

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

**ANÁLISE DO STATUS OXIDATIVO NO PULMÃO DE RATAS WISTAR
FÊMEAS REPRODUTORAS E NÃO REPRODUTORAS AO LONGO DO
ENVELHECIMENTO**

Dissertação de Mestrado

Vanessa Krüger Engers

Porto Alegre

2016

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

**ANÁLISE DO STATUS OXIDATIVO NO PULMÃO DE RATAS WISTAR
FÊMEAS REPRODUTORAS E NÃO REPRODUTORAS AO LONGO DO
ENVELHECIMENTO**

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

Aluna: Vanessa Krüger Engers
Orientadora: Dr^a Mara da Silveira Benfato

Porto Alegre
2016

Aos meus,

Jeovane, Adriana, Robson e Amanda.

ÍNDICE

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Estresse Oxidativo	8
1.1.1. Espécies reativas e radicais livres	8
1.1.2. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	10
1.2. Envelhecimento.....	12
1.2.1. Envelhecimento e Estresse oxidativo.....	13
1.3. Reprodução	14
1.3.1. Reprodução e Estresse Oxidativo.....	15
1.4. Pulmão.....	17
1.4.1. Aspectos Gerais	17
1.4.2. Pulmão e Envelhecimento	19
1.4.3. Pulmão e Estresse Oxidativo	20
1.4.4. Pulmão e Reprodução	22
2. OBJETIVO.....	23
2.1. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
Artigo científico	245
4. MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTAR	44
5. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR	45
6. CONCLUSÃO	51
7. PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS	53
8. ANEXOS.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – catalase;

ERNs – espécies reativas de nitrogênio;

EROs - espécies reativas de oxigênio;

FSH – hormônio folículo estimulante;

GMP – monofosfato de guanosina cíclico;

GPx – glutaciona peroxidase;

GSH – glutaciona reduzida;

GSSG – glutaciona oxidada;

GST – glutaciona S-transferase;

LH – hormônio luteinizante;

MDA – malondialdeído;

NADPH – Fosfato dinucleotideo nicotinamida e adenina

NO – óxido nítrico;

NOS – óxido nítrico sintase;

Prxs – peroxirredoxinas;

SOD – superóxido dismutase;

TBARS – ácido tiobarbitúrico

RESUMO

O envelhecimento é um processo multifatorial, individual e complexo que reduz as funções orgânicas, a fertilidade e o tempo de vida. A reprodução é um evento natural que requer uma grande demanda energética, aumentando as taxas metabólicas e atividade mitocondrial principalmente em fêmeas durante a gestação, lactação e mudanças hormonais. Ambos os processos podem modificar as funções normais do organismo, o que pode levar a um desequilíbrio no estado oxidativo. Compreender a progressão do envelhecimento e o custo da reprodução é de fundamental importância na evolução das histórias de vida. Para isso, foram analisados parâmetros de estresse oxidativo para verificar os efeitos da reprodução ao longo do envelhecimento no pulmão de ratas Wistar fêmeas. Foram mensuradas as atividades de glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e consumo de peróxido de hidrogênio, bem como marcadores de dano, como carbonilação de proteínas, medida indireta de óxido nítrico e MDA. Também foram medidos os níveis de moléculas antioxidantes como glutathione, vitamina C e E. Foi traçado um perfil oxidativo nas idades de 3, 6, 12 e 24 meses. Os animais foram agrupados de acordo com o estado reprodutivo: reprodutores e não reprodutores, considerados reprodutores quando os casais tiveram a primeira ninhada. O estudo mostrou que a reprodução modificou alguns parâmetros antioxidantes aos 6, 12 e 24 meses. Animais não reprodutores mostraram maior atividade de SOD, consumo de peróxido de hidrogênio e níveis de vitamina E aos 24 meses comparados com animais reprodutores da mesma idade. A atividade de GPx foi maior no grupo de não reprodutores aos 6, 12 e 24 meses comparados com animais reprodutores da mesma idade. Os níveis de glutathione total em animais reprodutores diminuíram aos 12 meses de idade comparados a animais não reprodutores da mesma idade. Os níveis de nitrito e nitrato foram maiores em reprodutores de 24 meses comparados a não reprodutores da mesma idade. Não encontramos diferenças significativas entre reprodutores e não reprodutores na atividade de GST demonstrando que não houve influência da reprodução sobre este parâmetro. Os níveis de carbonil, que representam dano a proteínas, foi progressivamente maior de acordo com o avanço da idade, diferentemente da atividade de GST que apresentou perfil contrário, com atividade progressivamente menor de acordo com o avanço da idade. Neste estudo, demonstramos que as defesas antioxidantes no pulmão de ratas fêmeas foram maiores em indivíduos não reprodutores do que em reprodutores e o dano apresentou o mesmo perfil em ambos os grupos. Esses resultados indicam uma possibilidade de o organismo ser capaz de lidar com o custo da reprodução, se adaptando ao estresse oxidativo resultante.

Palavras-chave: Envelhecimento, Custo da reprodução, Pulmão, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Aging is a multifactorial, individual and complex process that reduces organic functions, fertility and lifespan. Reproduction is a natural event that requires a great demand of energy increasing metabolic rate and mitochondrial activity mainly in female because of pregnancy, lactation and hormonal changes. Both processes may change the normal function of organism which can lead to an imbalance in oxidative state. Understand the progression of aging and the cost of reproduction is of fundamental importance in life-history evolution. For this, we have analyzed oxidative stress parameters to verify the effects of reproduction during aging in lungs of female Wistar rats. We measured the activity of glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, consumption of hydrogen peroxide. Oxidative damage parameters like: protein carbonylation, nitrite and nitrate levels and MDA. We measured antioxidant biomolecules like glutathione, vitamin C and E levels. We traced oxidative status at ages 3, 6, 12, and 24 months. Animals were grouped according to reproductive experience: breeders and non-breeders, considering breeders when they had the first litter. The study showed that reproduction modified antioxidant parameters at 6, 12 and 24 months. Non-breeders animals showed higher SOD activity, consumption of hydrogen peroxide and vitamin E levels at 24 months compared to breeders of the same age. The GPx activity was higher in non-breeders group at 6, 12 and 24 months compared to breeders of the same age. Total glutathione levels decrease in breeders at 12 months of age. The nitrite and nitrate levels were higher in breeders at 24 months of age. We found no difference between breeders and non-breeders in GST activity and carbonyl levels showing that reproduction is not affecting these parameters but aging. The carbonyl levels that represent protein damage were progressive higher according age. Differently GST activity decrease by age. Here we demonstrate that the antioxidant defenses in lungs of female rats were higher in non-breeders than breeders and the damage show the same profile in both groups. These results may conclude that organism is able to deal with the cost of reproduction adapting to oxidative stress.

Keywords: Aging, Cost of reproduction, Lungs, Oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse Oxidativo

1.1.1. Espécies reativas e radicais livres

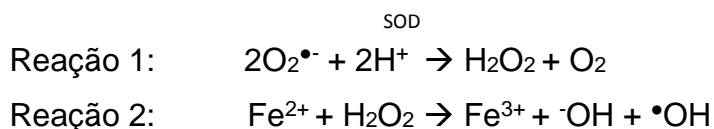
Espécie reativa é um termo amplo, que inclui os radicais livres e outros derivados não-radicalares como o ozônio e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Radical livre é qualquer espécie química (átomo, íon ou molécula) que possui um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa. A presença de um elétron desemparelhado aumenta sua reatividade. Embora o termo mais difundido na biologia seja “espécies reativas de oxigênio” (EROs), muitos são os tipos de espécies reativas que podem ser formadas nos sistemas vivos (Halliwell and Gutteridge, 2015).

Nos organismos aeróbicos, espécies reativas (ERs) são produzidas como um subproduto do metabolismo normal devido ao vazamento de elétrons do oxigênio durante sua passagem pela cadeia respiratória. As espécies reativas de oxigênio (EROs) mais importantes biologicamente são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), os radicais hidroxil (OH^{\bullet}), peroxil (ROO^{\bullet}), alcoxil (RO^{\bullet}) e hidroperoxil (HO_2^{\bullet}) (Rizzo *et al.*, 2012a).

O $O_2^{\bullet-}$ é o primeiro intermediário da reação de redução do oxigênio à água, e a partir dele serão formadas as outras EROs. Além da cadeia transportadora de elétrons, outros sistemas enzimáticos são responsáveis pela formação de ERs dentro da célula, tais como enzimas do citocromo P450 e a NADPH oxidase. Radicais de carbono são intermediários da peroxidação lipídica, moléculas contendo nitrogênio podem formar espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como o óxido nítrico (NO^{\bullet}), além de outros elementos, como cloro (Cl), bromo (Br) e enxofre (S) (Halliwell and Gutteridge 2015).

O ânion radical superóxido é um radical que possui baixa reatividade com a maioria das moléculas biológicas, mas apresenta uma reatividade maior com grupamentos tiol e com metais, como cobre, manganês e ferro. Este radical é capaz de interagir com grupamentos ferro-enxofre de proteínas inativando-as

(Abreu e Cabelli, 2010). A dismutação do superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD) leva a formação de H₂O₂ (reação 1), espécie reativa com alta capacidade de se difundir pelos tecidos, que reage com metais, principalmente ferro, na chamada reação de Fenton (reação 2):



Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico tem grande importância biológica, pois pode atravessar membranas e se difundir rapidamente dentro das células. Seu papel fisiológico principal é atuar como vasodilatador, sendo sintetizado nas células endoteliais vasculares liga-se à guanilato ciclase, ativando-a. Assim mais GMP (monofosfato de guanosina) cíclico é produzido, diminuindo as concentrações de íons cálcio (Ca²⁺) livres e relaxando o músculo endotelial, dilatando os vasos sanguíneos e diminuindo a pressão sanguínea (Haliwell and Gutteridge 2015).

O óxido nítrico é sintetizado nos seres vivos pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a qual converte L-arginina em NO• e L-citrulina. O NO• reage com o O₂^{•-} (reação 3) produzindo o peroxinitrito (ONOO⁻), principal espécie reativa de nitrogênio com importância biológica (Haliwell and Gutteridge 2015).



Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) podem causar dano em moléculas biológicas através de dois tipos de reação, a nitração e a nitrosilação. A nitração acontece pelo ataque de um grupo tiol ou metal por um grupamento nitroso (NO) e essa reação é normalmente reversível. A nitrosilação acontece através do ataque por um grupamento nitro (-NO₂) a um composto biológico. Esta reação é irreversível.

1.1.2. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante total do organismo. O dano oxidativo pode ser definido como qualquer modificação molecular, reversível ou não, com efeito deletério, causado por espécies reativas a moléculas biológicas, como lipídios, proteínas e DNA. Porém, as células, em condições aeróbicas, desenvolveram um sistema de defesa contra as ERs, conhecido como sistema de defesa antioxidante (Speakman e Selman, 2011). Haliwell and Gutteridge, 2015, definem antioxidante como: “qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo”. Esse sistema é composto basicamente por vitaminas (como a vitamina C e E), metais como o selênio e o zinco, que atuam em conjunto com enzimas, a glutathione (GSH), que é o principal antioxidante não enzimático da célula e também enzimas específicas, as chamadas defesas antioxidantes enzimáticas. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione s-transferase (GST) e a glutathione reductase (GR) (Beguel *et al.*, 2013). Além destas enzimas, existem famílias de proteínas que exercem importante papel na sinalização redox na célula: as peroxirredoxinas, glutarredoxinas e tioredoxinas.

Peroxirredoxinas (Prxs) são uma família de proteínas extremamente eficaz na eliminação de peróxidos. As Prxs apresentam uma série de propriedades intrigantes que as distinguem de antioxidantes convencionais, incluindo a susceptibilidade à inativação por hiperoxidação na presença de peróxido em excesso e a capacidade de formar complexos de estruturas oligoméricas. Estas propriedades, em conjunto com uma elevada abundância celular e reatividade com H_2O_2 levaram à especulação de que Prxs teriam uma função como sensores redox transmitindo sinais como parte da resposta celular ao estresse oxidativo. Organismos multicelulares expressam várias Prxs diferentes que podem ser categorizadas por sua distribuição intracelular. Nos mamíferos, Prx3 e Prx5 são direcionadas para a matriz mitocondrial. A mitocôndria é a principal fonte de H_2O_2 e esta espécie reativa está implicada em danos associados ao envelhecimento. O

H₂O₂ também pode atuar como um segundo mensageiro, e está ligado aos eventos de sinalização na mitocôndria, incluindo a indução de apoptose. Pela abundância com que é encontrada, Prx3 é responsável por cerca de 90% da detoxificação do H₂O₂ na matriz mitocondrial (Cox *et al.*, 2010).

As superóxido dismutases são metaloenzimas altamente eficientes na remoção catalítica do O₂^{•-} (Haliwell and Gutteridge 2007). Em mamíferos existem três isoformas desta enzima: a CuZnSOD - citosólica, descoberta por McCord e Fridovich, em 1969, a qual contém em seu sítio ativo um átomo de cobre (McCord e Fridovich, 1969a). A MnSOD – mitocondrial, enzima de estrutura tetramérica que contém um átomo de manganês em seu sítio ativo (Keele *et al.*, 1970). E mais recentemente, Marklund, em 1982, descobriu uma forma extracelular da enzima, conhecida como EC-SOD ou SOD3, a qual também contém um átomo de cobre em seu sítio ativo (Marklund *et al.*, 1982). Essas três formas da enzima catalisam a dismutação do O₂^{•-} em oxigênio e H₂O₂.

O H₂O₂ pode ser então removido pela enzima CAT, localizada no interior dos peroxissomos, que catalisa a decomposição direta do H₂O₂ a O₂. Em algumas condições pode ocorrer vazamento da enzima para o citosol, provavelmente por lise do peroxissomo, que possui uma membrana frágil. A CAT é uma enzima tetramérica que contém um grupamento Fe^{III}-heme em seu sítio ativo (Haliwell and Gutteridge 2015).

