

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

Influências da reprodução no perfil oxidativo ao longo do envelhecimento de ratos machos

Tese de Doutorado

Tiago Boeira Salomon

Porto Alegre, Novembro de 2017.

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

Influências da reprodução no perfil oxidativo ao longo do envelhecimento de ratos machos

Tiago Boeira Salomon

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Mara da Silveira Benfato

Co-orientador: Lucas de Oliveira Alvares

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As agências financiadoras deste trabalho foram o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). T.B.S. recebeu bolsa de doutorado (CAPES).

“Posso não ter chegado ao destino pretendido, mas acredito ter acabado no lugar onde precisava estar.”

Douglas Adams – A longa e sombria hora do chá da alma

Índice

LISTA DE CONCEITOS UTILIZADOS NESTA TESE	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
Envelhecimento	10
Reprodução	19
Bioquímica redox	22
OBJETIVOS	40
Objetivo geral:	40
Objetivos específicos:	40
ARTIGO I	43
ARTIGO II	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO COMPLEMENTARES	69
REFERÊNCIAS	83
ANEXO I – CARTA DO CONSELHO DE ÉTICA	92
ANEXO II – CURRICULUM VITAE	93

Lista de abreviaturas

8-oxoG	8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosídeo
CAT	catalase
cGMP	guanosina monofosfato cíclica
CuZnSOD	superóxido dismutase cobre e zinco
Cys	cisteína
DST	doenças sexualmente transmissíveis
DTT	ditiotreitól
EO	estresse oxidativo
ERs	espécies reativas
ETC	cadeia transportadora de elétrons
FapyA	4,6-diamino-5-formamido-pirimidina
FapyG	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
GH	hormônio de crescimento
GMP	guanosina monofosfato
GPx	glutaciona peroxidase
GST	glutaciona S-transferase
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
LH	hormônio luteinizante
LHRH	hormônio liberador de hormônio luteinizante
MDA	malondialdeído
Met	metionina
MnSOD	superóxido dismutase manganês
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
PCA	análise de componentes principais
Prx	peroxirredoxinas
SOD	superóxido dismutase
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

Lista de conceitos utilizados nesta tese

Distresse oxidativo	aumento das condições fisiológicas, quando as espécies reativas chegam em níveis tóxicos
Envelhecimento	efeitos observáveis da passagem do tempo sobre um determinado organismo
Estresse oxidativo	o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização redox e/ou dano molecular
Eustresse oxidativo	condições fisiológicas de estresse oxidativo, necessária para a sinalização celular
<i>Fitness</i>	medida de sucesso reprodutivo
Histórias de vida	calendário de eventos importantes na vida de um organismo, como moldados pela seleção natural e / ou sexual
Longevidade	tempo esperado de vida de um organismo
Reprodução	processo de geração de um novo organismo através da combinação do material genético de dois organismos
Seleção natural	processo gradual, não aleatório pela qual as características biológicas se tornam mais ou menos comuns na população em função da reprodução diferencial de seus portadores
Seleção sexual	o processo de escolha de características morfológicas e comportamentais que levam ao cruzamento bem sucedido
Senescência	processo endógeno e hereditário de alterações cumulativas à estrutura molecular e celular, interrompendo o metabolismo com o passar do tempo, o que resulta em deterioração e morte
<i>Zeitgeber</i>	do alemão zeit "tempo" e geber "doador". Utilizado para se referir a elementos chave ambientais capazes de regular ciclos de relógios biológicos

Resumo

O envelhecimento pode ser definido como os efeitos observáveis da passagem do tempo sobre um determinado organismo. Muitas teorias emergiram para tentar elucidar os mecanismos responsáveis por este processo. Uma delas é a teoria dos radicais livres do envelhecimento postulando que um desequilíbrio entre espécies reativas e as defesas antioxidantes seria um fator determinante na senescência. A reprodução sexuada é uma atividade custosa para o organismo, requisitando um aporte energético elevado. O aumento de níveis energéticos tende a gerar mais espécies reativas. A fim de elucidar as possíveis influências da reprodução durante o processo de envelhecimento dos organismos inicialmente realizamos uma análise de correlações (totais e parciais) e de componentes principais do perfil redox de cinco órgãos diferentes (cérebro, rim, pulmão, coração e gônadas) de ratos wistar machos, em quatro idades diferentes (3, 6, 12 e 24 meses). Encontramos nas correlações parciais que a reprodução influenciava mais no perfil oxidativo dos animais do que o envelhecimento. Na análise de componentes principais encontramos que animais não reprodutores mantinham o perfil nas idades de 3, 6, e 12 meses e mudanças foram vistas na idade de 24 meses. Os reprodutores mostraram que 3 e 24 meses possuíam um perfil parecido, 6 e 12 diferiram entre si e do grupo de 3 e 24. Os níveis de testosterona aumentaram até a idade de 6 meses, e reduziram drástica e gradualmente até a idade de 24 meses, quando se igualaram aos níveis de não reprodutores. Os resultados mostraram que a reprodução influencia no perfil redox ao longo do processo de envelhecimento, provavelmente causada pelos efeitos da testosterona que estava elevada no grupo reprodutor. Para elucidar melhor estes efeitos vistos na análise de componentes principais no cérebro, realizamos um novo teste, agora em 4 regiões cerebrais distintas (córtex pré-frontal, cerebelo, hipotálamo e hipocampo). Durante a criação de animais encontramos discrepâncias no número de nascimentos por estação, com mais animais nascendo na primavera e menos no outono. Também vimos que na idade de seis meses os animais tiveram mais ninhadas que as outras idades. Os animais da segunda criação não apresentaram diferenças nos níveis de testosterona e o perfil redox de reprodutores e não reprodutores não apresentou diferenças significativas quando comparados entre si. A análise de componentes principais revelou uma divisão dos grupos em jovens (3 e 6 meses) e velhos (12 e 24 meses). Em geral o envelhecimento apresentou um aumento de dano e um aumento de defesas nas regiões estudadas, associado a uma redução da condição física e uma redução de memória. Como o cérebro é um órgão que demanda um aporte energético muito grande, ele fica exposto a espécies reativas (geração energética). Danos oxidativos no cérebro podem comprometer seriamente o organismo como um todo, uma vez que este centraliza o controle de processos vitais como respiração e circulação, e por isso espera-se uma habilidade elevada de conter danos. A diferença entre animais reprodutores e não reprodutores pode ter sido devido a não alteração dos níveis de testosterona presentes, alteração esta (testosterona elevada nos reprodutores) presente nos animais do primeiro estudo. Pelos resultados apresentados é possível ver que a reprodução influencia no perfil oxidativo dos animais ao longo do envelhecimento, possivelmente por ação da testosterona, elevada nos animais reprodutores.

