced renal damage. *Kidney International* 67, 248-258.

Tong, X, Christian, P, Zhao, M, Wang, H, Moreau, R, Su, Q (2015) Activation of hepatic CREBH and Insig signaling in the anti-hypertriglyceridemic mechanism of R-alpha-lipoic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry* 26, 921-928.

Torti, FM, Torti, SV (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99, 3505-3516.

Tripanichkul, W, Sripanichkulchai, K, Duce, JA, Finkelstein, DI (2007) 17 beta-Estradiol reduces nitrotyrosine immunoreactivity and increases SOD1 and SOD2 immunoreactivity in nigral neurons in male mice following MPTP insult. *Brain Research* 1164, 24-31.

Tsukaguchi, H, Tokui, T, Mackenzie, B, Berger, UV, Chen, XZ, Wang, YX, Brubaker, RF, Hediger, MA (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* 399, 70-75.

Valko, M, Leibfritz, D, Moncol, J, Cronin, MTD, Mazur, M, Telser, J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.

Van Rensburg, SJ, Smuts, CM, Hon, D, Kidd, M, van der Merwe, S, Myburgh, C, Oosthuizen, P, Emsley, R (2009) Changes in erythrocyte membrane fatty acids during a clinical trial of eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in schizophrenia. *Metabolic Brain Disease* 24, 659-672.

Victor, VM, Rocha, M, Herance, R, Hernandez-Mijares, A (2011) Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Current Pharmaceutical Design* 17, 3947-3958.

Vogt, W (1995) oxidation of methionyl residues in proteins - tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 93-105.

Vukovic, R, Blazetic, S, Orsolic, I, Heffer, M, Vari, SG, Gajdos, M, Krivosikova, Z, Kramarova, P, Kebis, A, Has-Schoen, E (2014) Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. *Croatian Medical Journal* 55, 218-227.

Walczyk, T, von Blanckenburg, F (2005) Deciphering the iron isotope message of the human body. *International Journal of Mass Spectrometry* 242, 117-134.

Wang, X, Fang, X, Wang, F (2015a) Pleiotropic actions of iron balance in diabetes mellitus. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 16, 15-23.

Wang, Y, Shoemaker, R, Thatcher, SE, Batifoulier-Yiannikouris, F, English, VL, Cassis, LA (2015b) Administration of 17 beta-estradiol to ovariectomized obese female mice reverses obesity-hypertension through an ACE2-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 308, E1066-E1075.

Wang, Y, Viscarra, J, Kim, S-J, Sul, HS (2015c) Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 678-689.

Wang, Y-C, Xu, G-L, Jia, W-D, Han, S-J, Ren, W-H, Wang, W, Liu, W-B, Zhang, C-H, Chen, H (2012) Estrogen Suppresses Metastasis in Rat Hepatocellular Carcinoma through Decreasing Interleukin-6 and Hepatocyte Growth Factor Expression. *Inflammation* 35, 143-149.

Weitzmann, MN, Pacifici, R (2006) Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *Journal of Clinical Investigation* 116, 1186-1194.

Wood, ZA, Schroder, E, Harris, JR, Poole, LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 32-40.

Yager, JD (2015) Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention - A review. *Steroids* 99, 56-60.

Ye, Z-W, Zhang, J, Townsend, DM, Tew, KD (2015) Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1850, 1607-1621.

Yi, X, Xu, L, Hiller, S, Kim, H-S, Nickleit, V, James, LR, Maeda, N (2012) Reduced Expression of Lipoic Acid Synthase Accelerates Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 23, 103-111.


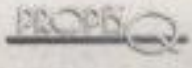
Yogev, O, Naamati, A, Pines, O (2011) Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *Febs Journal* 278, 4230-4242.

Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, et al. (2011) Inhibition of Renin-Angiotensin System Reverses Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Estrogen Deficient Rats. *PLoS ONE* 6 (3): e17437. doi:10.1371/journal.pone.0017437.

Zhang, L, Fujii, S, Kosaka, H (2007) Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. *Journal of Hypertension* 25, 407-414.

Zhou, X, Smith, AM, Failla, ML, Hill, KE, Yu, Z (2012) Estrogen status alters tissue distribution and metabolism of selenium in female rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 532-538.