As glutatona peroxidases são uma família de enzimas capazes de remover o H₂O₂ e outros peróxidos através do acoplamento da redução do peróxido a H₂O à oxidação da glutatona reduzida (GSH) (Reação 4).



Existem pelo menos quatro isoformas desta enzima. Uma é a enzima citosólica, chamada também de GPx1. O plasma de mamíferos contém uma outra isoforma, uma glicoproteína chamada de GPx3, que também é encontrada em outros fluidos extracelulares e origina-se principalmente do rim. A GPx3 também pode utilizar, além da glutatona, outro tipo de substrato, a tioredoxina. Existe

ainda uma isoforma encontrada no trato gastrointestinal, a GPx2 ou GI-GPx e uma quarta, a GPx4 a única que reduz não apenas peróxidos orgânicos sintéticos e H₂O₂, mas também hidroperóxidos de colesterol e ácidos graxos (Haliwell and Gutteridge 2015).

A molécula de glutathione também pode estar envolvida no metabolismo de xenobióticos através da conjugação com a enzima detoxificadora GST. Outra função da GST é a degradação de peróxidos orgânicos, porém diferencia-se das outras peroxidases por não possuir atividade sobre o H₂O₂ (Haliwell and Gutteridge 2015).

Além disso, a glutathione é o principal antioxidante não enzimático endógeno intracelular, estando presente em concentrações semelhantes a da glicose em hepatócitos (Vina *et al.*, 1978). É um sequestrador de radicais livres em condições fisiológicas, além de participar na regeneração dos antioxidantes ácido ascórbico e tocoferol (Monostori *et al.*, 2009).

1.2. Envelhecimento

O envelhecimento é caracterizado globalmente como um processo complexo, universal, irreversível, de natureza multifatorial, com declínio progressivo das funções biológicas, sendo afetado direta e indiretamente tanto por fatores intrínsecos, como extrínsecos (Eugenia Matzkin *et al.*, 2016). Durante o envelhecimento há o aumento da vulnerabilidade do organismo aos desafios do ambiente e ampliação do risco de desenvolvimento de doenças e morte (Kirkwood, 2005).

O envelhecimento biológico envolve uma variedade de alterações celulares, moleculares e estruturais baseadas em diversos mecanismos, tendo como aspectos principais a perda da capacidade de proliferação e replicação celular, a redução, até a total abstenção da fertilidade e o desequilíbrio dos sistemas orgânicos com consequente perda de função (Jeyapalan e Sedivy, 2008; Karrasch *et al.*, 2008). Apesar de estar normalmente ligado à idade cronológica, o envelhecimento biológico pode ocorrer em diferentes estágios da vida, sendo

parcialmente independente da idade cronológica (Karrasch *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2015)

Tendo vista a natureza complexa do envelhecimento, diversas teorias foram desenvolvidas na tentativa de explicar os mecanismos deste processo. Alguns pesquisadores acreditam que uma pequena quantidade de mecanismos deletérios e randômicos são capazes de explicar o caráter degenerativo da senescência, outros optaram por teorias de envelhecimento programado, onde o envelhecimento seria o destino final das vias de desenvolvimento (Beckman e Ames, 1998). Em meio a estas ideias, surgiu em 1956, postulada por Denhan Harman, a teoria dos radicais livres no envelhecimento.

1.2.1. Envelhecimento e Estresse oxidativo

A teoria dos radicais livres no envelhecimento sugere que as espécies reativas produzidas durante a respiração aeróbica causam danos oxidativos cumulativos que culminam com o envelhecimento e a morte (Harman, 1956).

Harman (1956) criou a hipótese de que a geração de radicais de oxigênio endógenos ocorre como subproduto de reações enzimáticas do equilíbrio redox. Enzimas estas que estariam envolvidas na direta utilização do oxigênio molecular, particularmente aquelas que contêm ferro. Estes traços de ferro e outros metais poderiam catalisar reações oxidativas e disparar reações peroxidativas em cadeia.

A teoria ganhou credibilidade com a descoberta da SOD em 1969, a qual trouxe a primeira evidência da produção do ânion superóxido *in vivo* e consequente elucidação do elaborado mecanismo de defesa antioxidante (Mccord e Fridovic.I, 1969b). O uso da SOD como ferramenta para localização de sítios subcelulares de formação do ânion superóxido, levou a descoberta de que a mitocôndria é a principal fonte de oxidantes endógenos (Vina *et al.*, 2003).

Com isso, foi possível perceber que o simples consumo de energia natural do organismo é responsável pela produção expressiva de espécies reativas que, quando não neutralizadas pelas defesas antioxidantes, são capazes de causar

danos a biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA, que culminam com o envelhecimento.

1.3. Reprodução

Ratas fêmeas, como a maioria dos mamíferos placentários, apresentam ciclicidade reprodutiva, caracterizada pela ocorrência regular do ciclo estral. Durante este ciclo, ocorrem inúmeras alterações sequenciais bem definidas na histologia, fisiologia e citologia do trato reprodutivo, iniciados e regulados pelo eixo hipotalâmico-pituitário-ovariano (Marcondes *et al.*, 2002; De La Iglesia e Schwartz, 2006)

O ciclo estral consiste em quatro estágios: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II). Pelo fato de os ratos serem constantemente poliestrais, ou seja, ciclaram constantemente durante o ano inteiro, o diestro é imediatamente seguido pelo proestro do próximo ciclo (Goldman *et al.*, 2007; Paccola *et al.*, 2013). O anestro, período de quiescência reprodutiva entre ciclos estrais, não ocorrem com frequência em animais saudáveis. O ciclo estral cessa apenas durante a gestação e a lactação, apesar de o ciclo fértil ocorrer novamente em 24 horas após o nascimento das ninhadas (Sosa *et al.*, 2004).

A maturidade sexual em ratas fêmeas ocorre normalmente entre 30 e 50 dias de idade. O primeiro ciclo estral inicia aproximadamente uma semana após a abertura vaginal e recorre regularmente a cada 4 ou 5 dias em uma proporção variável dependendo do tempo de vida e da linhagem de cada animal. A ovulação ocorre a partir do início do proestro e termina ao final do estro. O ciclo perdura normalmente, em média, por 15 a 18 meses de idade (Mandl, 1951; Spornitz *et al.*, 1999; Paccola *et al.*, 2013).

Durante o ciclo reprodutivo, prolactina, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante) estão baixos e aumentam no final da fase de proestro. Os níveis de estradiol começam a aumentar no metaestro, atingindo seu pico máximo durante o proestro e retornando aos níveis basais no estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o metaestro e diestro com

decréscimo subsequente, seguido de um segundo pico ao final do proestro (Mandl, 1951; Spornitz *et al.*, 1999)

Para avaliar o estágio do ciclo estral em fêmeas é realizada a avaliação microscópica da secreção vaginal. A caracterização de cada fase é baseada na proporção entre três tipos celulares observados: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos (Mandl, 1951; Yoshida *et al.*, 2009; Paccola *et al.*, 2013).

Durante o proestro, o nível de estrogênio aumenta e os folículos ovarianos crescem rápido. A ovulação ocorre durante a noite do estro de 10-12h após o aparecimento do LH. Na ausência de cópula no momento da ovulação, o corpo lúteo é transientemente funcional e secreta uma pequena quantidade de progesterona (Westwood, 2008). Entretanto, em fêmeas copuladas, 90% dos óvulos são fertilizados pelas células espermáticas do macho durante a terceira hora de ovulação e a vida do corpo lúteo é estendida até a primeira metade da gestação. A produção de progesterona começa na placenta durante a segunda metade da gestação (Eckel, 1999; Yoshida *et al.*, 2009)

A gestação e a lactação envolvem algumas das mais pronunciadas mudanças fisiológicas no organismo de mamíferos adultos. Estas mudanças afetam muitos sistemas: novos hormônios são sintetizados, o consumo de alimento aumenta enquanto a atividade do sistema digestório diminui, a composição do sangue é alterada, volume e fluxo sanguíneo aumentam e a capacidade cardíaca também se modifica (Wade e Schneider, 1992; Mover e Ar, 1995). O sistema respiratório fica alterado e a demanda energética do organismo cresce em paralelo à evolução da gestação e ainda mais, durante o processo de lactação, onde o gasto energético para produção de um leite nutritivo e o cuidado parental cresce significativamente, dando base para a teoria do custo da reprodução e o aumento da suscetibilidade destes organismos ao estresse oxidativo (Garratt *et al.*, 2013).

1.3.1. Reprodução e Estresse Oxidativo

Desde que os processos de desenvolvimento e reprodução são acompanhados de diversas mudanças no metabolismo e no consumo de energia,

também são produzidos subprodutos em uma escala extraordinária. Entre os subprodutos estão as espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são inevitavelmente geradas durante processos fisiológicos onde há o consumo de oxigênio (Fujii *et al.*, 2005).

A gestação é uma condição que exhibe um grande aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo, visto que é um processo caracterizado por mudanças dinâmicas em múltiplos sistemas do organismo resultando no aumento do consumo de oxigênio basal e modificações no uso de substratos energéticos por diferentes órgãos, incluindo a unidade feto-placenta (Casanueva e Viteri, 2003)

A placenta é rica em mitocôndrias e quando está completamente desenvolvida consome cerca de 1% da taxa metabólica basal do organismo. Também é altamente vascularizada e exposta a altas pressões de oxigênio materno. Estas características explicam, em partes, a geração de superóxido, visto que, em torno de 5% dos elétrons na cadeia respiratória mitocondrial é perdido para fora das mitocôndrias (Pichaud *et al.*, 2013)

O óxido nítrico também é produzido pela placenta e junto com outras espécies de nitrogênio contribui para um potencial estresse oxidativo na presença de metais de transição. Ainda, a placenta é rica em macrófagos, o que aumenta a produção de espécies reativas, incluindo espécies reativas de Cloro, onde o ferro livre está implicado (Rosselli *et al.*, 1998; Dotsch *et al.*, 2001)

Durante a gestação, o sistema imune está relativamente reduzido, provavelmente em decorrência dos altos níveis de estrogênio, o que pode levar facilmente a processos infecciosos. Os macrófagos presentes na placenta, na presença da infecção são fontes de óxido nítrico, fatores de necrose tumoral e outras citocinas inflamatórias que induzem alterações mitocondriais e consequente produção de espécies reativas (Casanueva e Viteri, 2003; Garratt *et al.*, 2013).

Estas espécies reativas geradas durante o processo de gestação podem ser produzidas também pelo trofoblasto. Alguns estudos demonstram a expressão da enzima NADPH oxidase (NOX) no trofoblasto e no epitélio vascular da placenta. Estas enzimas são, provavelmente, a maior fonte de geração de

superóxido neste sítio. Tendo em vista a produção simultânea de superóxido e óxido nítrico na placenta, pode haver ainda a interação entre eles levando a produção de peroxinitrito (Myatt, 2006).

A lactação, também parte do ciclo reprodutivo, é considerada o período de maior demanda energética da vida de uma fêmea, caracterizado pelo aumento dramático de energia e nutrientes necessários para a produção do leite. Com este aumento significativo da taxa metabólica ocorre a adaptação celular, em nível mitocondrial, na tentativa de suprir a demanda energética e a distribuição de substratos para os órgãos. Estas mudanças acarretam o aumento da respiração mitocondrial e a consequente produção de espécies reativas (Pichaud *et al.*, 2013).

Tendo em vista as mudanças proeminentes durante o período reprodutivo das fêmeas e o aumento da suscetibilidade destes organismos ao estresse oxidativo, as teorias de história de vida vêm tentando compreender os custos da reprodução e de que maneira as espécies reativas e as defesas antioxidantes atuam durante este período e de que forma contribuem para o desenvolvimento de doenças e a progressão do envelhecimento.

1.4. Pulmão

1.4.1. Aspectos Gerais

O pulmão é considerado um órgão ambiental, visto que é o sistema com maior superfície de exposição a agentes externos. Ele é único em seu tamanho, formação, complexidade e principalmente quanto à interface de interação com materiais inalados. É composto por uma série de ramificações tubulares que fornecem as vias para a entrada e existência do ar no organismo. Essas vias, ou caminhos, chamados brônquios, possuem uma estrutura extremamente sofisticada onde cada ducto vai se dividindo em dois sucessivamente, formando os bronquíolos e finalmente os alvéolos. A superfície total da membrana alveolar varia de 100 a 200 metros quadrados, dependendo do tamanho da pessoa. Este é

o fator preponderante que torna os pulmões amplamente sujeitos aos fatores ambientais (Mintz, 2006; Murray e Nadel, 2010).

Outra característica singular dos pulmões é o recebimento de todo o sangue corporal a partir do coração a cada batimento cardíaco, ou seja, qualquer material circulante na corrente sanguínea atravessa os pulmões constantemente. Tendo em vista estes fatores que demonstram a proeminente suscetibilidade deste órgão, é possível verificar uma ampla gama de defesas desenvolvidas para protegê-lo, como a filtração e remoção de partículas do ar inspirado, células com função fagocitária como os macrófagos, atuação de enzimas não específicas para detoxificação ou destruição de agentes externos e respostas imunológicas diversas (Murray e Nadel, 2010).

A função principal do sistema respiratório são as trocas gasosas, onde há a ventilação, a perfusão e a difusão do oxigênio proveniente da atmosfera e a substituição pelo dióxido de carbono, produzido pelas células e expelido do organismo (Mintz, 2006). Ainda é possível observar outras funções desempenhadas pelos pulmões, sendo elas: a participação no equilíbrio ácido-base, mecanismos de autodefesa, reservatório e filtração do sangue para a circulação sistêmica, conversão e/ou absorção de vasoativos encontrados no sangue venoso e o metabolismo e estoque de substâncias utilizadas pelos alvéolos ou na circulação – como as liberadas em um choque anafilático (Levitzky, 2013)

Tendo em vista tamanha complexidade e importância deste órgão no organismo e levando em consideração a diversidade de doenças que acometem o pulmão, podendo ser enfatizado o câncer pulmonar, o qual, segundo a Organização Mundial de Saúde, é a segunda maior causa de morte no mundo, é possível verificar uma base satisfatória de explicações para o interesse de estudo e melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e maquinaria deste sistema.