Abstract

Aging can be defined as the observable effects of the passage of time on a given organism. Many theories have emerged to try to elucidate the mechanisms responsible for this process. One of them is the theory of free radicals of aging postulating that an imbalance between reactive species and antioxidant defenses would be a determining factor in senescence. Sexual reproduction is a costly activity for the body, requiring a high energy intake. The increase in energy levels tends to generate more reactive species. In order to elucidate the possible reproductive influences during the aging process of the organisms, we initially performed an analysis of correlations (total and partial) and performed a principal components analysis of the redox profile of five different organs (brain, kidney, lung, heart and gonads) male Wistar rats at four different ages (3, 6, 12, and 24 months). We found in the partial correlations that the reproduction influenced more in the profile of the animals than aging. In the analysis of principal components we found that non-breeding animals maintained the profile at the ages of 3, 6, and 12 months and changes were seen at the age of 24 months. Breeders showed that 3 and 24 months had a similar profile, 6 and 12 differed from each other and from group 3 and 24. Between the ages of 6 and 12, testosterone levels decreased dramatically. The results showed that reproduction influences the redox profile throughout the aging process, probably caused by the effects of testosterone that was elevated in the reproductive group. To further elucidate these effects seen in the analysis of major components in the brain, we performed a new test, now in 4 distinct brain regions (prefrontal cortex, cerebellum, hypothalamus and hippocampus). During breeding we found discrepancies in the number of births per season, with more animals being born in the spring and less in the autumn. We also saw that at the age of six months the animals had more litters than the other ages. The animals of the second breeding did not present differences in testosterone levels and the redox profile of breeding and non breeding animals did not present significant differences when compared to each other. The analysis of the main components revealed a division of the groups into young (3 and 6 months) and old (12 and 24 months). In general, aging showed an increase of damage and an increase of defenses in the studied regions. Because the brain is an organ very exposed to reactive species, and damage can seriously compromise the organism, a high ability to contain damage is expected. The difference between breeding and non-breeding animals may have been due to non-alteration of testosterone levels, this alteration (high testosterone in breeding animals) was present in the animals of the first study.

Introdução

Envelhecimento

Envelhecimento pode ser considerado o declínio irreversível da performance fisiológica ao longo do tempo, que progressivamente reduz as chances de sobrevivência dos organismos (Knobil, 2006). É um processo comum de organismos multicelulares, porém sua evolução e seus mecanismos básicos (como e o porquê envelhecemos) ainda carecem de respostas satisfatórias, embora muito esforço acadêmico seja dedicado a elas (Kenyon, 2010; Partridge, 2010).

Nossa falta de compreensão do processo de envelhecimento pode se dar devido à complexidade do mesmo, uma vez que as taxas de expectativa de vida variam muito entre espécies, como por exemplo, tartarugas do gênero *Terrapene* possuem uma variação de mais de 100 anos em sua expectativa de vida (*Terrapene carolina* com 138 anos e *Terrapene ornata* com 39) (Nigrelli, 1954; Behler e King, 1979) e mesmo dentro de uma mesma espécie – lepidópteras *Heliconius erato phyllis* são consideradas borboletas longevas, porém são descritas com uma ampla faixa de longevidade, alguns pesquisadores mais conservadores descrevem a expectativa de vida como 100 dias outros mais otimistas descrevem como 6 meses (Turner, 1971; Gilbert, 1972).

Existem diversas teorias de modelos evolucionários para o envelhecimento, porém estes são incapazes de produzir uma explicação satisfatória para esta variação na expectativa de vida encontrada entre e intra espécies. Por causa desta falta de explicações satisfatórias, teorias multifatoriais como forma de melhor compreender o processo de envelhecimento e senescência vem

aumentando em popularidade. E para melhor entender estas teorias modernas, é importante conhecer o histórico que levou ao seu desenvolvimento.

Um breve histórico das teorias de envelhecimento

Em 1889 Weismann, um evolucionista alemão, teorizou inicialmente que o envelhecimento era parte do “programa da vida” uma vez que a velha geração deveria retirar-se para dar lugar a uma nova, possibilitando assim as mudanças necessárias para a evolução. Esta teoria teve um apelo intuitivo, porém, apresenta apenas um propósito para o envelhecimento, sem um mecanismo pelo qual esse processo ocorre (Weismann *et al.*, 1891).

O envelhecimento pode ter essa vantagem, proposta por Weismann, para a comunidade mas isso não explica como os indivíduos adquiriram a característica que os tornam velhos, ou porque comunidades com indivíduos envelhecidos seriam mais bem sucedidas do que outras com indivíduos que não possuíam tais características. Weismann abandonou posteriormente sua teoria.

Em 1908, Max Rubner, um fisiólogo alemão, propôs a teoria de velocidade de vida, na qual sugeriu que animais com menor taxa metabólica teriam uma maior expectativa de vida. Esta teoria foi revisada e expandida por Raymond Pearl em 1928, com experimentos em *Drosophila melanogaster* e sementes de melão e em seu livro “The rate of living” concluiu que a expectativa de vida está inversamente relacionada com a taxa metabólica (Rubner, 1908).

Embora sejam apresentadas várias pequenas evidências desta teoria, um trabalho publicado em 2007 por Magalhães e colaboradores mostrou que não

existia nenhuma correlação entre longevidade e a taxa metabólica de mamíferos e aves (Magalhães *et al.*, 2007).

Teorias em que a deterioração e a morte devido ao envelhecimento são um resultado proposital de um design evoluído a partir de um organismo (como a teoria da morte programada de Weismann) são referidas como teorias de envelhecimento programado ou envelhecimento adaptativo.

Embora a idéia de que uma característica “envelhecimento” poderia ter sido selecionada (uma adaptação) por causa de seu efeito deletério (morte dos indivíduos) foi amplamente desconsiderada durante grande parte do século 20, porém modelos teóricos (simulações *in silico*) confirmam a possibilidade do surgimento desta característica em situações pontuais. Yang (2013) demonstrou em sua simulação (baseada em indivíduos) que existe a possibilidade do surgimento da morte programada (altruista), em uma população viscosa (população amplamente distribuída porém com limitada dispersão de prole) com conflitos de habilidade e um ambiente variável. Uma vez que os recursos seriam limitados, os animais mais velhos morreriam, assim permitindo a sobrevivência (acesso a recursos) de uma população jovem mais apta geneticamente.

A primeira teoria moderna do envelhecimento dos mamíferos foi formulada por Peter Medawar em 1952, chamada de teoria do acúmulo de mutações, onde o envelhecimento é causado por uma predeterminação genética, possuindo um relógio biológico, que dita o ritmo de envelhecimento (Medawar, 1952).