ANEXOS

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 20137.
Título: Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental de olho seco e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipóico

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

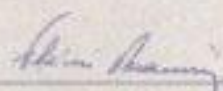
MARA DA SILVEIRA BENFATO - coordenador desde 01/03/2011

Equipe Externa:

Alexey Santos de Andrade - Colaborador desde 01/03/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, ad referendum, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 26 de Julho de 2011



FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética



Laboratório de Nutrição Laudo de Análises

Cliente : Nuvital Nutrientes S/A	Amostra : 9911070366
Solicitação : DEPARTAMENTO TECNICO	Item : Nuvilab CR-1 - 100110002/2
Cidade : Colombo	Fornecedor : Nuvital Nutrientes S/A.
Estado : PR	Controle :
Fone / Fax : (41) 2169-3150	Produtor :
Produção :	Recepção : 22/07/2011
Coleta : 22/07/2011	Liberção : 28/07/2011
Loja : 0022071101 AO 30	

Análise	Unidade	Valor
Umidade	%	11,74
Proteína Bruta	%	23,70
Extrato Etéreo	%	4,01
Fibra Bruta	%	4,59
Resíduo Mineral	%	7,71
Fósforo	%	0,76
Cálcio	%	1,24

Comentários

Cliente

Laboratório

Depto. Técnico

O RESULTADO TEM SEU VALOR RESTRITO À AMOSTRA ANALISADA

Suzane Maria Spiel - CRQ 09403009 - 9ª Região

Estrada da Ribeira, 3.001 Km 03

83408 - 000 Colombo - PR fone/fax (0xx41) 2169-3100

www.nuvital.com.br

09/09/20



DATA: 16/09/2009

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Produto:	ÓLEO DE PEIXE OMEGA-3
Lote n°:	PO9037701
Data de Fab.:	JUL/2009
Data de Val.:	JUL/2012

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
1. Aspecto Físico		
1.1. Descrição	• Líquido Oleoso	DE ACORDO
1.2. Odor	• Característico	DE ACORDO
2. Parâmetros		
2.1. Teor de Peróxidos	• < 5,0 meq O ₂ /Kg	3,2 meq O ₂ /Kg
2.2. Ácidos Graxos Livres	• < 0,5%	0,07%
2.3. Vitamina E	• > 2,0 U.I./g	3,2 U.I./g
3. Teor de Ácidos Graxos tipo Omega-3		
3.1. Ácido Docosahexaenóico (DHA)	• Mínimo 12%	12,8%
3.2. Ácido Eicosapentaenóico (EPA)	• Mínimo 18%	19,7%

LAUDO: APROVADO

As informações contidas neste certificado de análise são corretas e de boa fé, não devem ser consideradas como uma garantia, nem como certificado para isenção de qualquer responsabilidade legal de uso indevido ou manuseio incorreto do produto. Os resultados indicados foram obtidos na análise de amostra representativa e/ou certificada do fornecedor, redida por nossa empresa. O produto mantém suas características de análise desde que manuseado e armazenado corretamente.


 Alexandre C. de Pádua
 Responsável Técnico

Dr. Alexandre C. de Pádua
 Farmacêutico - Bioquímico
 CRF-SP 7.716

RUA GUSTAVO DA SILVEIRA, 1357 - VILA SANTA CATARINA - SÃO PAULO - SP - CEP 04376-900 - FONE: (0xx11) 2188-3737 - FAX (0xx11) 2188-3700
 e-mail: astaralis@sebrafis.com.br - http://www.naturalis.com.br


pharmanostra
 Sintonia com o futuro

CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO: ACIDO ALFA LIPOICO		Pág 1	
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	CHINA/CHINA	DATA DE ANÁLISE:	05/07/2011
LOTE PHARMA NOSTRA:	11062051C	LOTE FABRICANTE:	110106
DATA DE FABRICAÇÃO:	Janeiro/2011	DATA DE VALIDADE:	Janeiro/2013
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM: TEMPERATURA ABAIXO DE 30°C			
OBS 1: FM: C ₇ H ₁₀ O ₂ S ₂			
OBS 2: PM: 206,32			
OBS 3: CAS: 1077-28-7			
DATA DE EMISSÃO:	14/09/2011	NF:	3-156.330
ORDEM FRACIONAMENTO:		2872-11	