1.4.2. Pulmão e Envelhecimento

Durante as primeiras décadas da vida, os pulmões estão sob fase de crescimento e maturação. O número máximo de alvéolos é alcançado entre os 10 e 12 anos de idade e a maturação completa e funcionamento máximo do sistema ocorre aproximadamente entre os 20 e 25 anos. Ao longo da vida, é possível observar uma diminuição do desempenho pulmonar associada ao envelhecimento, contudo, na ausência de processos patológicos, o sistema respiratório continua apto a manter a capacidade de trocas gasosas ao longo de toda a vida (Rodriguez-Roisin *et al.*, 1999).

As mudanças fisiológicas e estruturais mais proeminentes associadas ao envelhecimento do sistema respiratório são: a diminuição do recuo elástico do pulmão, a redução da complacência da parede torácica e a perda de força do músculo respiratório (Verbeken *et al.*, 1992; Karrasch *et al.*, 2008). Destacam-se também a diminuição da resposta respiratória à hipóxia e hipercapnia (aumento da concentração de gás carbônico sanguíneo), o aumento da resistência das vias aéreas, tornando-se mais rígidas estruturalmente, e a redução da capacidade de defesa contra agentes externos e produtos do metabolismo (Rodriguez-Roisin *et al.*, 1999).

Além do mais, com o envelhecimento do organismo, o pulmão mostra um progressivo alargamento distal do espaço aéreo, onde há perda na área de superfície de permuta dos gases, com volume residual e capacidade residual funcional aumentados, o que significa que o pulmão permanece insuflado após a inspiração normal (Schroder *et al.*, 2015). Desta forma, pode ser verificada a perda da capacidade elástica do órgão e progressivo prejuízo na sua funcionalidade (Macnee, 2009).

Essas modificações na estrutura e fisiologia do sistema com o avanço da idade levam a consequências deletérias na maquinaria de ação e capacidade funcional deste órgão. Isto pode implicar em elevação da suscetibilidade a doenças obstrutivas e infecciosas e também incapacidade de eliminar produtos deletérios ou reparar danos (Karrasch *et al.*, 2008).

1.4.3. Pulmão e Estresse Oxidativo

Um dos órgãos mais afetados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é o pulmão. Ele possui grande superfície e está constantemente em contato com altas concentrações de oxigênio e poluentes, isto o diferencia dos demais órgãos do organismo e o coloca em uma situação onde há maior probabilidade de produção destas espécies reativas. Estas moléculas desempenham papel tanto em processos regulatórios fisiológicos, atuando principalmente como sinalizadores, quanto na patogênese de doenças pulmonares (Piotrowski e Marczak, 2000; Tkaczyk e Vízek, 2007).

Além do mais, a localização da produção destes elementos reativos também tem função essencial. Por isso, muitas células do tecido pulmonar possuem a capacidade de formar espécies reativas. Um destes tipos celulares são os macrófagos alveolares, que estão presentes em proeminente número nos pulmões desempenhando papel fagocítico e atuando como primeira linha de defesa contra infecções. Eles contêm a enzima NADPH oxidase em sua membrana citoplasmática, a qual gera grandes quantidades do radical superóxido. Este tipo celular é a maior fonte de EROs nos pulmões sob condições fisiológicas (Piotrowski e Marczak, 2000; Tkaczyk e Vízek, 2007).

Outro grupo celular encontrado são os neutrófilos, conhecidos por produzir EROs como parte de sua atividade bactericida. Similar aos macrófagos, a produção dessas espécies ocorre através da atividade da enzima NADPH oxidase. Entretanto, os neutrófilos estão presentes em menor quantidade nos pulmões sob condições fisiológicas, migrando para este órgão mais profusamente após estímulos durante processos inflamatórios (Forman e Torres, 2002; Thabut *et al.*, 2002).

As células endoteliais, devido a rica vascularização pulmonar, são outro tipo com grande massa celular. Recentes evidências mostram que estas células também são fonte de EROs e participam dos processos de estresse oxidativo e dano tecidual sob condições fisiológicas. Além do mais, elas apresentam a enzima NADPH oxidase ligada à membrana, porém com algumas diferenças comparadas aos outros tipos celulares (Tkaczyk e Vízek, 2007). As células

endoteliais são capazes de liberar quantidades substanciais de superóxido no espaço extracelular provavelmente através de canais aniônicos de membrana. O radical hidroxila também pode ser formado através de um processo catalisado por íons ferro presentes nas proximidades da superfície endotelial (Kinnula *et al.*, 1991; Li e Shah, 2003).

Outros tipos celulares como fibroblastos, células da musculatura lisa tanto das vias aéreas como das paredes dos vasos, eosinófilos, monócitos e mastócitos presentes nos pulmões, são capazes de produzir alguma quantidade de EROs. Porém, o papel de cada tipo celular ainda não está completamente claro, sendo necessários maiores estudos acerca da influência de cada célula na patogênese de doenças específicas e em processos fisiológicos importantes como sinalização e apoptose (Thabut *et al.*, 2002; Li e Shah, 2003).

Tanto a produção endógena de oxidantes (cadeia transportadora de elétrons) como os derivados de fontes exógenas (poluentes do ar e fumaça de cigarros) possuem capacidade de induzir dano oxidativo no pulmão através de cascatas de sinalização iniciadas pela produção de EROs que posteriormente induzem a inflamação (Kadiiska *et al.*, 1997; Herget *et al.*, 2000). O acúmulo destes danos oxidativos desempenha papel importante na patogênese de diversas doenças pulmonares como: asma, doença obstrutiva crônica, lesão pulmonar aguda, fibrose e câncer (Tkaczyk e Vízek, 2007).

Tendo em vista todos estes fatores de vulnerabilidade, o sistema de defesa antioxidante dos pulmões é, portanto, particularmente importante. A enzima SOD está na primeira linha de defesa dos pulmões contra o ataque de espécies reativas. Também é possível verificar a atuação da CAT, da GSH e em menores quantidades, as tioredoxinas e as vitaminas C e E (Kelly, 1999; Gutteridge e Halliwell, 2000; Forman e Torres, 2002).

Não existem dúvidas do papel dualístico desempenhado pelas EROs no sistema pulmonar, verificando-se sua presença em processos fisiológicos e patológicos. Esta diferenciação de atuação é determinada por um fino equilíbrio entre a produção de oxidantes e os mecanismos de defesa. Este balanço, ou a ausência dele são responsáveis pela caracterização ou não de um estado de estresse oxidativo tecidual (Bottje *et al.*, 1998; Tkaczyk e Vízek, 2007).

1.4.4. Pulmão e Reprodução

O sistema respiratório fornece a demanda energética para a gestação. O feto em crescimento consome quantidades crescentes de oxigênio conforme a evolução do processo gestacional e gestações múltiplas requisitam ainda mais a cada idade correspondente. O fluxo de oxigênio no sangue materno aumenta não somente pelo aumento do consumo do feto, mas também pelo aumento da massa tecidual materna e as demandas metabólicas consequentes (Knobil & Neill, 2006)

As adaptações do sistema respiratório induzidas pela gestação provêm de duas principais mudanças maternas: o aumento dos níveis de progesterona e estrogênio, que impulsionam a ventilação alveolar, e a reconfiguração da parede torácica e elevação do diafragma para acomodar o útero em crescimento, diminuindo assim, a mobilidade da caixa torácica (Knobil & Neill, 2006; Mover e Ar, 1995)

O progressivo aumento da demanda energética do feto, útero e órgãos maternos, resultam em um aumento no consumo de oxigênio, na produção de dióxido de carbono e na taxa metabólica basal. O aumento da tensão de oxigênio durante a gestação é uma importante adaptação que facilita a transferência do oxigênio para a placenta. Apesar deste aumento na tensão de oxigênio, o acréscimo no consumo leva a uma redução na capacidade funcional residual, com consequente redução das reservas de oxigênio (Hegewald e Crapo, 2011).

Apesar das vastas mudanças respiratórias durante o processo gestacional, a gravidez é seguida por um estágio com demanda energética ainda maior, a lactação. Fêmeas alcançam o pico de 66% de aumento na massa específica de consumo de oxigênio durante este período, tanto para a produção de um leite com propriedades nutritivas adequadas, quanto para a própria amamentação, principalmente em animais com grandes ninhadas (Mover e Ar, 1995).

2. OBJETIVO

Avaliar de que forma a experiência reprodutiva altera o perfil oxidativo em pulmão de ratas fêmeas ao longo do envelhecimento.

2.1. Objetivos específicos

- Acompanhar as alterações ao longo do envelhecimento dos animais nas idades de 3, 6, 12 e 24 meses.

- ❖ Nos pulmões:
 - Mensurar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase e o consumo de peróxido de hidrogênio;
 - Determinar os níveis dos marcadores de dano oxidativo, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e nitração;
 - Quantificar os antioxidantes não-enzimáticos, vitaminas C e E e glutathione total.

- ❖ No soro:
 - Determinar os níveis hormonais de estradiol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo científico a ser submetido à revista *Biogerontology*.

Analysis of oxidative status in lungs of breeder and non-breeder female Wistar rats during aging

Vanessa K. Engers^{a,b}, Jordana S. Putti^{a,b}, Fernanda M. Heemann^b, Ártur K. Schüller^b, Diego A. M. Canata^{a,b}, Fernanda S. Hackenhaar^{a,b}, Tiago B. Salomon^{a,b}, Mara S. Benfato^{a,b}.

^a Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular;

^b Laboratório de Estresse Oxidativo – Departamento de Biofísica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Corresponding author: Dra. Mara S. Benfato. Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43422, Porto Alegre/RS, Brazil. e-mail: mara.benfato@ufrgs.br

ABSTRACT

Aging is a multifactorial, individual and complex process that reduces fertility and lifespan. Mammalian reproduction is a natural event that requires a great demand of energy increasing metabolic rate and mitochondrial activity mainly in female because of pregnancy, lactation and hormonal changes. Both processes may change the normal function of organism which can lead to an imbalance in oxidative state. Understand the progression of aging and the cost of reproduction is of fundamental importance in life-history evolution. For this, we have analyzed oxidative stress parameters to verify the effects of reproduction during aging in lungs of female Wistar rats. We measured the activity of glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, consumption of hydrogen peroxide, protein carbonylation, nitrite and nitrate levels and vitamin E levels. We traced oxidative status at ages 3, 6, 12, and 24 months. Animals were grouped according to reproductive experience: breeders and non-breeders, considering breeders when they had the first litter. The study showed that reproduction modified antioxidant parameters at 6, 12 and 24 months. Non-breeders animals showed higher SOD activity, consumption of hydrogen peroxide and vitamin E levels at 24 months compared to breeders of the same age. The GPx activity was higher in non-breeders group at 6, 12 and 24 months compared to breeders of the same age. Total glutathione levels decrease in breeders at 12 months of age. The nitrite and nitrate levels were higher in breeders at 24 months of age. We found no difference between breeders and non-breeders in GST activity and carbonyl levels showing that reproduction is not affecting these parameters but aging. The carbonyl levels that represent protein damage were progressive higher according age. Differently GST activity decrease by age. Here we demonstrate that the antioxidant defenses in lungs of female rats were higher in non-breeders than breeders and the damage show the same profile in both groups. These results may conclude that organism is able to deal with the cost of reproduction adapting to oxidative stress in lungs of female Wistar rats.

Keywords: Aging, Cost of reproduction, Lungs, Oxidative stress.

INTRODUCTION

Aging is a universal, multi-factorial, individual and irreversible process that reduces metabolic functions, fertility and lifespan. There are many intrinsic and extrinsic factors affecting the overall aging process direct and indirectly (Gems e McElwee, 2005; Jeyapalan e Sedivy, 2008). This makes it an extremely complex system that until now is poorly understood.

One of the most respected theories of aging is the oxidative stress theory where is suggested that reactive species formed mainly by the oxygen consumption causes cumulative damage to biological structures leading to aging and death (Harman, 1956). Despite the numerous theories of aging and under a new perspective where reactive species have both beneficial role as signals and damaged effects as oxidants, the oxidative stress theory remains one of the most important theories that attempt to explain this complex process (Liochev, 2015; Speakman *et al.*, 2015).

Mammalian reproduction is a natural event that involves some of the most pronounced physiological changes that can be observed in healthy adult animals. Reproduction affects mainly female because of hormone changes, pregnancy and lactation that requires a great demand of energy increasing metabolic rate and mitochondrial activity (Murray e Nadel, 2010; Garratt *et al.*, 2013; Speakman e Garratt, 2014).

During pregnancy occur changes in blood volume and blood flow distribution that increases ventilation and respiratory frequency increasing the oxygen requirement by the lungs making it even more exposed (Mover e Ar, 1995). Furthermore, the enhance both in oxygen consumption, metabolic rate and mitochondrial activity may result in increased production of damaging reactive oxygen and nitrogen species by the lungs what can lead to an imbalance in oxidative state of organism (Bergeron *et al.*, 2011).

Thus, reproduction appears to be a cost process because of high energetic investment (Garratt *et al.*, 2013). But the trade-off between the cost of reproduction and lifespan is controversial whereas many studies show that

breeder animals have greater lifespan and less oxidative damage than non-breeders (Schmidt *et al.*, 2013) contrary to expectations.

Both aging and reproduction processes cause many changes in normal function of organism and primarily in lungs. Understand the progression of aging and the cost of reproduction is of fundamental importance in life-history evolution. However, our knowledge about the mechanisms of these conditions has been limited by a lack of detailed functional information (Kirkwood, 2005; Speakman e Garratt, 2014; Speakman *et al.*, 2015)

Thereby one mechanism that received a great attention is the role of reactive species in the hypothesis that oxidative stress could be a key mechanism underlying the trade-off between reproductive effort and lifespan, where greater investment in reproduction might result in faster damage accumulation and hence reduced life expectancy (Metcalf e Monaghan, 2013). To verify this hypothesis, we have analyzed oxidative stress parameters in lungs of female Wistar rats divided into groups with and without reproductive experience during aging.