A teoria surgiu em discussões, na década anterior, com J. B. S. Haldane e o conceito de “sombra de seleção”, onde o envelhecimento seria uma questão de

negligência do corpo em se proteger. A sombra da seleção é o período após a reprodução, onde a espécie não seria mais influenciada pela geração antiga. Assim não haveria muitas razões pelas quais o corpo deveria permanecer apto por um longo período de tempo - não há muita pressão de seleção para traços que manteriam a viabilidade após o tempo em que a maioria dos animais morreria de qualquer maneira, morto por predadores, doenças ou acidentes, uma vez que a natureza é um lugar altamente competitivo, e quase todos os animais na natureza morrem antes de atingir a velhice (Hamilton, 1966; Fabian e Flatt, 2011).

Segundo Medawar o mecanismo de ação envolveria mutações aleatórias e prejudiciais que mostram seu efeito apenas no final da vida e estas não seriam eliminadas eficientemente causando o envelhecimento (Medawar, 1952).

A genética moderna revelou um possível problema com o conceito de acúmulo de mutações visto que os genes são tipicamente expressos em tecidos específicos em momentos específicos. A expressão é controlada por algum fator genético que ativa diferentes genes em diferentes momentos no desenvolvimento normal, e vida cotidiana do organismo. Os defeitos nos genes causam problemas (doenças genéticas) quando não são devidamente expressos quando necessário. Um problema no final da vida sugere que o programa genético exigiu a expressão de um gene apenas no final da vida e a mutação impediu a expressão adequada. Isso implica na existência de um programa que exige a expressão de genes diferentes em diferentes pontos da vida.

O conceito de Medawar sugere que o processo evolutivo é afetado pela idade em que um organismo é capaz de reproduzir. As características que

afetaram negativamente um organismo antes dessa idade limitarão severamente a capacidade do organismo de propagar suas características e, portanto, seriam negativamente selecionadas pela teoria da seleção natural. As características que causaram os mesmos efeitos adversos que só apareceram bem depois dessa idade reprodutiva teriam um efeito relativamente pequeno sobre a capacidade do organismo de se propagar e, portanto, seriam neutros ou positivamente selecionados. Este conceito corrobora com a multiplicidade observada de períodos de vida dos mamíferos (e idades diferentes da maturidade sexual) e é importante para todas as teorias subsequentes do envelhecimento (Medawar, 1952; Fabian e Flatt, 2011).

Teorias modernas

Uma vez que existem várias teorias para as causas do envelhecimento, é possível classificar as teorias, em apenas duas grandes correntes, as teorias programadas e as estocásticas (Kirkwood e Melov, 2011).

As teorias programadas argumentam que o envelhecimento é regulado por fatores intrínsecos do organismo como, por exemplo, mudanças na expressão gênica afetariam a manutenção, reparo e defesa deste organismo. Um exemplo de teoria programada seria o antagonismo pleiotrópico (Williams, 1957).

As teorias estocásticas discorrem que os organismos são afetados por fatores extrínsecos, e estes induziriam a danos cumulativos em vários níveis. Podemos citar como danos cumulativos os causados por espécies reativas e um exemplo de teoria estocástica seria o soma descartável (Kirkwood, 1977).

Antagonismo pleiotrópico

A teoria de Medawar foi expandida por George C. Williams em 1957, que observou que a senescência pode estar causando muitas mortes, mesmo que os animais não estejam "morrendo de velhice". Nos primeiros estágios da senescência, um animal pode perder um pouco da sua velocidade, aumentando suas chances de ser predado, enquanto os animais mais jovens teriam mais chances de fugir. Williams reforçou que a natureza é um lugar tão competitivo, que mesmo "um pouco" de senescência pode ser fatal (Williams, 1957).

A objeção de Williams provou-se em estudos modernos de demografia em ambientes naturais os quais demonstraram que a senescência realmente contribui substancialmente para a taxa de mortalidade na natureza. Essas observações lançam dúvidas sobre a teoria de Medawar.

Então, em 1957, Williams propôs sua própria teoria chamada antagonismo pleiotrópico. Pleiotropia é a capacidade de um gene determinar mais de um efeito no fenótipo. No antagonismo pleiotrópico, um desses efeitos é benéfico e outro é prejudicial. Ou seja, genes que ofereceriam benefícios no início da vida, exigiriam um custo mais tarde (Williams, 1957).

Dos muitos genes de envelhecimento que foram relatados, alguns parecem aumentar a fertilidade no início da vida, ou trazer algum outro benefício. Mas há outros genes de envelhecimento para os quais nenhum benefício correspondente foi identificado. Pode-se pensar nestes genes como uma validação parcial da teoria, mas eles destoam da premissa central da teoria de Williams.

Soma descartável

A teoria do soma descartável, postulada por Thomas Kirkwood (1977), propõe que o indivíduo possui uma quantidade de energia, obtida através da alimentação, para ser utilizada no metabolismo, reprodução, reparo e manutenção do corpo (soma). Uma vez que o suprimento de comida é finito, não seria possível realizar todas as funções mencionadas, obrigando o indivíduo a priorizar a quantidade de energia a ser alocada em cada função. Então um aumento na quantidade de energia alocado para reprodução, por exemplo, levaria a uma redução na energia disponível para as funções de reparo e manutenção fazendo assim com que o corpo se deteriorasse gradualmente com a passagem do tempo.

Existem argumentos contrários a teoria do soma descartável (Lenart e Bienertová-Vašků, 2017), como a ideia que o *fitness* seria uma força evolutiva fraca ou que as modificações do tecido germinativo não devem influenciar o tecido somático. Ou ainda levantando o ponto da restrição calórica (RC), uma vez que a teoria invoca o alimento como recurso limitante e animais sob RC tem um aumento em sua expectativa de vida (Rebrin *et al.*, 2003). Porém uma redução no gasto energético levaria a uma redução nos danos gerados por espécies reativas, reduzindo assim o custo para manutenção e reparo, por exemplo. Embora criticada um número de evidências crescente continua a apoiar essa teoria.

Radicais livres

Radicaís livres foram descobertos no final do século XIX, mas seus efeitos biológicos só começaram a ser discutidos na metade do século seguinte.

Em 1956, Denham Harman publicou a teoria de envelhecimento por radicais livres onde postulou que o envelhecimento se daria por um acúmulo de

dano causado por radicais livres de oxigênio. Após anos de tentativas frustradas de aumentar a expectativa de vida com antioxidantes, Harman passou a considerar a mitocôndria, que produzia espécies reativas e era afetada por eles e, uma vez que elas não eram afetadas por suplementos de antioxidantes, seriam a causa do envelhecimento (Harman, 1956). Em 1972 Harman expandiu sua teoria de envelhecimento, com a inclusão das mitocôndrias. Acrescentando que, como a vida máxima de um organismo é determinada pela taxa de utilização de oxigênio, que gera espécies reativas danosas a mitocôndria, os danos acumulariam resultando em menor eficiência na utilização do oxigênio, e este ciclo levaria a morte (Harman, 1972).