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Identificação	HPLC	Positivo	USP - 33
Perda por Dessecação*	≤ 0,2% (3 horas / 10°C à vácuo)	0,15%	USP - 33
Ponto de Fusão*	60,0°C - 62,0°C	61,6°C	USP - 33
Rotação Específica*	-1,0° a +1,0°	+0,10°	USP - 33
Metais Pesados*	≤ 0,001%	< 0,001%	USP - 33
Resíduo por Ignição*	≤ 0,10%	0,03%	USP - 33
Teor (Base Anidra)	99,0% - 101,0%	99,66%	USP - 33
TESTES ADICIONAIS			
Descrição*	Pó cristalino levemente amarelo com odor característico	Pó cristalino levemente amarelo com odor característico	Fabricante
Densidade Aparente*	Informativo (Sem compactação)	0,26 g/mL	Met. Geral FB IV

*Resultados obtidos em análise realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Pharma Nostra (UNIDADE ANAPOLIS). E os dados foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopéico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCG Pharma Nostra)

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Reprovado


 Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade
 Daniela Rocha Barbosa - CRF-GO N° 7003


 Responsável Técnico
 Amin Gabriel Gebim - CRF-GO N° 1829

Magistral 0800 707 07 06
Indústria 0800 727 48 80

CURRICULUM VITAE

ÁRTUR KRUMBERG SCHÜLLER

Nome em citações bibliográficas

SCHÜLLER, A. K

Formação acadêmica/titulação

2014 - Atual Mestrado em andamento em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Orientador: Mara da Silveira Benfato.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2008 – 2012 Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Orientador: Mara da Silveira Benfato.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Formação Complementar

2011 – 2011 Operação do Sistema HPLC. (Carga horária: 20h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

2012 – 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 20

2010 – 2011 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20

2009 – 2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20

2008 – 2009 Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Voluntário, Carga horária: 20

Projetos de pesquisa

2008 – Atual Defesas antioxidantes e dano oxidativo em espécies patogênicas de *Candida não-albicans*

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ártur Krumberg Schüller - Integrante / Fernanda Schäfer Hackenhaar - Integrante / Paulo Vinicius Gil Alabarse - Integrante / Mara Sillveira Benfato - Integrante / Maxwell Adriano Abegg - Coordenador / tiago Boeira Salomon - Integrante / Marcus Fabiano de Almeida Mendes - Integrante.

2008 – Atual Estresse Oxidativo e Hormônios Esteróides na Associação entre Apnéias-Hipopnéias Obstrutivas do Sono e Doença Aterosclerótica Coronariana

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ártur Krumberg Schüller - Integrante / Cristini Klein - Coordenador / Fernanda Schäfer Hackenhaar - Integrante / Tássia machado Medeiros - Integrante / Denis Martinez - Integrante / Mara Sillveira Benfato - Integrante.

2005 – Atual Determinação da expressão e atividade enzimática das defesas antioxidantes em ratos ao longo do envelhecimento

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ártur Krumberg Schüller - Integrante / Fernanda Schäfer Hackenhaar - Integrante / Paulo Vinicius Gil Alabarse - Coordenador / Mara Sillveira Benfato - Integrante / Tiago Boeira Salomon - Integrante.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. VERONA, CLÉBER; HACKENHAAR, FERNANDA S.; TEIXEIRA, CASSIANO; MEDEIROS, TÁSSIA M.; ALABARSE, PAULO V.; SALOMON, TIAGO B.; SHÜLLER, ÁRTUR K.; MACCARI, JUÇARA G.; CONDESSA, ROBLEDO LEAL; OLIVEIRA, ROSELAINÉ P.; RIOS VIEIRA, SILVIA R.; BENFATO, MARA S.. Blood markers of oxidative stress predict weaning failure from mechanical ventilation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine (Print)*, v. 19, p. 1253-1261, 2015; Meio de divulgação: Digital. Homepage: ; Série: 6; ISSN/ISBN: 15821838.
2. SILVA, ANA CAROLINA A.; SALOMON, TIAGO B.; BEHLING, CAMILE SAUL; PUTTI, JORDANA; HACKENHAAR, FERNANDA S.; ALABARSE, PAULO V. G.; SCHÜLLER, ARTUR K.; BENFATO, MARA S.. Oxidative stress in the kidney of reproductive female rats during aging. *Biogerontology*