MATERIAL AND METHODS

Animals

All animal studies were approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. This study employed 80 Wistar female rats (*Rattus norvegicus*) aged three, six, twelve, and twenty-four months. At one month of age, rats were divided into two groups: with (breeders) or without (non-breeders) reproductive activity (n=10 for each age and group). Breeder female rats were maintained in a box with a single male of the same age (1 male and 1 female per box). Non-breeder rats were grouped with other female rats without any contact with males (5 per box). Reproduction was considered to have occurred when the females gave birth to the first litter. Pups were separated from the couple at 21 days of age, i.e., before the initiation of the pubertal stage, which corresponds to an age of 30–70 days for males and 33–42 days for females (Krinke 2000). Litter size ranged from 1 to 15 pups, and each couple had 5 to 15

litters. The females had litters until 12 months of age, and one had a litter at 16 months. The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle at a temperature of $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, and animals were provided with standard lab chow and drinking water *ad libitum*. Vaginal smears were performed periodically to monitor the estrous cycle. Females were euthanized at the proestrus stage until 12 months of age and mostly of female (95%) at 24 months of age were stopped to cycle at diestrus phase.

Lung dissection and processing

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

Organ processing was made as previously performed by Hackenhaar et al. (2009). Briefly, lungs were processed with manual maceration. The samples were sonicated in 30 mmol/L phosphate buffer (120 mmol/L KCl, 100 $\mu\text{mol/L}$ PMSF, (pH 7.4) and centrifuged for 10 min at 3500 g. The supernatant was transferred to a fresh tube and a second centrifugation was performed again for 10 min at 3500 g. The supernatant from the second centrifugation was used for all assays.

Obtaining blood

Before perfusion, blood was collected by puncturing the left ventricle of the heart. Fresh blood was centrifuged for 10 min at 3500g, and the serum was separated for subsequent hormonal assay.

Estradiol level measurements

Levels of 17β -estradiol in serum were estimated by E.L.I.S.A immunoassay using Estradiol IBL international- Tecan kit (Hamburg/Germany).

Oxidative damage assays in lung tissue

As an index of protein damage, carbonyl levels were marked with 2,3-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) and measured at 370nm (Levine et al., 1990). Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/mg of protein.

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

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

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

Assays for antioxidant molecules in lung tissue

Vitamin C (Vit. C) levels were assayed by HPLC employing a reverse-phase SUPERCOSIL™ LC-18- DB HPLC Column (15 cm x 4.6 mm, 5 μm), using a mobile phase (30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol in a ratio of 9:1 (v/v)) flow rate of 1 mL/min, and a sample size of 20 μL. The absorbance of the column effluent was monitored at 250 nm (Karatepe 2004). Under these conditions, the retention time of Vit. C was 3.0 min. The Vit. C level was expressed as μmol of Vit. C/mg of protein.

The assay to measure total GSH (tGSH) was performed by measuring the formation of p-nitrophenol from 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid, DNTB) in the presence of the enzyme GR and NADPH. Color development was read at 412 nm and the level was expressed as μmol of glutathione/mg of protein (Rahman et al., 2006).

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

Assays for enzyme activities in lung tissue

Glutathione peroxidase (GPx) activity was accessed by Ransel® Kit (Randox, UK), with absorbance measured at 340nm. The activities were expressed as U/mg of protein.

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

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

The superoxide dismutase (SOD) activity was measured using the RanSOD® kit (Randox, UK), with absorbance measured at 505nm.

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

Statistical analysis

The results were analyzed using SPSS 18.0 statistical software, by means of two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test ($p \leq 0.05$). Pearson correlation tests were used for correlation analyses. Statistical analysis was accomplished with the support of the Statistical Nucleus of the Federal University of Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS).

RESULTS

Body weight

Body weight of animals aged three, six, twelve and twenty-four months increased like expected according to natural aging, with no significant difference between breeder and non-breeder groups (data not shown).

Estrogen levels

Estrogen levels did not demonstrate significant differences at different ages neither between breeder and non-breeder groups (Table 1).

Table 1 Estrogen and MDA levels of animals aged 3, 6, 12, and 24 months, grouped as breeder and non-breeder.

		Age			
		3	6	12	24
Estrogen levels	B	37.4 ± 12.7	37.9 ± 10.5	49.7 ± 13.5	22.5 ± 9.4
	N	23.16 ± 9.5	18.7 ± 4.2	26.7 ± 8.4	14.5 ± 3.4
MDA levels	B	5.8 ± 0.08	2.8 ± 0.7	5.2 ± 0.2	2.5 ± 0.5
	N	0.5 ± 0.08	4.5 ± 1.2	6.7 ± 1.04	0.4 ± 0.01

Results are expressed as mean ± SE
B breeder, N non-breeder
Age expressed in months
Estrogen levels expressed in pg/mL
MDA levels expressed in umol/mg prot

Oxidative Damage

During aging, we found significant increase in carbonyl levels at 12 and 24 months of age compared to animals with 3 and 6 months of age both in breeder and non-breeder animals verifying a progressive increment in protein carbonylation with age. However, we found no significant difference when compared breeder and non-breeder animals at the same age (Fig. 1a). NO₂&NO₃ levels were significant higher in breeder animals at 24 months of age just

compared with 12 months animals in the same group. No significant differences for NO₂&NO₃ levels were found among non-breeder animals of different ages neither between breeder and non-breeder groups (Fig. 1b). We found no significant changes in MDA levels both at different ages and between groups (Table 1).

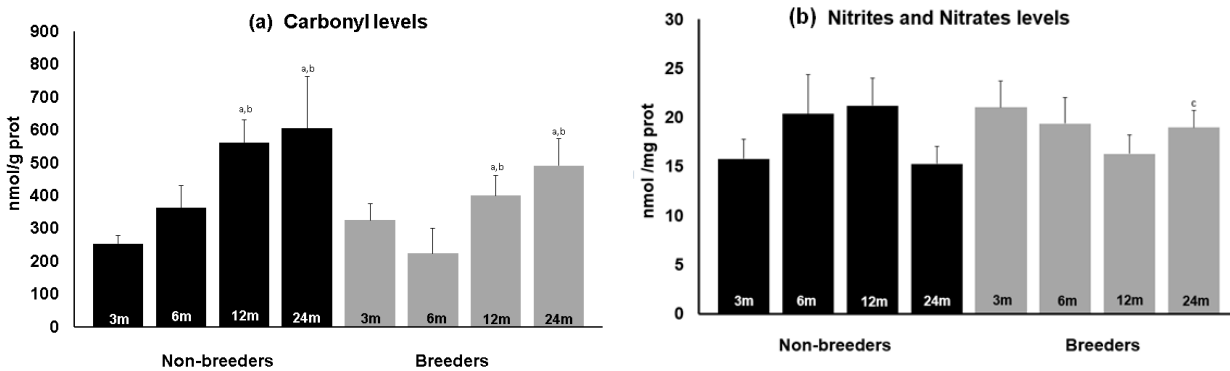


Fig 1- Parameters of oxidative damage in lungs of breeder and non-breeder female rats over aging. **(a)** protein carbonylation levels expressed in nmol of carbonyl/g of protein. **(b)** NO₂ and NO₃ levels expressed in nmol of NaNO₂/mg of protein. * Significant difference between breeder and non-breeder animals at the same age; *p ≤ 0.05. Letters show significant difference between ages within the same group, where a is 3 months, b is 6 months and c is 12 months. Results are expressed as mean ± SD.

Antioxidant Defenses

With respect to non-enzymatic defenses, we found significant increase in tGSH levels in non-breeder animals at 6 and 12 months of age compared with 3 months of age animals of the same group. A decrease was observed in non-breeder animals at 24 months just compared with animals at 12 months of age of the same group. tGSH levels in breeder animals showed a decrease at 12 months of age compared with 3 months of age animals inside the group. Between breeder and non-breeder groups we can observe a significant increase in tGSH levels in breeder animals at 3 months of age compared to non-breeders at the same age. However, a decrease was found at 12 months of age in breeder animals compared to non-breeders at the same age (Fig. 2a). In Vit C levels we found no

significant differences both at different ages and between groups (Fig. 2b). In breeder animals we found significant decrease of Vitamin E levels at 24 months of age compared with 6 months of age animals in the same group. When breeder and non-breeder groups were compared, we observe a decrease of Vit E levels in breeder animals at 6 and 24 months of age (Fig. 2c).

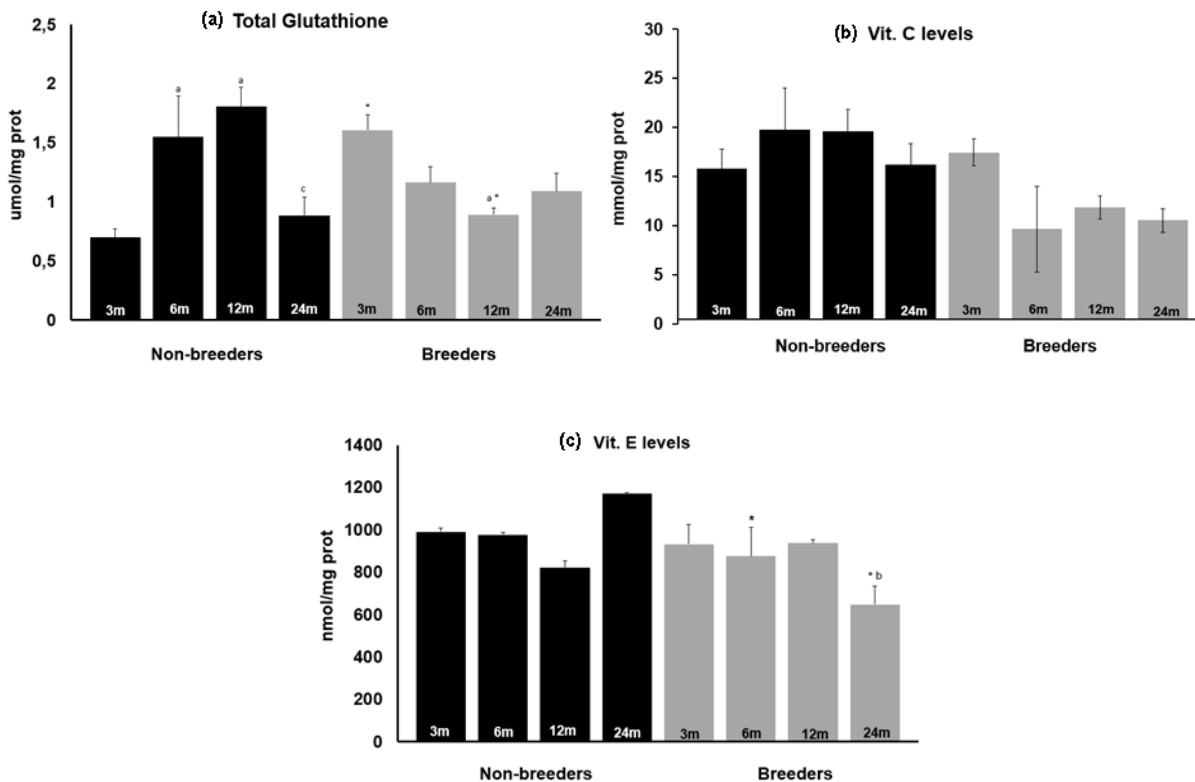


Fig 2- Levels of non-enzymatic antioxidant defenses in lungs of breeder and non-breeder female rats over aging. **(a)** tGSH levels expressed in umol of total glutathione/mg of protein. **(b)** Vit C levels expressed in mmol of Vit C/mg of protein. **(c)** Vit E levels expressed in nmol of Vit E/mg of protein. * Significant difference between breeder and non-breeder animals at the same age; * $p \leq 0.05$. Letters show significant difference between ages within the same group, where a is 3 months, b is 6 months and c is 12 months. Results are expressed as mean \pm SD.

With respect to enzymatic defenses, the only significant difference founded in H_2O_2 consumption was the decrease of the activity in breeder animals at 24 months of age compared with non-breeder animals at the same age (Fig. 3a). The GPx activity shown a significant increase in non-breeder animals at 12 months of

age compared with 3 months of age animals at the same group. We found a significant decrease of GPx activity in breeder animals at 6, 12 and 24 months of age compared with non-breeder animals at the same age (Fig. 3b). GST activity shown a significant decrease both in breeder and non-breeder animals at 24 months of age compared with 3 and 12 months animals at the same group. No significant difference was found between breeder and non-breeder animals. (Fig.3c). SOD activity revealed a significant decrease in breeder animals at 24 months of age compared with 3 months of age animals at the same group and compared with non-breeder animals at the same age. We found no significant differences between animals of different ages inside the non-breeders group. (Fig. 3d).