Durante as décadas seguintes, a teoria foi acumulando evidências e foi modificada, acrescentando ao dano e a produção de energia, os níveis de antioxidantes e as espécies reativas de outros elementos (e.g. nitrogênio). Com essas modificações passou a ser conhecida como a teoria de estresse oxidativo, termo cunhado em 1985 por Helmut Sies (Sies *et al.*, 1985), sendo bastante popular nos anos 90. No início dos anos 2000 ela passou a ser muito criticada, principalmente pela incapacidade dos pesquisadores da área biomédica de estender significativamente a expectativa máxima de vida. Também foram publicados trabalhos com dados contrários a teoria, sendo declarada morta por muitos autores (Azzi, 2007; Pérez *et al.*, 2009).

Embora muito criticada na área biomédica, a teoria passou a ganhar seguidores na área eco-evolucionária, com o aumento da popularidade de estudos de estresse oxidativo sendo incorporados em estudos de histórias de vida. No final da primeira década de 2000 as espécies reativas de oxigênio

estavam sendo consideradas importantes mediadores dos custos da reprodução por diversos pesquisadores, incorporando assim a teoria de envelhecimento por estresse oxidativo a teoria evolutiva do soma descartável (Costantini, 2008; Dowling e Simmons, 2009; Selman *et al.*, 2012; Sohal e Orr, 2012).

Em 2015 Jones publicou uma expansão a teoria do estresse oxidativo, baseada no código redox publicado por ele em conjunto com Sies em 2007 (Sies e Jones, 2007), chamando a nova teoria de teoria redox do envelhecimento. Postulando que o envelhecimento é um declínio na plasticidade da interação genoma-exossoma que ocorre como consequência da execução de diferenciações e sistemas de memórias a exposições (Fig. 1) Incluindo assim questões bioenergéticas, decréscimo das defesas e redução de fertilidade. Também levou em conta marcos do envelhecimento, como telômeros, função imune, integridade mitocondrial, por exemplo (Jones e Sies, 2015).

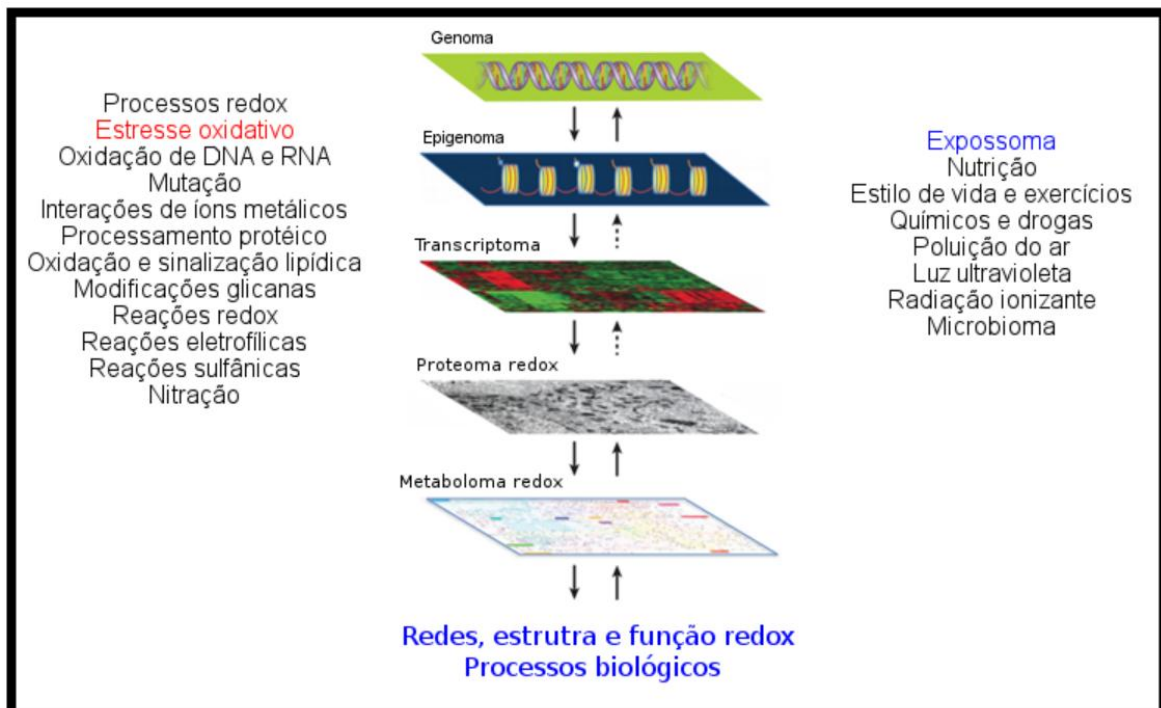


Figura 1: Processos redox tem implicações fundamentais em processos biológicos. Estresse oxidativo permeia todos os níveis, de manutenção do genoma até metaboloma redox. Metabolismo endógeno e impacto exógeno, demonstrado como esossoma, afetam todos os processos biológicos através de redes redox. Adaptado de (Sies *et al.*, 2017).

Reprodução

A reprodução é o processo biológico pelo qual novos organismos individuais são produzidos a partir de outros, é uma característica fundamental de toda a vida conhecida. Existem duas formas de reprodução: assexuada, onde um organismo pode se reproduzir sem o envolvimento de outro organismo, e a sexuada que envolve a interação de dois indivíduos. Esta tese focará apenas no segundo tipo.

A reprodução é um processo caro, complicado e perigoso. A seleção e procura por parceiros consome tempo e energia, aumentando o risco de ser predado, por estar exposto. Já a seleção do parceiro também é importante, pois a prole gerada tem que possuir capacidade de se reproduzir também. Esta seleção pode ter muitas formas. Em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) a fêmea escolhe o macho baseado na coloração avermelhada da face e região anal do macho, julgando machos mais avermelhados como mais aptos (Waitt *et al.*, 2003).

Uma vez encontrado o parceiro em potencial, outros esforços são exigidos, investimentos adicionais para o parceiro concordar em cooperar. Nas aves-do-paraíso (família Paradisaeidae), que possuem uma ampla variedade de estratégias reprodutivas, o gênero *Paradisaea* utiliza um acasalamento lek, onde vários machos fazem uma exibição competitiva para convencer as fêmeas visitantes. Já no gênero *Cicinnurus*, este processo de exibição é individual e o macho realiza

uma dança elaborada para convencer as fêmeas (Heads, 2001; Irested *et al.*, 2009). Outro extremo dos rituais de acasalamento é o comportamento agonístico, onde os machos brigam para demonstrar qual é o mais forte podendo levar a lesões sérias nos animais (embora isso seja incomum). Este comportamento não é limitado a interações macho-macho, gorilas-do-ocidente (*Gorilla gorilla*) o macho dominante realiza este tipo de interação com as fêmeas, na maioria dos casos este processo é relacionado a corte (Goodenough *et al.*, 2009).