- (Dordrecht), v. 14, p. 411-422, 2013; Meio de divulgação: Digital. Homepage: ; Série: 4; ISSN/ISBN: 13895729.Citações:1
3. SALOMON, TIAGO BOEIRA; HACKENHAAR, FERNANDA SCHÄFER; ALMEIDA, ANA CAROLINA; SCHÜLLER, ARTHUR KRUMBERG; GIL ALABARSE, PAULO V.; EHRENBRINK, GUILHERME; BENFATO, MARA SILVEIRA . Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity. *Experimental Gerontology*, v. 48, p. 940-946, 2013; Meio de divulgação: Digital. Homepage: ; Série: 9; ISSN/ISBN: 05315565.Citações:2|3
 4. ABEGG, MAXWEL ADRIANO; ALABARSE, PAULO VINÍCIUS GIL; SCHÜLLER, ÁRTUR KRUMBERG; BENFATO, MARA SILVEIRA. Glutathione levels in and total antioxidant capacity of *Candida sp.* cells exposed to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso)*, v. 45, p. 620-626, 2012; Meio de divulgação: Digital. Homepage: ; Série: 5; ISSN/ISBN: 00378682.Citações:1|2
 5. 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, 2011; Meio de divulgação: Digital. Homepage: ; Série: 4; ISSN/ISBN: 05315565.Citações:5|7
 6. ALABARSE, PAULO V.G.; BENFATO, MARA S.; MEDEIROS, TÁSSIA M.; SALOMON, TIAGO B.; EHRENBRINK, GUILHERME; HACKENHAAR, FERNANDA S.; SCHÜLLER, ARTUR K.. Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. *Experimental Gerontology*, v. 46, p. 773-780, 2011; Meio de divulgação: Digital. Homepage: ; Série: 10; ISSN/ISBN: 05315565.Citações:1|2

Resumos publicados em anais de congressos

1. SILVA, A. C. A. ; SALOMON, TIAGO B. ; SCHULLER, A.K. ; HACKENHAAR, F. S. ; PUTTI, J. ; BEHLING, C. S. ; BENFATO, M. S. . Estresse Oxidativo em Rins de Ratas Reprodutoras ao Longo do Envelhecimento.. In: XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012, Porto Alegre. Reunião Anual do PPGBCM, 2012. Referências adicionais: Classificação do evento: Local; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Digital.
2. SALOMON, TIAGO B. ; HACKENHAAR, F. S. ; SILVA, A. C. A. ; PUTTI, J. ; SCHULLER, A.K. ; BENFATO, MARA S. . Avaliação do estresse oxidativo em gônadas de ratos machos com e sem atividade reprodutiva. In: Reunião Anual do PPGBCM, 2012, Porto Alegre. Reunião Anual do PPGBCM, 2012. Referências adicionais: Classificação do evento: Local; Brasil/ Português.
3. ALABARSE, PAULO V.G. ; SALOMON, TIAGO B. ; MEDEIROS, T. M. ; HACKENHAAR, F. S. ; SCHULLER, A.K. ; BENFATO, MARA S. . Oxidative damage and non-enzymatic antioxidant defenses in the kidney of reproductive male rats during aging. In: VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro/SP. Proceedings of VII Meeting of the SFRBM South