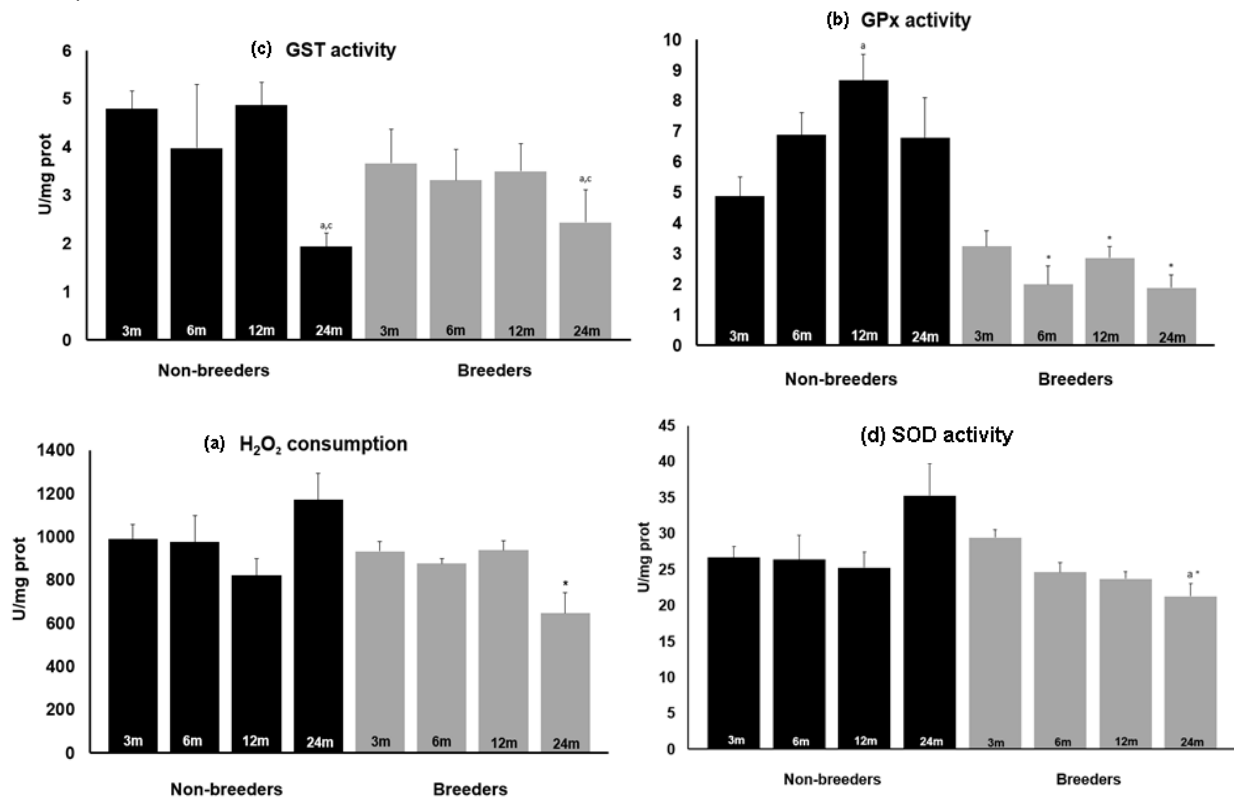


Fig 3- Enzymatic antioxidants in lungs of breeder and non-breeder female rats over aging. **(a)** H₂O₂ consumption levels, indirect measure of catalase and peroxirredoxins; **(b)** GPx activity **(c)** GST activity **(d)** SOD activity expressed in U/mg of protein. * Significant difference between breeder and non-breeder animals at the same age; * $p \leq 0.05$. Letters show significant difference between ages within the same group, where a is 3 months and c is 12 months. Results are expressed as mean \pm SD.

Correlation Analysis

Person linear correlation analysis showed that in non-breeder animals SOD correlated with consumption of H₂O₂ (74%) and tGSH correlated with Vit. C (42%). In breeder animals SOD correlated with GST (56%).

DISCUSSION

The life history theory suggests that investment in reproduction could be costly for organisms in some aspects. The concept about cost of reproduction takes into account the trade-offs between reproduction and longevity, as well as reproduction and future reproductive success (Garratt *et al.*, 2013; Speakman e Garratt, 2014). One particular idea for this trade-off is that reproduction causes an increase in free radical production what results in oxidative stress and this has been implicated as a pathway leading to senescence. A variety of evidence support the existence of this trade-off, but the physiological costs of reproduction that underlie this relationship remain poorly understood (Metcalf e Monaghan, 2013).

Reproduction is well known to demand a great amount of energy, mainly for mammalian female with hormonal changes, pregnancy and lactation. During reproduction, individuals typically have much higher rates of metabolism, which, potentially, could cause increased ROS production (Rizzo *et al.*, 2012b; Schmidt *et al.*, 2013). However, greater metabolism does not necessarily mean greater ROS production and further, animals often upregulate the antioxidant defenses in response to increased ROS, repairing damage and limiting its subsequent occurrence (Oldakowski *et al.*, 2015). Our results not showed a great difference between non-breeder and breeder animals in respect to oxidative damage but some significant differences in aspects of antioxidant defenses between groups in lungs of female rats.

The support for the hypothesis that oxidative damage to tissues underpins life-history trade-offs is weak (Stier *et al.*, 2012; Metcalfe e Monaghan, 2013; Speakman e Garratt, 2014). Some studies have shown positive relationship

between reproduction and oxidative damage, whereas numerous others have concluded that reproduction causes no increase, or even a decrease, in parental levels of oxidative damage (Odakowski *et al.*, 2015). In our findings, carbonyl groups, that measure protein damage, does not differ between breeder and non-breeder animals. The profile of protein carbonylation was the same in both groups with progressive increase of carbonylated proteins during aging, what could be expected for aged organisms. Analyzing breeding group, although statistically was not significant, we can distinguish a little decrease in protein carbonylation levels at 6 months of age animals, considering part of the peak of reproduction phase. This could be explained by the 'shielding theory' what purposes that female can shield their organism or specific tissues during reproduction to avoid oxidative damage (Blount *et al.*, 2016).

We can observe a delineated profile in enzymatic activities of GPx, SOD and H₂O₂ consumption when compared breeder and non-breeder animals at 24 months of age. There is a significant decrease in activity of these three enzymes at 24 months of age in breeder animals. A reduction in antioxidant defenses in breeder animals is hard to interpret, because it could indicate either that defenses were depleted by a high rate of ROS production after successive reproduction periods or that defenses have been downregulated to their not being needed (Metcalf e Monaghan, 2013). Considering that oxidative damage in breeder animals at 24 months of age was not higher than non-breeder animals at the same age, these findings can demonstrate that reproduction does not increase ROS production and protein damage in lungs of aged breeder animals. We just have measured protein carbonylation what cannot exclude the possibility of another specific protein damage are happening simultaneously. SOD catalyse the dismutation of superoxide anion (O₂^{•-}) into oxygen (O₂) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The enzymes catalase and another peroxiredoxins work coordinately to eliminate hydrogen peroxide (Halliwell and Gutteridge 2007). We found a strong correlation between the enzyme SOD with consumption of hydrogen peroxide (74%) in non-breedeeer animals. These results can indicate that the antioxidant enzymes are working together to prevent oxidative damage or in response to great levels of ROS in tissue.

Overproduction of ROS leads to oxidative stress, which induces cells to go under an inflammation mechanism and lowers cell viability (Comhair e Erzurum, 2005). GPx is an important enzymatic component of the mechanisms for detoxifying ROS in the lung and may play a significant role in preventing oxidant-mediated lung diseases. Given the fact that GPx is up-regulated in lungs of individuals with asthma or chronic beryllium disease (Comhair *et al.*, 1999) or exposed to exogenous oxidants (Comhair *et al.*, 1999; Comhair *et al.*, 2001) the airway has the capacity to an sensible increased GPx in response to increase of ROS and inflammation (Comhair e Erzurum, 2002; 2005). In our findings the activity of GPx was higher in non-breeder animals at 6, 12 and 24 months of age related to breeders at the same age, what can indicate an increased ROS production in these animals. No data exist that corroborates with the lower activity of GPx in breeder animals, but somehow the mechanisms underlie this result appears to be related to reproduction once the difference do not occur in animals at 3 months of age when they had only one litter or even no one. We can hypothesize that reproduction could be protective or even preventive at some pathway, that is not the antioxidant system, face to inflammatory processes induced by ROS in lung tissue, owing to the reduced GPx activity evidenced in lungs of breeder female.

According to a study of Lee et al, 2012 that measured the expression of GST during the estrous cycle, the alpha-class GST expression was higher at proestrus phase than diestrus phase in ovarian tissue. This result corroborates with ours in lung tissue, where GST activity was lower at 24 months of age in both groups where females already stopped cycling majority in diestrus (95%). At the other ages, all female was euthanized at proestrus phase where the GST activity appears significantly higher, demonstrating great similarity with expressed in ovarian tissue (Lee *et al.*, 2012). This result suggests that GST in lung is also sensitive to changes during estrous cycle.

Ascorbate has been demonstrated to be an effective antioxidant. It can act both directly, by reaction with aqueous peroxy radicals, and indirectly, by restoring the antioxidant properties of fat-soluble vitamin E (Bendich *et al.*, 1986). Glutathione and ascorbic acid are water soluble and carry out their roles principally

in the cytoplasm and mitochondria, whereas vitamin E is the principal chainbreaking, lipid soluble antioxidant in membranes. Each compound is a major free radical reductant in cells. What makes glutathione, ascorbic acid, and vitamin E special is that they interact in a series of coupled oxidation-reduction reactions. It nevertheless is worth emphasizing that the regeneration of the reduced forms of the compounds by the set of coupled reactions provides for amplification of the antioxidant capacities of each compound. In the absence of redox coupling, the quenching of oxidants would be limited by the intracellular concentration of each compound (Winkler *et al.*, 1994).

Glutathione in its reduced form (GSH) has pleiotropic roles, which include maintaining cells in a reduced state, serving as an electron donor for some antioxidative enzymes, and forming conjugates with some harmful endogenous and xenobiotic compounds via catalysis of glutathione S-transferase (Meister e Anderson, 1983). GSH also has important functions in the reproductive system. For example, GSH synthesis is involved in oocyte maturation and pronucleus formation after fertilization (Yoshida *et al.*, 1993; Funahashi *et al.*, 1994). GSH in reproductive tract secretion appears to improve mouse embryo development (Gardiner *et al.*, 1998). A decreased ratio of GSH: GSSG is hypothesized to be a major contributing factor to the detrimental effects of maternal aging and postovulatory oocyte aging.

According to (Kaneko *et al.*, 2001) GSH is found at high levels in female reproductive tissues, what can explain the lower levels of GSH in lungs of breeder female at a relevant reproductive age (12 months). This can indicate that GSH is more recruited for reproductive tissues like uterus, ovaries and oviducts and is less concentrated in other tissues like lungs. Another factor that could be affected by this condition is the vit C levels. In this case, the lower concentration of GSH in lungs of breeder animals, reduced the possibility of interaction between GSH and vit C, emphasizing the positive correlation of vit C with GSH (42%) only in non-breeder animals, where GSH levels were possible higher. Consequently, the vit E levels are affected too because the deficiency in the cascade of oxide-reduction cycle between GSH – vit C – vit E. We observe a lower levels of vit E in breeder animals at 6 and 24 months of age, probably because the reduction of vit C levels

and then the diminish recycling capacity of vit E through vit C, demonstrating the thin regulation in mechanisms of interaction between this molecules.

In conclusion, our findings demonstrate that reproduction appears to be not costly for female rats, analyzing the lung tissue and animal creation conditions. Damage profile seems to be the same when compare breeder and non-breeder animals, and the antioxidant status show a regular similarity between groups. Furthermore in specific cases we show lower levels of antioxidants and enzymatic activity in breeder group what can demonstrate a lower production of ROS or even less biomolecules damage. These results can indicate an adaptation capacity of lungs to deal with higher metabolism and the great body changes that happens in pregnancy and lactation. (Pichaud *et al.*, 2013) suggest that experiencing reproduction could trigger physiological and metabolic changes in mitochondria that could explain these adaptations. Other hypothesis is that the transition to the reproductive state triggers a pre-emptive reduction in levels of oxidative damage to tissues in order to shield mothers, their gametes and developing offspring from harm caused by inevitable increase in oxidative damage resulting from reproductive effort (Blount *et al.*, 2016). This “oxidative shielding hypothesis” may explain the same levels of oxidative damage when compared breeders and non-breeders. At least the sex hormones, like oestrogens, have antioxidants and protective properties as they regulate the gene expression of antioxidant enzymes that could protect tissues against oxidative stress during pregnancy and lactation (Borras *et al.*, 2010).

The studies are very controversial even in our group that founded diverse results in different tissues of rat (Gil Alabarse *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2013; Salomon *et al.*, 2013). What we can observe is that field of exploration is complex and dependent of ample variables like: individual metabolism, the tissue analyzed, the creation conditions, the methods of measurements and others (Speakman & Garrat, 2014).

Our data contributes for the ample field of investigation in attempt to understand more about the cost of reproduction theory and consequences, like aging. Lungs are intimately related with all these processes, whereas are

extremely exposed to external and internal oxidant agents mainly during reproduction, when energetic and respiratory demand increase and many changes occurs in lungs. No data since now shows the correlation between lungs, oxidative stress, reproduction and aging. According to our findings female rat lungs appears to adapt functions face to reproduction changes with no interference in aging process, but more research and a specific view are necessary to explain the physiological mechanisms underlying these processes. Our perspective is verify another type of measurements like DNA damage, mitochondrial function and analyze specific parts of tissue to access more information about.

REFERENCES

AEBI, H. Catalase in vitro. **Method Enzymol** 105:121–126, 1984.

BENDICH, A. et al. THE ANTIOXIDANT ROLE OF VITAMIN-C. **Advances in Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 419-444, 1986 1986. ISSN 8755-9668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986F352400006 >.

BERGERON, P. et al. The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. **Functional Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1063-1071, Oct 2011. ISSN 0269-8463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295132100014 >.

BLOUNT, J. D. et al. Oxidative shielding and the cost of reproduction. **Biological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 483-497, May 2016. ISSN 1464-7931. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000373906400012 >.

BORRAS, C. et al. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 1, p. 205-211, Jan 2010. ISSN 0925-4439. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273138500022 >.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, 1976 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

COMHAIR, S. A. A. et al. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. **Faseb Journal**, v. 15, n. 1, p. 70-78, Jan 2001. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166312400015 >.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, Aug 2002. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000176748300004 >.

_____. The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 1-2, p. 72-79, Jan-Feb 2005. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225777200008 >.

COMHAIR, S. A. A. et al. Increased glutathione and glutathione peroxidase in lungs of individuals with chronic beryllium disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 6, p. 1824-1829, Jun 1999. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080780000022 >.

DA SILVA, A. C. A. et al. Oxidative stress in the kidney of reproductive female rats during aging. **Biogerontology**, v. 14, n. 4, p. 411-422, Aug 2013. ISSN 1389-5729. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000322872300006 >.

FUNAHASHI, H. et al. Use of low-salt culture-medium for in-vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in-vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 633-639, Oct 1994. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PG80500007 >.

GARDINER, C. S. et al. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 2, p. 431-436, Aug 1998. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075082700031 >.