A própria cópula pode expor os indivíduos envolvidos a doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), que podem ser verticais ou horizontais (Smith e Dobson, 1992). A transmissão horizontal se dá de um parceiro para outro, um exemplo seria o do vírus do papiloma em macacos rhesus (RhPV-1). O RhPV-1 é um vírus de DNA de natureza oncogênica, transmitido pelo contato genital, que infecta os queratinócitos. Pode causar câncer no colo uterino, vulva, pênis e ânus (Ostrow *et al.*, 1990). Já a forma vertical ocorre de mãe para feto e um exemplo seria o da leishmaniose canina, uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, endêmica de diversas regiões tropicais e subtropicais. Embora também seja uma doença de transmissão horizontal, diversos casos de transmissão vertical foram reportados (Rosypal *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2009; Naucke e Lorentz, 2012).

Finalmente o indivíduo pode não ter um sucesso reprodutivo. Considerando que sucesso reprodutivo é a capacidade de passar adiante os genes para a próxima geração de uma forma em que esta também possa transmitir adiante seus genes, um fracasso reprodutivo poderia vir de uma prole gerada com um baixo *fitness* (ω) ou ainda ser infértil. *Fitness* é uma representação quantitativa de

seleção sexual em biologia evolucionária. Pode ser definido de acordo com o genótipo ou fenótipo em um ambiente específico, e define o sucesso reprodutivo individual com base na contribuição genética da prole gerada por indivíduos de um mesmo genótipo ou fenótipo (Freeman e Herron, 2004). A medida de *fitness* não leva em conta a longevidade ou a expectativa de vida, apenas a capacidade de um indivíduo de uma dada população deixar mais prole. Um baixo *fitness* da prole indicaria que a prole de um fenótipo (indivíduo) seria menos capaz de deixar descendentes do que a prole de outro.

Com toda esta problemática, qual seria a vantagem da reprodução sexuada?

Considerando reprodução sexuada um processo que envolve meiose com *crossing over* e cruzamento entre indivíduos não aparentados, este processo gera uma recombinação genética. Esta recombinação é muito importante uma vez que o ambiente é mutável, e uma espécie com maior variabilidade genética possui maior chance de sobreviver a estas variações (Freeman e Herron, 2004).

Os custos da reprodução são muito importantes para as teorias de histórias de vida, onde um maior investimento em reprodução poderia levar a redução de um possível futuro sucesso reprodutivo (trade-off) (Kirkwood, 2001). Este processo já foi observado em diversas espécies, porém os mecanismos pelos quais ele ocorre ainda não estão claros. Uma explicação para isso seriam os danos causados pelo estresse oxidativo, uma vez que um aumento da taxa metabólica pode levar a um aumento de espécies reativas e este aumento não pode ser controlado ou reparado pelas defesas antioxidantes. Este aumento

levaria a uma perda de funções celulares, resultando na morte da mesma (Olsson *et al.*, 1997; Wiersma *et al.*, 2004; Harshman e Zera, 2007).

Bioquímica redox

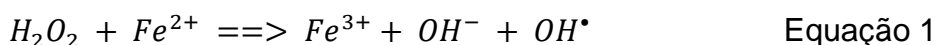
Espécies reativas (ER) são elementos que reagem, por reações redox, com as moléculas biologicamente relevantes incluindo proteínas, lipídios, carboidratos, e ácidos nucleicos. Podem ser classificados em radicalares e não-radicalares (tabela 1). Espécies reativas radicalares, ou radicais livres, possuem, pelo menos, um elétron desemparelhado em alguma de suas camadas de valência, por isso são muito instáveis e reativos.

Tabela 1 – Espécies reativas radicalares e não radicalares – adaptado de Sies *et al.* (2017)

Radicalares	Não-radicalares
Espécies reativas de oxigênio	
Radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Radical hidroxil (OH^{\cdot})	Hidroperóxido orgânico (ROOH)
Radical peróxil (ROO^{\cdot})	Oxigênio singleto ($O_2 \Delta_g$)
Radical alcóxil (RO^{\cdot})	Carbonilas excitadas eletronicamente (RCO)
	Ozônio (O_3)
Espécies reativas de cloro/bromo	
Cloro atômico (Cl^{\cdot})	Hipoclorito (OCl^-)
Bromo atômico (Br^{\cdot})	Cloraminas (RNHCl)
	Hipobromito (OBr^-)
Espécies reativas de nitrogênio	
Óxido nítrico = monóxido de nitrogênio (NO^{\cdot})	Nitrito (NO_2^-)
Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot})	Anion nitroxil (NO^-)
	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
	Peroxinitrato (O_2NOO^-)
	Nitrosoperoxicarbonato ($ONOOCO_2^-$)
Espécies reativas de Enxofre	
Radical tiil (RS^{\cdot})	Tiol (RSH), Tiolato (RS^-) [e.g., glutationa (GSH), tioredoxina (Trx)]
	Disulfeto (RSSR) [p.e. GSSG]
	Sulfenato (RSO^-)
	Sulfinato (RSO_2^-)
	Sulfonato (RSO_3^-)
	Sulfeto de hidrogênio (H_2S)
	Polissulfureto (H_2S_x), x = 2 or higher; RSSH
Espécies reativas de carbonila	
	Acetaldeído
	Acroleína
	Metilglioxal
	4-Hidroxi-nonenal
	Carbonilas eletronicamente excitadas (tripletos)
Espécies reativas de selênio	
	Selenite
	Selenato
	Selenocisteína
	Selenometionina

ERs atuam, como mediadores químicos e sinalizadores celulares com diferentes papéis fisiológicos dentro das células. Atuam em diferentes níveis abrangendo desde o nível de reações enzimáticas simples até o nível transcricional.

O radical hidroxil é o radical mais reativo conhecido *in vivo*. Formado principalmente por meio das reações de Fenton, em que o peróxido de hidrogênio reage com um metal de transição (Fe^{2+} ou Cu^+) formando dois hidróxidos, sendo um deles um radical e o outro apenas um íon (Eq.1) onde o peróxido de hidrogênio reage com um radical superóxido formando oxigênio molecular e também dois hidróxidos. Por ser extremamente reativo, ele (radical hidroxil) interage com outros elementos celulares imediatamente após ser formado, tendo uma meia vida (*in vivo*) de aproximadamente 10^{-9} segundos (Kumar *et al.*, 2011; Halliwell e Gutteridge, 2015).