- American Group, 2011. Referências adicionais: Classificação do evento: Internacional; Brasil/ Português.
4. SALOMON, TIAGO B. ; ALABARSE, P. V. G. ; HACKENHAAR, F. S. ; SCHULLER, A.K. ; BENFATO, MARA S. . Catalase(CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) in naive and experienced male rats kidneys. In: VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro/SP. Proceedings of VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011.Referências adicionais: Classificação do evento: Internacional; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Impresso.
 5. SEMZEZEM, C. ; Abegg, M. A ; HACKENHAAR, F. S. ; MEDEIROS, T. M. ; SCHULLER, A.K. ; ALABARSE, PAULO V.G. ; SALOMON, TIAGO B. ; BENFATO, MARA S. . In vitro response of Candida sp. clinical isolates to oxidative stress. In: VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro/SP. Proceedings of VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011. Referências adicionais: Classificação do evento: Internacional; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Impresso.
 6. VERONA, C. ; SALOMON, TIAGO B. ; MEDEIROS, T. M. ; HACKENHAAR, F. S. ; SCHULLER, A.K. ; Teixeira, C. ; Vieira, S. R. R. ; BENFATO, M. S. . Association of ventilation and its weaning to oxidative stress. In: VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro/SP. Proceedings of VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011.Referências adicionais: Classificação do evento: Internacional; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Impresso.
 7. ALABARSE, PAULO V.G. ; HACKENHAAR, FERNANDA S. ; MEDEIROS, T. M. ; MENDES, M. F. A. ; VIACAVA, P. R. ; SCHULLER, A.K. ; SALOMON, TIAGO B. ; EHRENBRINK, GUILHERME ; BENFATO, M. S. . 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, 2010. Referências adicionais: Classificação do evento: Internacional; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Impresso.
 8. ALABARSE, PAULO V.G. ; HACKENHAAR, FERNANDA S. ; MEDEIROS, T. M. ; MENDES, M. F. A. ; VIACAVA, P. R. ; SCHULLER, A.K. ; SALOMON, TIAGO B. ; EHRENBRINK, GUILHERME ; BENFATO, M. S. . Estresse Oxidativo e envelhecimento no cérebro de ratos machos reprodutores. In: XII Reunião Anual do PPGBCM, 2010, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2010. Referências adicionais: Classificação do evento: Local; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Impresso.
 9. SCHÜLLER, Á. K.; Klein, C. ; HACKENHAAR, F. S. ; ALABARSE, P. V. G. ; SURIS, F. M. ; MEDEIROS, T. M. ; MARTINEZ, D. ; BENFATO, M. S.. Malondialdehyde (MDA) and Vitamin C levels in non-smokers with Coronary Artery Disease (CAD). In: VI Meeting of SFRBM South American Group, 2009, Santiago. Congress book. Santiago: Salviat impressores, 2009. v. 211. p. 211-211. Palavras-chave: Oxidative estress; Vitamim C; Coronary artery disease. Referências adicionais: Classificação do evento: Internacional; Chile/ Inglês; Meio de divulgação: Vários.

10. MENDES, M. F. A. ; Abegg, M. A ; MEDEIROS, T. M. ; HACKENHAAR, F. S. ; ALABARSE, P. V. G. ; SALOMON, T. B. ; SCHÜLLER, Á. K. ; BENFATO, M. S. . Protein and Lypid Damage Sensitive in Candidas sp.. In: Free Radicals and Antioxidants, 2009, Santiago. Free Radicals and Antioxidants. Santiago: Salviat Impresores, 2009. p. 140-140. Referências adicionais: Classificação do evento: Internacional; Chile/ Inglês; Meio de divulgação: Vários.
11. SCHÜLLER, Á. K.; HACKENHAAR, F. S. ; MENDES, M. F. A. ; VIACAVA, P. R. ; ALABARSE, P. V. G. ; BENFATO, M. S. . 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, 2009. Referências adicionais: Classificação do evento: Local; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Digital.
12. MENDES, M. F. A. ; SCHÜLLER, Á. K. ; HACKENHAAR, F. S. ; Abegg, M. A ; ALABARSE, P. V. G. ; MEDEIROS, T. M. ; SALOMON, T. B. ; BENFATO, M. S. . SENSIBILIDADE A DANOS EM PROTEÍNA E LIPÍDIOS EM CANDIDAS SP. In: XXI Salão de Iniciação Científica, 2009, Porto Alegre. XXI Salão de Iniciação Científica - Resumos, 2009. Referências adicionais: Classificação do evento: Local; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Digital.
13. Abegg, M. A ; ALABARSE, P. V. G. ; HACKENHAAR, F. S. ; SALOMON, T. B. ; MENDES, M. F. A. ; SCHÜLLER, Á. K. ; MEDEIROS, T. M. ; BENFATO, M. S. . 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, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2009. p. 87-87.
14. SCHÜLLER, Á. K.; VIACAVA, P. R. ; HACKENHAAR, F. S. ; ALABARSE, P. V. G. ; MENDES, M. F. A. ; BENFATO, M. S. . NÍVEIS DE DANO OXIDATIVO EM PROTEÍNAS E ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE EM RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre. XXI Salão de Iniciação Científica - Resumos, 2009. p. 14-14. Referências adicionais: Classificação do evento: Local; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Vários.