GARRATT, M. et al. Physiological adaptations to reproduction. I. Experimentally increasing litter size enhances aspects of antioxidant defence but does not cause oxidative damage in mice. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2879-2888, Aug 2013. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321614700022 >.

GEMS, D.; MCELWEE, J. J. Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 3, p. 381-387, Mar 2005. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226945100002 >.

GIL ALABARSE, P. V. et al. Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 241-248, Apr 2011. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289605200005 >.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase**, v. 268, 1996 1996. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996BG02D00023 >.

HACKENHAAR FS, et al. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. **Cell Biochem Funct** 27:378–382, 2009. doi:10.1002/cbf.1585

JEYAPALAN, J. C.; SEDIVY, J. M. Cellular senescence and organismal aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, n. 7-8, p. 467-474, Jul-Aug 2008. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257816100012 >.

KANEKO, T. et al. Alteration of glutathione reductase expression in the female reproductive organs during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1410-1416, Nov 2001. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171856000013 >.

KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. **Lc Gc North America**, Jun 2004. ISSN 1527-5949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222083500061 >.

KIRKWOOD, T. B. L. Understanding the odd science of aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 437-447, Feb 25 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227271500002 >.

KRINKE, G.J. The handbook of experimental animals: The laboratory rat. **Academic Press**, New York, 2000.

LEE, S. Y. et al. Expression of hepatic and ovarian antioxidant enzymes during estrous cycle in rats. **Toxicology Letters**, v. 212, n. 3, p. 329-336, Aug 3 2012. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307619100013 >.

LIOCHEV, S. I. Reflections on the Theories of Aging, of Oxidative Stress, and of Science in General. Is It Time to Abandon the Free Radical (Oxidative Stress) Theory of Aging? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 3, p. 187-207, Jul 20 2015. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000363938700001 >.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. GLUTATHIONE. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983QY55400024 >.

METCALFE, N. B.; MONAGHAN, P. Does reproduction cause oxidative stress? An open question. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 6, p. 347-350, Jun 2013. ISSN 0169-5347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000320742700010 >.

MOVER, H.; AR, A. Heart and lung adaptations to pregnancy and lactation in a crocidurine shrew. **Respiration Physiology**, v. 102, n. 2-3, p. 269-278, Dec 1995. ISSN 0034-5687. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TM22500014 >.

MURRAY, J. F.; NADEL, J. A. **Textbook of Respiratory Medicine**. 6th. Elsevier, 2010. 2064.

ODAKOWSKI, U. et al. Reproduction is not costly in terms of oxidative stress. **Journal Of Experimental Biology**, [s.l.], v. 218, n. 24, p.3901-3910, 30 out. 2015. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.126557>.

PICHAUD, N. et al. Physiological adaptations to reproduction. II. Mitochondrial adjustments in livers of lactating mice. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2889-2895, Aug 2013. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321614700023 >.

PINTO, R.E., BARTLEY, W. Effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. **Biochem J** 112:109–115

RAHMAN, I., Kode, A., Biswas, S., Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nat. Protoc.** 2006, 1, 3159– 3165.

SALOMON, T. B. et al. Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 9, p. 940-946, Sep 2013. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000323604300012 >.

SCHMIDT, C. M.; JARVIS, J. U. M.; BENNETT, N. C. The long-lived queen: reproduction and longevity in female eusocial Damaraland mole-rats (*Fukomys damarensis*). **African Zoology**, v. 48, n. 1, p. 193-196, Apr 2013. ISSN 1562-7020. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330201200020 >.

SPEAKMAN, J. R. et al. Oxidative stress and life histories: unresolved issues and current needs. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 24, p. S745-S757, Dec 2015. ISSN 2045-7758. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000368136600001 >.

SPEAKMAN, J. R.; GARRATT, M. Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. **Bioessays**, v. 36, n. 1, p. 93-106, Jan 2014. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000328391600014 >.

STIER, A. et al. Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. **Frontiers in Zoology**, v. 9, p. 11, Dec 2012. ISSN 1742-9994. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314986400001 >.

TSUCHIDA, S. Glutathione transferase. In: Taniguchi N, Gutteridge JMC (eds) Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. **Oxford University Press**, Oxford, pp 83–85, 2000.

WINKLER, B. S., ORSELLI, S. M.; REX, T. S. The redox couple between glutathione and ascorbic-acid - a chemical and physiological perspective. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 4, p. 333-349, Oct 1994. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PF17900005 >.

YOSHIDA, M. et al. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes - relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 1, p. 89-94, Jul 1993. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LK12400010 >.

4. MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTAR

Com a aprovação do Comitê de Ética da UFRGS nº 2007831 (Anexo I), 80 ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) foram separados em dois grupos e envelheceram conforme o esquema demonstrado na Figura 4. Foram controladas características de peso e pelo, procurando indicativos de saúde nestes animais. Caso algum dos animais demonstrasse sintomas de doença, como perda de pelo e/ou peso, seria descartado do n amostral. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biofísica da UFRGS.

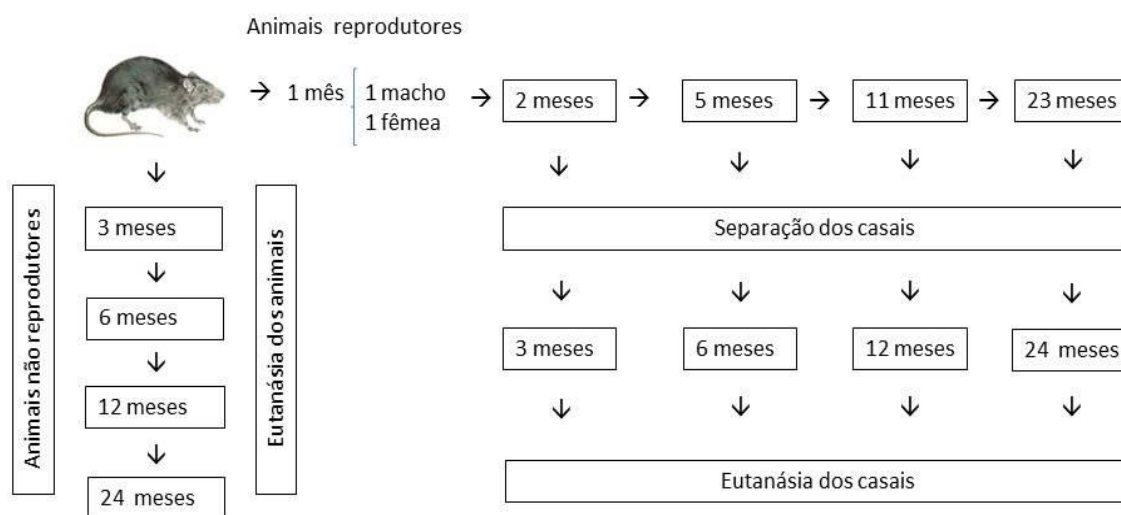


Figura 4: Esquema de criação e separação dos animais reprodutores e não reprodutores, contendo 10 animais em cada grupo ($n = 80$).

5. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR

O envelhecimento é, sem dúvidas, um dos mais familiares e conhecidos aspectos da biologia humana. Uma das singularidades mais evidentes do processo de envelhecimento é a sua inerente complexidade. Quase todo aspecto fenotípico do organismo sofre modificações ao longo do envelhecimento, dependente de diversas variáveis evidenciadas em diferentes níveis no organismo (vide Tabela 1). Esta complexidade fenomenológica levou, ao longo dos anos, a uma vasta proliferação de ideias sobre as causas celulares e moleculares específicas relacionadas a este processo (Kirkwood, 2005).

Tabela 1- Exemplos de fenótipos de envelhecimento em diversos níveis.

	Níveis	Fenótipos de envelhecimento
1	Organismo	Diferentes espécies, tamanho do animal, taxas metabólicas, etc.
2	Tecidual	Alzheimer, aterosclerose, mudanças imuno-endócrinas.
3	Celular	Limite de proliferação, redução dos telômeros, envelhecimento mitocondrial, etc.
4	Molecular	Manutenção dos genes e proteínas associadas ao envelhecimento, etc.
5	Sub-molecular	Estresse oxidativo, glicação e carbonilação, etc.

Através da natureza multidisciplinar, o estudo do envelhecimento vem sendo caracterizado por uma vertiginosa variedade de teorias, entre elas, uma das mais proeminentes e instigantes é a teoria dos radicais livres no envelhecimento, primeiramente postulada por (Harman, 1956) e amplamente estudada e testada ao longo dos anos (Beckman e Ames, 1998)

O estresse oxidativo ganhou notoriedade principalmente por sua característica universal e seu substancial custo para os organismos. Custo este que pode ser quantificado em termos energéticos para acessar, por exemplo, o custo da reprodução e a sua ligação com a senescência (Isaksson *et al.*, 2011).

Além do mais, o estresse oxidativo possui um campo potencial de ideias a respeito da complexidade e especificidade da regulação dos processos fisiológicos do organismo, como a capacidade reprodutiva e os mecanismos que cercam o envelhecimento (Eugenia Matzkin *et al.*, 2016).

Pelo fato de as proteínas serem abundantes nas células, são os principais alvos de modificações oxidativas (Hoehn *et al.*, 2013). Diversos trabalhos demonstram o aumento dos níveis de proteínas carboniladas relacionadas ao envelhecimento em diversos tecidos e espécies, conforme compilados no trabalho de (Levine, 2002). Estes achados corroboram com os resultados encontrados em nosso trabalho, onde o nível de proteínas carboniladas no pulmão de ratas fêmeas foi significativamente maior nos animais de 12 e 24 meses independente se eram reprodutores ou não reprodutores.

Como resultado deste dano, as proteínas afetadas perdem sua funcionalidade bioquímica, a expressão proteica é alterada e finalmente ocorre a formação de agregados, resultando em diferentes consequências para as células (Hoehn *et al.*, 2013). Possíveis mecanismos envolvidos neste acúmulo de grupamentos carbonila em proteínas ao longo do envelhecimento são hipotetizados, como: o aumento na taxa de espécies oxidantes; a diminuição da neutralização destas espécies; o aumento da suscetibilidade das proteínas à oxidação; e a diminuição da taxa de remoção destas estruturas oxidadas (via lisossomal ou proteossomal). Todos estes eventos sofrem declínio com o avanço do processo de envelhecimento, estando em concordância como aumento de proteínas carboniladas (Levine, 2002).

Um dos aspectos que cerca os estudos sobre o envelhecimento e seus mecanismos de evolução são os chamados *trade-offs*, os quais hipotetizam situações de custo-benefício ao longo da história de vida dos indivíduos e os possíveis processos fisiológicos que o envolvem. Uma ideia em particular, amplamente discutida e estudada, é a existência de um possível *trade-off* entre investimento reprodutivo e sobrevivência, que poderia ser explicado através da produção de espécies reativas e o estresse oxidativo resultante (Speakman e Garratt, 2014).

Neste contexto, a reprodução seria custosa para o organismo, levando a predição de que um maior investimento na reprodução atual seria de alguma maneira negativamente relevante para os eventos reprodutivos futuros, bem como, a manutenção e desenvolvimento das reproduções (Metcalf e Monaghan, 2013). Esta hipótese, portanto, prediz que o aumento do esforço empregado no processo reprodutivo é associado ao aumento de dano oxidativo e este dano se acumularia ao longo da vida levando a disfunções, envelhecimento e mortalidade (Beckman e Ames, 1998; Speakman e Garratt, 2014).

Apesar dessas predições, existem poucas evidências experimentais que comprovam que o investimento reprodutivo aumenta o estresse oxidativo nos organismos. Analisando alguns estudos que tiveram como objetivo medir o custo oxidativo da reprodução em pequenos mamíferos (Garratt *et al.*, 2013; King *et al.*, 2013; Plumel *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014; Oldakowski *et al.*, 2015), é possível observar que apenas em um desses experimentos e em um único tecido testado (sangue), foi possível observar algum aumento de dano oxidativo. Nos demais, não existe evidência de aumento no estresse ou dano oxidativo em fêmeas reprodutoras com investimento reprodutivo ao longo da vida. Em alguns tecidos, o dano foi ainda menor em reprodutoras do que nas fêmeas não reprodutoras utilizadas como controles.

Todos estes trabalhos corroboram com os nossos resultados, visto que não foi possível verificar nenhuma diferença significativa em termos de danos no pulmão de fêmeas reprodutoras e não reprodutoras em todas as idades, demonstrando assim que a reprodução não está influenciando o acúmulo de danos neste órgão.

As vias utilizadas pelo organismo para driblar a grande demanda energética e o aumento das taxas metabólicas que ocorrem no organismo durante o processo de reprodução também são hipotetizadas em diversos estudos. Garratt *et al.*, 2013 mostra adaptações celulares e metabólicas a nível mitocondrial. (Blount *et al.*, 2016), hipotetiza um mecanismo de redução na produção de espécie reativas e consequente diminuição de dano oxidativo através de um sistema de blindagem do organismo da fêmea durante o processo de transição para o estado reprodutivo, onde há a proteção de gametas e das ninhadas. Blount

et al, 2016 ainda comenta sobre o fato de as fêmeas apresentarem aumento na massa dos órgãos durante a gestação e lactação, o que poderia levar a uma diluição nas dosagens tanto dos níveis de dano como nas defesas antioxidantes. (Persky *et al.*, 2000; Kireev *et al.*, 2007; Borrás *et al.*, 2010) mostram o efeito protetor do hormônio estradiol, atuando como antioxidante nas mitocôndrias (Borrás *et al.*, 2010), no músculo cardíaco e esquelético (Persky *et al.*, 2000) e no fígado (Kireev *et al.*, 2007).