Úlceras venosas crônicas na perna de humanos tem maior dificuldade de cicatrização quando ocorre uma sobrecarga de ferro na população local de macrófagos que leva a uma ativação de um estado M1 pró-inflamatório (com a liberação de citocinas pró-inflamatórias – p.ex. Fator de necrose tumoral - α). Através do aumento de TNF- α e a liberação de radicais hidroxil (sobrecarga de ferro), esta população de macrófagos perpetua a inflamação e induz um estado

de senescência dependente de p16(INK4a) em fibroblastos (Wlaschek e Scharffetter-Kochanek, 2005).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é simultaneamente um ânion e um radical, formado quando um elétron é adicionado à molécula de O_2 . É um subproduto da respiração celular, na membrana interna da mitocôndria (complexos I, II e III). Pode também ser formado em outras organelas, como o retículo endoplasmático (RE) (Halliwell e Gutteridge, 2015). Um exemplo de como superóxido é formado no RE seria pela NADPH oxidase 4 (Nox4), que associada com a proteína p22phox utiliza o NADPH ou NADH como doador de elétrons para a redução de oxigênio, produzindo superóxido como um subproduto (Katsuyama, 2010; Fukai e Ushio-Fukai, 2011).

O radical superóxido está envolvido em diversas doenças (Fig. 2). Nos vasos sanguíneos alterações nos níveis de $O_2^{\bullet-}$ influenciam expressão gênica, tônus vascular, inflamação, crescimento celular, sinalização e apoptose (Halliwell e Gutteridge, 2015).

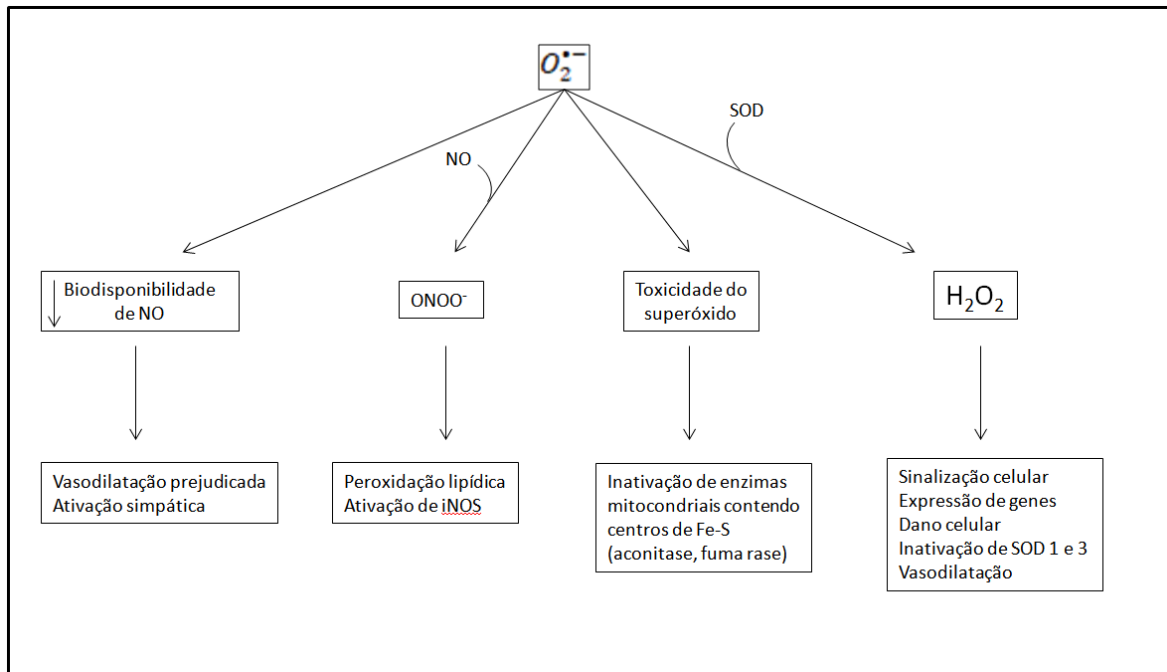


Figura 2: Efeitos do superóxido em diferentes situações. Adaptado de Fukai e Ushio-Fukai (2011)

Neutrófilos secretam superóxido para ajudar no combate a micro-organismos ingeridos, Este aumento de superóxido, serve para recrutar mais neutrófilos ativando um fator quimiotático latente, sendo assim pró-inflamatório (Segal, 2005).

O óxido nítrico (NO[•]) é um radical estável em meio aquoso, e, em condições fisiológicas sua meia-vida varia de 2ms até 2s, dependendo do compartimento celular em que se encontra. Produzido, em mamíferos, pela oxidação da L-arginina catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada e Higgs, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2015). Existem três isoformas da NOS, endotelial (NOS 1), neuronal (NOS 3) e induzível (NOS 2). Todas as isoformas são dependentes de cálcio, porém, enquanto NOS 1 e NOS 3 geram poucas quantidades de NO[•], a forma NOS 2 gera grandes quantidades podendo chegar a níveis citotóxicos (Nathan e Xie, 1994; Rosselli *et al.*, 1998).

É um importante regulador e mediador de inúmeros processos (Fig. 3). Como exemplos é possível citar que no sistema nervoso atua como neurotransmissor, no sistema cardiovascular é um vasodilatador e no sistema imune pode mediar citotoxicidade de macrófagos contra células tumorais.

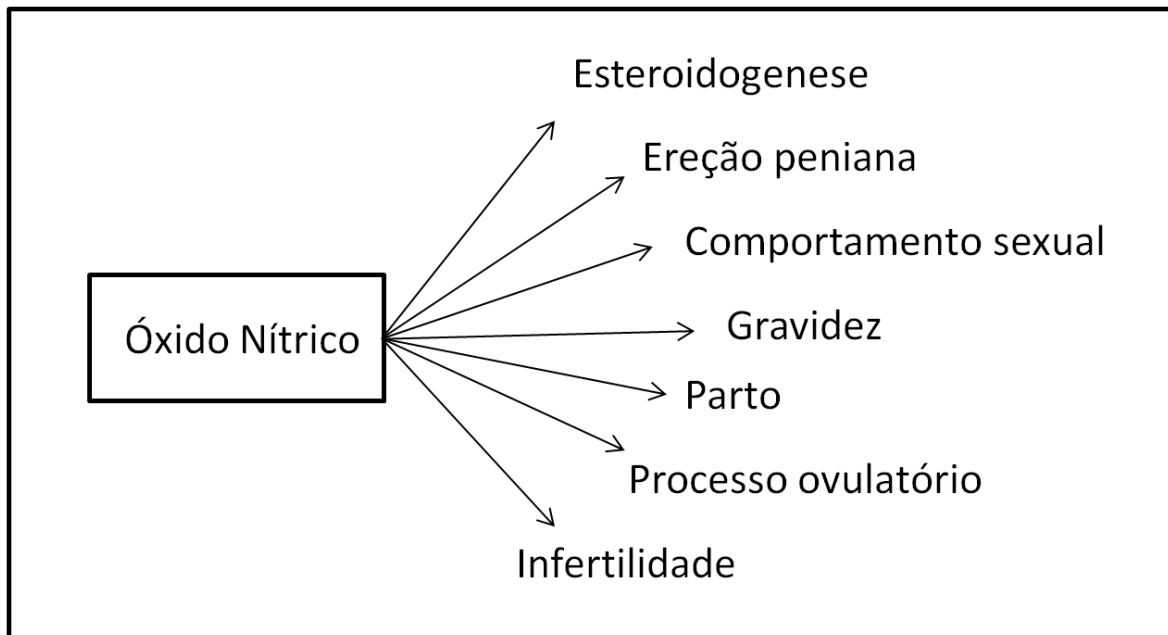


Figura 3. Processos reprodutivos influenciados pelo óxido nítrico

Na reprodução o óxido nítrico desempenha um papel importante. Ele ativa a liberação de hormônio luteinizante (LH) (através dos hormônios liberadores de hormônio luteinizante - LHRH), no cérebro. O LH atinge a hipófise sinalizando para a liberação de gonadotrofinas, que por sua vez estimulam a síntese neuronal de NO^* (via NOS-1) na hipófise (Canteros *et al.*, 1996).

Em machos, mais especificamente no pênis, o NO^* ativam a guanilato ciclase solúvel no músculo liso dos corpos cavernosos, gerando cGMP que provoca o relaxamento do músculo liso do pênis permitindo assim a entrada de sangue através das artérias penianas causando a ereção (Burnett *et al.*, 1992). O

cGMP é hidrolisado de novo a GMP pela enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) (Fig. 4).

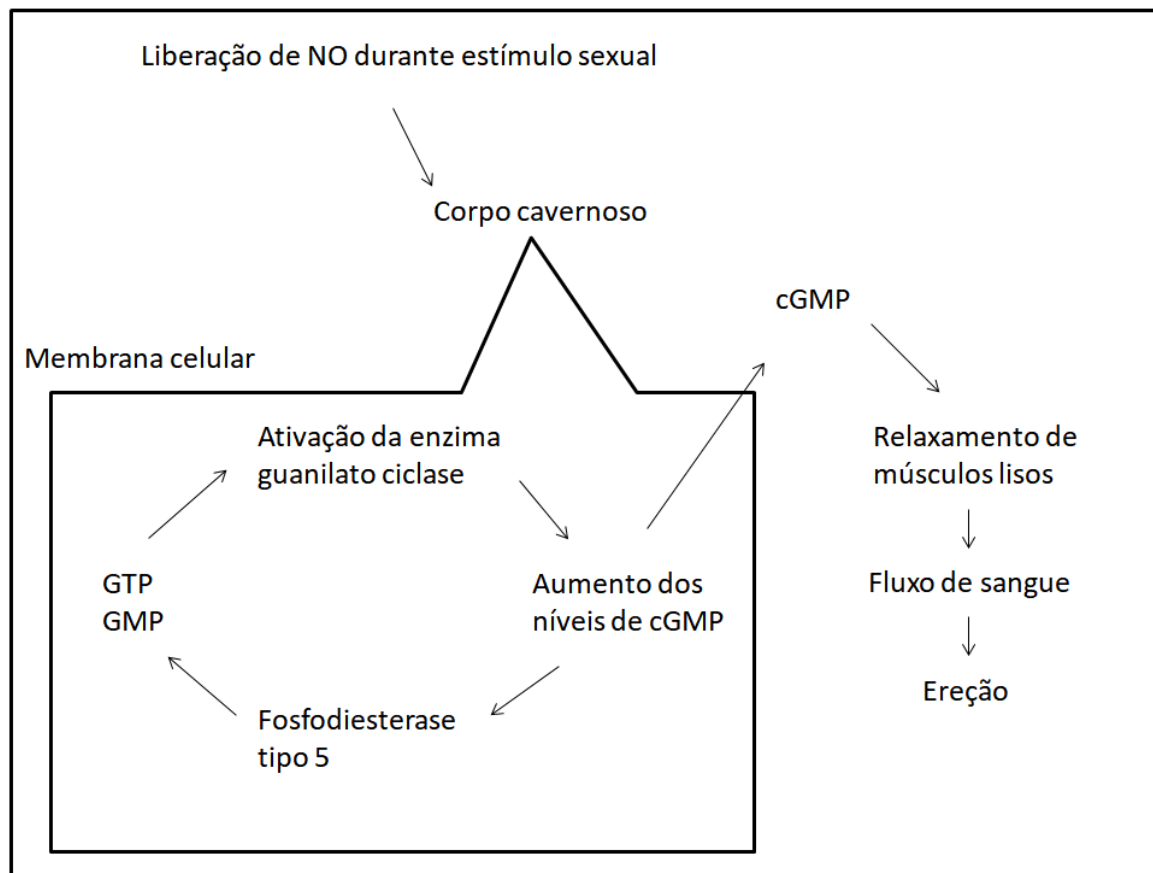


Figura 4: Influência do óxido nítrico na sexualidade masculina

Em fêmeas o NO influencia o comportamento sexual (em ratas é responsável pelo comportamento de lordose). O NO^{*} estimula a formação de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a angiogênese do corpo lúteo em formação e pode ser um importante agente regulatório para esteroidogênese e angiogênese folicular em bovinos (Skarzynski *et al.*, 2003; Pancarci *et al.*, 2011).

O peróxido de hidrogênio H₂O₂ é uma espécie reativa não radicalar formada por diversas vias (Fig. 5), podendo ser produzido extracelularmente por fagócitos,

por exemplo. Ânions superóxidos, produzidos pela citocromo c oxidase na mitocôndria ou por fatores de crescimento, citocinas e integrinas estimulam a ativação de NADPH oxidase no citosol são rapidamente convertidos a peróxido de hidrogênio pela atividade da enzima superóxido dismutase, tanto no citosol como na mitocôndria.