Na revisão de Speakman e Garrat, 2013 diversas variáveis são abordadas e discutidas com bastante profundidade, as quais podem ter significativa relevância para os resultados encontrados nos estudos acerca dos custos da reprodução no tempo de vida, como:

- (I) o estresse oxidativo durante a reprodução pode ser encontrado em estados diferentes dependendo do tecido estudado. Isso levanta a possibilidade de que os animais alocam suas defesas de maneira diferente entre os tecidos e substratos, protegendo estruturas e tecidos de maior importância para a reprodução atual e manutenção para posteriores. Como observado no estudo de Brand e Esteves, 2005, onde foram detectados diferentes níveis de defesas antioxidantes em diferentes tecidos dos mesmos animais, sugerindo que a hipótese está correta. O mesmo pode ter ocorrido em nosso trabalho, onde encontramos a queda da atividade da enzima GPx em animais não reprodutores, evidenciando a possibilidade de um recrutamento desta enzima para outros tecidos com maior suscetibilidade ao estresse oxidativo durante a reprodução;
- (II) a metodologia de manipulação da reprodução também é um fator determinante para o acesso aos dados de estresse oxidativo, como por exemplo: alguns estudos utilizam a manipulação do esforço reprodutivo, onde há a comparação entre casais que tiveram o tamanho de suas ninhadas artificialmente reduzidas com aqueles que tiveram o tamanho de suas ninhadas

artificialmente aumentadas (Beaulieu *et al.*, 2011; Garratt *et al.*, 2013). Ao contrário, em nosso trabalho utilizamos a metodologia de estado reprodutivo, onde alguns indivíduos são “forçados” a reproduzir, sendo dispostos em gaiolas com apenas um outro animal do sexo oposto, e comparados com animais que são forçados a não reproduzir, isolados de indivíduos do sexo oposto. Ambas metodologias são válidas, mas trazem análises divergentes.

- (III) a análise do estresse oxidativo de animais em campo (Costantini *et al.*, 2010; Beaulieu *et al.*, 2011; Marko *et al.*, 2011; Heiss e Schoech, 2012) comparados a animais criados em laboratório (Sainz *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 2013), também demonstram grande variedade de obtenção de dados. Uma razão potencial para essas diferenças é que os animais de laboratório recebem acesso à comida e água *ad libitum*, o que pode fazer com que os animais regulem positivamente suas defesas antioxidantes e a utilizem durante a reprodução, ao contrário dos animais selvagens, onde os recursos são limitados e a obtenção dos mesmos requer algum tipo de esforço.
- (IV) os parâmetros analisados e as metodologias empregadas também fazem conta nessas contradições. Por exemplo: animais selvagens normalmente são analisados somente no que se refere a parâmetros sanguíneos, o que limita a análise. Métodos generalistas como TBARS, não acessam dados confiáveis, etc.

A partir do exposto, é possível verificar o alto nível de complexidade e contrariedade que cercam a teoria do custo da reprodução e tempo de vida. Ainda não foi possível chegar a uma resposta clara e única sobre a influência da reprodução no status oxidativo dos organismos, tendo em vista a grande variedade de análises, manipulações e metodologias. O que se pode verificar é que há a necessidade de uma visão mais específica e individualista sobre o tema, pois, ao que se pode observar, o estudo do estresse oxidativo não apresenta

linearidade no que diz respeito a diferentes espécies, tecidos e substratos, sendo necessários mais estudos acerca do assunto.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral, nossos resultados refutam a ideia de que a reprodução é custosa para o organismo das fêmeas, tendo em vista que o perfil de dano oxidativo em animais reprodutores foi similar comparado ao de animais não reprodutores. Ainda, as defesas antioxidantes não se mostraram aumentadas em animais reprodutores, o que poderia se esperar em organismos que estivessem tentando neutralizar a ação do estresse oxidativo, ao contrário, foram observadas diminuições das defesas em algumas idades e parâmetros específicos. Não podemos generalizar o efeito da reprodução sob o aspecto do estresse oxidativo no organismo como um todo, o que se pode inferir é que especificamente no pulmão de fêmeas, não foi possível observar a influência da reprodução tanto em aspectos de estresse oxidativo quanto no envelhecimento.

7. PERSPECTIVAS

A conclusão deste trabalho contribui para a complementação do entendimento do impacto da atividade reprodutiva e do envelhecimento sobre o perfil oxidativo dos organismos, abrindo a possibilidade de maiores estudos acerca do assunto. Entre estes podemos citar:

- ✓ Avaliar a longevidade associada à atividade reprodutiva em ratas fêmeas.
- ✓ Mensurar os marcadores de dano oxidativo e quantificar os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em diferentes partes do pulmão e em organelas específicas.
- ✓ Mensurar atividade mitocondrial e a eficiência dos complexos mitocondriais para avaliar a demanda energética nestes processos;
- ✓ Comparar os dados obtidos em pulmão de ratas fêmeas com pulmão de ratos machos, para acessar a diferença entre os sexos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. A.; CABELLI, D. E. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 263-274, Feb 2010. ISSN 1570-9639. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274868600003 >.
- BEAULIEU, M. et al. Oxidative status and telomere length in a long-lived bird facing a costly reproductive event. **Functional Ecology**, v. 25, n. 3, p. 577-585, Jun 2011. ISSN 0269-8463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290174500016 >.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 2, p. 547-581, Apr 1998. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073078200008 >.
- BEGUEL, J.-P. et al. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 63-71, Jan 2013. ISSN 1532-0456. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312470600008 >.
- BENDICH, A. et al. THE ANTIOXIDANT ROLE OF VITAMIN-C. **Advances in Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 419-444, 1986 1986. ISSN 8755-9668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986F352400006 >.
- BERGERON, P. et al. The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. **Functional Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1063-1071, Oct 2011. ISSN 0269-8463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295132100014 >.
- BLOUNT, J. D. et al. Oxidative shielding and the cost of reproduction. **Biological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 483-497, May 2016. ISSN 1464-7931. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000373906400012 >.
- BORRAS, C. et al. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 1, p. 205-211, Jan 2010. ISSN 0925-4439. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273138500022 >.
- BOTTJE, W. G. et al. Lung lining fluid antioxidants in male broilers: Age-related changes under thermoneutral and cold temperature conditions. **Poultry Science**, v. 77, n. 12, p. 1905-1912, Dec 1998. ISSN 0032-5791. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077476600024 >.

- BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, 1976 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.
- CASANUEVA, E.; VITERI, F. E. Iron and oxidative stress in pregnancy. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1700S-1708S, May 2003. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183011400016 >.
- COMHAIR, S. A. A. et al. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. **Faseb Journal**, v. 15, n. 1, p. 70-78, Jan 2001. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166312400015 >.
- COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, Aug 2002. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000176748300004 >.
- _____. The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 1-2, p. 72-79, Jan-Feb 2005. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225777200008 >.
- COMHAIR, S. A. A. et al. Increased glutathione and glutathione peroxidase in lungs of individuals with chronic beryllium disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 6, p. 1824-1829, Jun 1999. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080780000022 >.
- COSTANTINI, D.; CARELLO, L.; FANFANI, A. Relationships among oxidative status, breeding conditions and life-history traits in free-living Great Tits *Parus major* and Common Starlings *Sturnus vulgaris*. **Ibis**, v. 152, n. 4, p. 793-802, Oct 2010. ISSN 0019-1019. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281852500010 >.
- COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. **Biochemical Journal**, v. 425, p. 313-325, Jan 15 2010. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273772300003 >.
- DA SILVA, A. C. A. et al. Oxidative stress in the kidney of reproductive female rats during aging. **Biogerontology**, v. 14, n. 4, p. 411-422, Aug 2013. ISSN 1389-5729. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000322872300006 >.
- DE LA IGLESIA, H. O.; SCHWARTZ, W. J. Minireview: Timely ovulation: Circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **Endocrinology**, v.

147, n. 3, p. 1148-1153, Mar 2006. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235350100013 >.

DOTSCH, J. et al. Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 97, n. 2, p. 163-167, Aug 2001. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170224100011 >.

ECKEL, L. A. Ingestive behaviour in female rats: Influence of the ovarian cycle. **Appetite**, v. 32, n. 2, p. 274-274, Apr 1999. ISSN 0195-6663. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000079664100009 >.

EUGENIA MATZKIN, M. et al. Alterations in oxidative, inflammatory and apoptotic events in short-lived and long-lived mice testes. **Ageing-Us**, v. 8, n. 1, p. 95-110, Jan 2016. ISSN 1945-4589. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000372085500009 >.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling - Respiratory burst in macrophage signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 12, p. S4-S8, Dec 2002. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179802200003 >.

FUJII, J.; IUCHI, Y.; OKADA, F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, Sep 2 2005. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232032300001 >.

FUNAHASHI, H. et al. USE OF LOW-SALT CULTURE-MEDIUM FOR IN-VITRO MATURATION OF PORCINE OOCYTES IS ASSOCIATED WITH ELEVATED OOCYTE GLUTATHIONE LEVELS AND ENHANCED MALE PRONUCLEAR FORMATION AFTER IN-VITRO FERTILIZATION. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 633-639, Oct 1994. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PG80500007 >.

GARDINER, C. S. et al. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 2, p. 431-436, Aug 1998. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075082700031 >.

GARRATT, M. et al. Physiological adaptations to reproduction. I. Experimentally increasing litter size enhances aspects of antioxidant defence but does not cause oxidative damage in mice. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2879-2888, Aug 2013. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321614700022 >.

- GEMS, D.; MCELWEE, J. J. Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 3, p. 381-387, Mar 2005. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226945100002 >.
- GIL ALABARSE, P. V. et al. Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 241-248, Apr 2011. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289605200005 >.
- GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, Apr 2007. ISSN 1542-9733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246162300003 >.
- GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase**, v. 268, 1996 1996. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996BG02D00023 >.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000 - A historical look to the future. **Reactive Oxygen Species: from Radiation to Molecular Biology: a Festschrift in Honor of Daniel L Gilbert**, v. 899, p. 136-147, 2000. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088609100011 >.
- HARMAN, D. AGING - A THEORY BASED ON FREE-RADICAL AND RADIATION-CHEMISTRY. **Journals of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956 1956. ISSN 0022-1422. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1956CHD5000009 >.
- HEGEWALD, M. J.; CRAPO, R. O. Respiratory Physiology in Pregnancy. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 1, p. 1-+, Mar 2011. ISSN 0272-5231. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287826300002 >.
- HEISS, R. S.; SCHOECH, S. J. Oxidative Cost of Reproduction Is Sex Specific and Correlated with Reproductive Effort in a Cooperatively Breeding Bird, the Florida Scrub Jay. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 85, n. 5, p. 499-503, Sep-Oct 2012. ISSN 1522-2152. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308067900009 >.
- HERGET, J. et al. A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. **Physiological Research**, v. 49, n. 5, p. 493-501, 2000. ISSN 0862-8408. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165555700002 >.

- HOEHN, A.; KOENIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. **Journal of Proteomics**, v. 92, p. 132-159, Oct 30 2013. ISSN 1874-3919. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000328518000009 >.
- ISAKSSON, C.; SHELDON, B. C.; ULLER, T. The Challenges of Integrating Oxidative Stress into Life-history Biology. **Bioscience**, v. 61, n. 3, p. 194-202, Mar 2011. ISSN 0006-3568. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288049600005 >.
- JEYAPALAN, J. C.; SEDIVY, J. M. Cellular senescence and organismal aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, n. 7-8, p. 467-474, Jul-Aug 2008. ISSN 0047-6374. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257816100012 >.
- KADIISKA, M. B. et al. In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 10, p. 1104-1108, Oct 1997. ISSN 0893-228X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997YB08900007 >.
- KANEKO, T. et al. Alteration of glutathione reductase expression in the female reproductive organs during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1410-1416, Nov 2001. ISSN 0006-3363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000171856000013 >.
- KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. **Lc Gc North America**, Jun 2004. ISSN 1527-5949. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222083500061 >.
- KARRASCH, S.; HOLZ, O.; JORRES, R. A. Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. **Respiratory Medicine**, v. 102, n. 9, p. 1215-1230, Sep 2008. ISSN 0954-6111. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000259031300001 >.
- KEELE, B. B.; MCCORD, J. M.; FRIDOVIC, I. SUPEROXIDE DISMUTASE FROM ESCHERICHIA-COLI-B - A NEW MANGANESE-CONTAINING ENZYME. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 22, p. 6176-8, 1970 1970. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1970H941200038 >.
- KELLY, F. J. Gluthathione: in defence of the lung. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 963-966, Sep-Oct 1999. ISSN 0278-6915. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000083341000008 >.
- KING, E. D. A.; GARRATT, M.; BROOKS, R. Manipulating reproductive effort leads to changes in female reproductive scheduling but not oxidative stress. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 12, p. 4161-4171, Oct 2013. ISSN 2045-7758. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000326286700010 >.

- KINNULA, V. L. et al. HYDROGEN-PEROXIDE PRODUCTION BY ALVEOLAR TYPE-II CELLS, ALVEOLAR MACROPHAGES, AND ENDOTHELIAL-CELLS. **American Journal of Physiology**, v. 261, n. 2, p. L84-L91, Aug 1991. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991GC25100081 >.
- KIRREEV, R. A. et al. Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens, and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. **Biogerontology**, v. 8, n. 5, p. 469-482, Oct 2007. ISSN 1389-5729. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249208100002 >.
- KIRKWOOD, T. B. L. Understanding the odd science of aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 437-447, Feb 25 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227271500002 >.
- KNOBIL, E.; NEILL, J. *Physiology of Reproduction*. 3^a ed. **Elsevier**, 2006.
- LARA, J. et al. A proposed panel of biomarkers of healthy ageing. **Bmc Medicine**, v. 13, p. 8, Sep 2015. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000361349200002 >.
- LEE, S. Y. et al. Expression of hepatic and ovarian antioxidant enzymes during estrous cycle in rats. **Toxicology Letters**, v. 212, n. 3, p. 329-336, Aug 3 2012. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307619100013 >.
- LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 790-796, May 1 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175291200002 >.
- LEVITZKY, M. G. **Pulmonary Physiology**. THE MCGRAW-HILL COMPANIES, I. United States of America 2013.
- LI, J. M.; SHAH, A. M. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p. S221-S226, Aug 2003. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184430000004 >.
- LIOCHEV, S. I. Reflections on the Theories of Aging, of Oxidative Stress, and of Science in General. Is It Time to Abandon the Free Radical (Oxidative Stress) Theory of Aging? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 3, p. 187-207, Jul 20 2015. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000363938700001 >.
- MACNEE, W. Accelerated lung aging: a novel pathogenic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Biochemical Society Transactions**, v. 37, p. 819-823, Aug 2009. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268902800035 >.

MANDL, A. M. THE PHASES OF THE OESTROUS CYCLE IN THE ADULT WHITE RAT. **Journal of Experimental Biology**, v. 28, n. 4, p. 576-584, 1951. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1951UF62200012 >.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609-614, 2002-11 2002. ISSN 1678-4375. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S1519-69842002000400008 >.

MARKLUND, S. L.; HOLME, E.; HELLNER, L. SUPEROXIDE-DISMUTASE IN EXTRACELLULAR FLUIDS. **Clinica Chimica Acta**, v. 126, n. 1, p. 41-51, 1982 1982. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1982PR56100005 >.

MARKO, G. et al. Oxidative damage and plasma antioxidant capacity in relation to body size, age, male sexual traits and female reproductive performance in the collared Noddy (Ficedula albicollis). **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, v. 181, n. 1, p. 73-81, Jan 2011. ISSN 0174-1578. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286341400007 >.

MCCORD, J. M.; FRIDOVIC.I. SUPEROXIDE DISMUTASE AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-&, 1969 1969a. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1969E736300001 >.

_____. SUPEROXIDE DISMUTASE-AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN. **Federation Proceedings**, v. 28, n. 2, p. 346-&, 1969b. ISSN 0014-9446. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1969C770500492 >.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. GLUTATHIONE. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983QY55400024 >.

METCALFE, N. B.; MONAGHAN, P. Does reproduction cause oxidative stress? An open question. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 6, p. 347-350, Jun 2013. ISSN 0169-5347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000320742700010 >.

MINTZ, M. L. **Current Clinical Practice. Disorders of the Respiratory Tract**: Humana Press

1: 344 p. 2006.

MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 28, p. 3331-3346,

Oct 15 2009. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270483800008 >.

MOVER, H.; AR, A. Heart and lung adaptations to pregnancy and lactation in a crocidurine shrew. **Respiration Physiology**, v. 102, n. 2-3, p. 269-278, Dec 1995. ISSN 0034-5687. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TM22500014 >.

MURRAY, J. F.; NADEL, J. A. **Textbook of Respiratory Medicine**. 6th. Elsevier, 2010. 2064.

MYATT, L. Placental adaptive responses and fetal programming. **Journal of Physiology-London**, v. 572, n. 1, p. 25-30, Apr 2006. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236328900005 >.

OLDAKOWSKI, L. et al. Reproduction is not costly in terms of oxidative stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 24, p. 3901-3910, Dec 2015. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000366645500009 >.

PACCOLA, C. C. et al. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 677-683, Oct-Dec 2013. ISSN 1806-9614. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334189200005 >.

PERSKY, A. M. et al. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 223, n. 1, p. 59-66, Jan 2000. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084988300008 >.

PICHAUD, N. et al. Physiological adaptations to reproduction. II. Mitochondrial adjustments in livers of lactating mice. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2889-2895, Aug 2013. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321614700023 >.

PIOTROWSKI, W.; MARCZAK, J. **Cellular sources of oxidants in the lung**. Int J Occup Med Environ Health. 13: 369-85 p. 2000.

PLUMEL, M. I. et al. Litter size manipulation in laboratory mice: an example of how proteomic analysis can uncover new mechanisms underlying the cost of reproduction. **Frontiers in Zoology**, v. 11, May 20 2014. ISSN 1742-9994. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336688600001 >.

RIZZO, A. et al. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, Apr 2012a. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301534200029 >.

- _____. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 344-352, Apr 2012b. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301534200029 >.
- RODRIGUEZ-ROISIN, R. et al. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. **European Respiratory Journal**, v. 14, n. 6, p. 1454-1454, Dec 1999. ISSN 0903-1936. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084385900033 >.
- ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 1, p. 3-24, Jan-Feb 1998. ISSN 1355-4786. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073657600001 >.
- SAINZ, R. M. et al. Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effect of pinealectomy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, n. 1, p. 143-149, May 2000. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087035100017 >.
- SALOMON, T. B. et al. Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 9, p. 940-946, Sep 2013. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000323604300012 >.
- SCHMIDT, C. M.; JARVIS, J. U. M.; BENNETT, N. C. The long-lived queen: reproduction and longevity in female eusocial Damaraland mole-rats (*Fukomys damarensis*). **African Zoology**, v. 48, n. 1, p. 193-196, Apr 2013. ISSN 1562-7020. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330201200020 >.
- SCHRODER, T. H. et al. The Aging Lung: Clinical and Imaging Findings and the Fringe of Physiological State. **Rofo-Fortschritte Auf Dem Gebiet Der Rontgenstrahlen Und Der Bildgebenden Verfahren**, v. 187, n. 6, p. 430-439, Jun 2015. ISSN 1438-9029. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000355425100004 >.
- SOSA, Z. et al. Release of ovarian progesterone during the rat oestrous cycle by ganglionic cholinergic influence - The role of norepinephrine. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 91, n. 3, p. 179-184, Jul 2004. ISSN 0960-0760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223419600009 >.
- SPEAKMAN, J. R. et al. Oxidative stress and life histories: unresolved issues and current needs. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 24, p. S745-S757, Dec 2015. ISSN 2045-7758. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000368136600001 >.
- SPEAKMAN, J. R.; GARRATT, M. Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. **Bioessays**, v. 36, n. 1, p. 93-106, Jan 2014. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000328391600014 >.

- SPEAKMAN, J. R.; SELMAN, C. The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. **Bioessays**, v. 33, n. 4, p. 255-259, Apr 2011. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288331100005 >.
- SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **Anatomical Record**, v. 254, n. 1, p. 116-126, Jan 1 1999. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077961600015 >.
- STIER, A. et al. Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. **Frontiers in Zoology**, v. 9, p. 11, Dec 2012. ISSN 1742-9994. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314986400001 >.
- THABUT, G. et al. Tumor necrosis factor-alpha increases airway smooth muscle oxidants production through a NADPH oxidase-like system to enhance myosin light chain phosphorylation and contractility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 25, p. 22814-22821, Jun 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000176313600091 >.
- TKACZYK, J.; VÍZEK, M. **Oxidative Stress in the Lung Tissue– Sources of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defence** Praque Medical Report. 108: 105-114 p. 2007.
- VERBEKEN, E. K. et al. THE SENILE LUNG - COMPARISON WITH NORMAL AND EMPHYSEMATOUS LUNGS .2. FUNCTIONAL-ASPECTS. **Chest**, v. 101, n. 3, p. 800-809, Mar 1992. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HG78400040 >.
- VINA, J.; HEMS, R.; KREBS, H. A. MAINTENANCE OF GLUTATHIONE CONTENT IN ISOLATED HEPATOCYTES. **Biochemical Journal**, v. 170, n. 3, p. 627-630, 1978 1978. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1978ER89800023 >.
- VINA, J. et al. Mitochondrial theory of aging: Importance to explain why females live longer than males. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 5, p. 549-556, Oct 2003. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000186101200006 >.
- WADE, G. N.; SCHNEIDER, J. E. METABOLIC FUELS AND REPRODUCTION IN FEMALE MAMMALS. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 2, p. 235-272, Sum 1992. ISSN 0149-7634. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HX36900009 >.

WESTWOOD, F. R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 375-384, Apr 2008. ISSN 0192-6233. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267457900002 >.

WINKLER, B. S.; ORSELLI, S. M.; REX, T. S. THE REDOX COUPLE BETWEEN GLUTATHIONE AND ASCORBIC-ACID - A CHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PERSPECTIVE. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 4, p. 333-349, Oct 1994. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PF17900005 >.

XU, Y.-C. et al. Oxidative stress in response to natural and experimentally elevated reproductive effort is tissue dependent. **Functional Ecology**, v. 28, n. 2, p. 402-410, Apr 2014. ISSN 0269-8463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000332777500012 >.

YOSHIDA, M. et al. GLUTATHIONE CONCENTRATION DURING MATURATION AND AFTER FERTILIZATION IN PIG OOCYTES - RELEVANCE TO THE ABILITY OF OOCYTES TO FORM MALE PRONUCLEUS. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 1, p. 89-94, Jul 1993. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LK12400010 >.

_____. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, p. SP189-SP197, Feb 2009. ISSN 0388-1350. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263663700020 >.

8. ANEXOS

Anexo I - Parecer do Comitê de ética da UFRGS



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

pro.pesq

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

Número : 2007831

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

Pesquisador (es) :

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

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

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


ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenadora do CEP UFRGS

Anexo II – Carta do relator do artigo



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

Porto Alegre, 23 de junho de 2016.

Ilmo Sr
Prof. Rogerio Margis
Coordenador
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Senhora Coordenadora,

Conforme solicitado, analisei a redação científica da estudante Vanessa K. Engers. Após a análise do artigo "**Analysis of oxidative status in lungs of breeders and non-breeders female Wistar rats during aging**" redigido pela aluna, discussão e modificações de texto, concluo que a estudante está apta para receber o crédito pela Redação Científica.

Atenciosamente,

Itabajara da Silva Vaz Jr.

Av. Bento Gonçalves 9500
Prédio 43421 Campus do Vale – UFRGS
Caixa Postal 15005
91501-970 - Porto Alegre RS Brasil

Fax: (51) 3308 10 79
Fone: (51) 3308078

Anexo III – Curriculum vitae

VANESSA KRÜGER ENGERS

DADOS PESSOAIS:

Data de Nascimento: 21/12/1988

Sexo: Feminino

Naturalidade: São Luiz Gonzaga - RS

Estado Civil: Solteiro

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 357/ ap. 502 – Porto Alegre/RS

CEP: 90.050-340

Telefone: (51) 8285-5996

Filiação: Jeovane Inácio Engers e Adriana Krüger Engers

E-mail: vanessaengers@hotmail.com

Formação:

- **Superior Completo** - Bacharel em Biomedicina, com ênfase em análises clínicas pelo Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo (CNEC/IESA) - RS.

Formação Complementar:

- Coleta de Sangue. (Carga horária: 3h), 2010.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Imunologia e sua Aplicação na Prática Clínica. (Carga horária: 4h), 2010.
Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo.
- Diagnóstico e Interpretação Laboratorial. (Carga horária: 12h), 2010.
Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo.
- Monitoria em Parasitologia Clínica. (Carga horária: 80h), 2010.
Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo.
- Extensão universitária em Análise Epidemiológica de Glicemia Capilar. (Carga horária: 14h), 2009.
Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo.

- Venopunção e Fase Analítica. (Carga horária: 12h), 2009. Instituto Hermes Pardini.
- Extensão universitária em Bioética: Os Limites de Manipulação da Vida. (Carga horária: 4h), 2008. Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo.
- Prevenção de Acidentes de Trabalho- SIPAT. (Carga horária: 20h), 2008. Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo.
- Extensão universitária em Hábitos de Higiene e Parasitoses na Comunidade. (Carga horária: 4h), 2007. Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo.

Produções

- MURUSSI, CAMILA REBELLATTO ; THORSTENBERG, MARIA LUIZA ; LEITEMPERGER, JOSSIELE ; COSTA, MAIARA ; CLASEN, BÁRBARA ; SANTI, ADRIANA ; MENEZES, CHARLENE ; **ENGERS, VANESSA KRUGER** ; LORO, VANIA LUCIA . Toxic Effects of Penoxsulam Herbicide in Two Fish Species Reared in Southern Brazil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **JCR**, v. 92, p. 81-84, 2014.
- **ENGERS, V. K.**; BEHLING, C. S. ; FRIZZO, M.N. . A Influência do Estresse Oxidativo no Processo de Envelhecimento Celular. Revista On line Contexto e Saúde da UNIJUI, 2011.

Apresentações de Trabalho

- **ENGERS, V. K.**; SOTT, G. M. ; FRIZZO, M.N. . A Influência do Estresse Oxidativo no Processo de Envelhecimento Celular. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- **ENGERS, V. K.**; SOTT, G. M. ; BEHLING, C. S. . Resistência Bacteriana. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Eventos

- I Congresso Internacional em Saúde da Unijuí- Saúde e Envelhecimento. A Influência do Estresse Oxidativo no Processo de Envelhecimento Celular. 2011. (Congresso).
- III Simpósio de Biomedicina. 2010. (Simpósio).
- V Semana Acadêmica de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010. (Simpósio).
- 36º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. 2009. (Congresso).

- II Simpósio de Biomedicina e II Mostra Científica- Hemoterapia: renovando o sistema sanguíneo. Resistência Bacteriana. 2009. (Simpósio).
- I Simpósio de Genética Molecular e Mostra Científica. 2009. (Simpósio).
- Aula Magna- Ciência e Sociedade- Que futuro nos espera?. 2008. (Encontro).
- Encontro da Associação Rio-Grandense de Apoio aos Diabéticos- Núcleo Santo Ângelo. 2008. (Encontro).
- I Encontro de Biomedicina do IESA. 2007. (Encontro).

Experiência Profissional:

- Secretaria de Saúde do Município de Santo Ângelo- Área Administrativa – Concursada (2008-2009)
- Laboratório Escola de Biomedicina CNEC/IESA – Estágio (2010)
- Laboratório de Análises Clínicas CLINISUL – Estágio (2010)
- ANALISA Laboratório de Análises Clínicas – Sócia proprietária: área prática e administrativa (2012-2014)
- CeMBE – Centro de Modelos Biológicos Experimentais PUCRS- Bioterista (Jan-Mai/2016)
- Laboratório de Biologia Genômica e Molecular PUCRS – Laboratorista (Atual)
- MESTRANDA: Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com término esperado para Ago/2016

Conhecimentos em Informática:

- Informática Intermediária em ambiente Windows
- Microsoft Office 2003-2010
- Internet

Idiomas:

- Inglês – Intermediário
- Espanhol – Básico

Porto Alegre, Agosto de 2016.