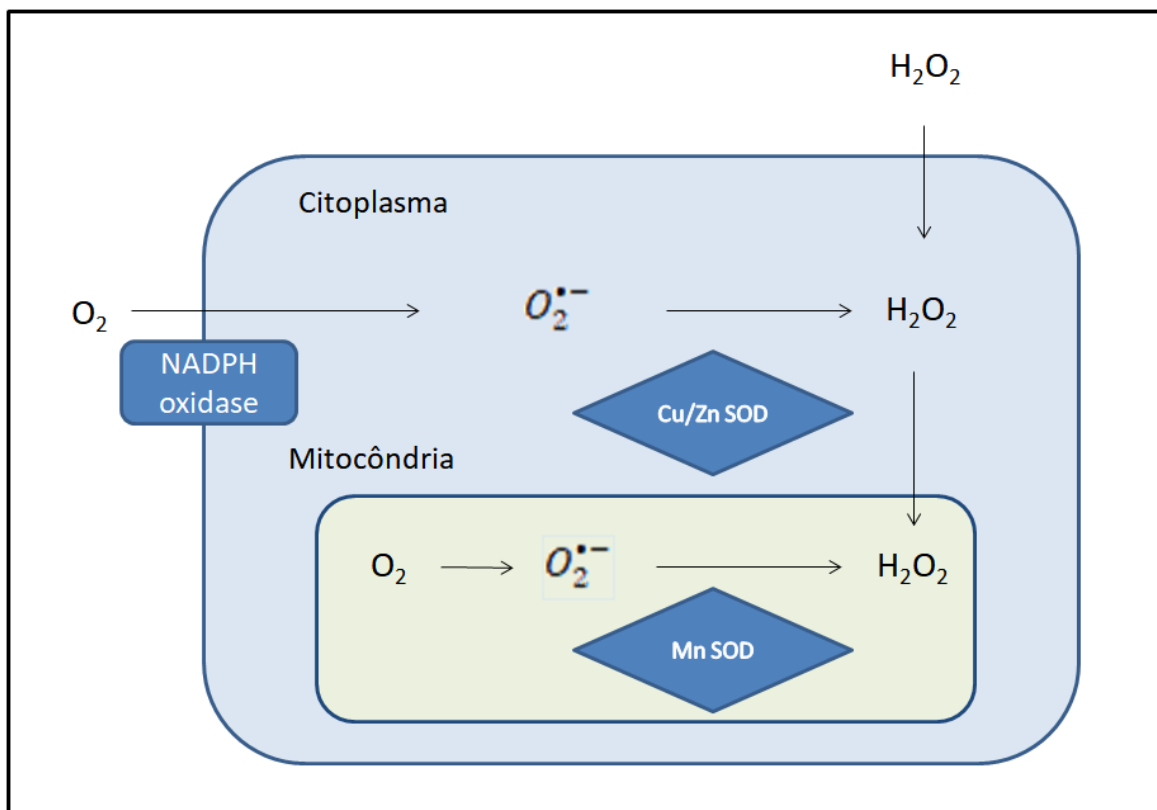


Figura 5: Células eucarióticas são expostas a diferentes fontes de peróxido de hidrogênio. Figura adaptada de Veal *et al.* (2007).

Atua em diversos processos celulares (Fig. 6), podendo influenciar, por exemplo, respostas imunológicas e remodelamento vascular. Ao reagir com metais de transição, forma o radical hidroxil (reação de Fenton) (Halliwell e Gutteridge, 2015).

O peróxido de hidrogênio é uma molécula sinalizadora de resposta a estímulos extracelulares, como a insulina por exemplo. Essa produção de H_2O_2 em resposta a sinalização da insulina é necessária para a propagação intracelular do estímulo. Alterações disruptivas nesta sinalização podem vir de uma superexpressão da capacidade celular de reduzir H_2O_2 , por exemplo, por selenoproteínas que estão associada a diabetes tipo 2 (Winterbourn, 2013; Marinho *et al.*, 2014).

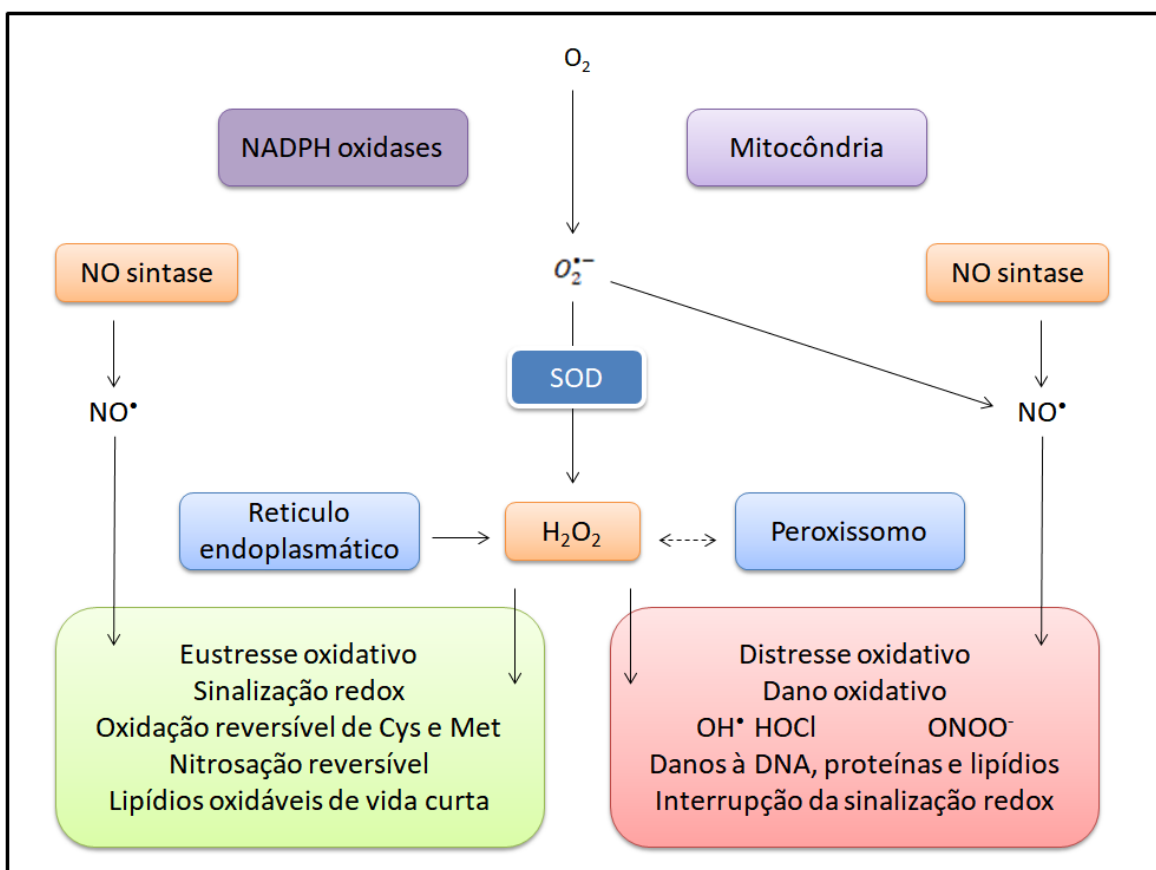
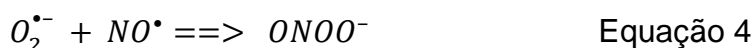


Figura 6: Papel do peróxido de hidrogênio e do óxido nítrico na sinalização redox. Cys, cisteína; Met, metionina; NADPH, fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido; SOD, superóxido dismutase. Figura adaptada de Sies *et al.* (2017).

O peroxinitrito (ONOO^-) é uma espécie reativa não radicalar, formado através da reação do radical superóxido com o óxido nítrico (Eq. 4).



O peroxinitrito é utilizado por macrófagos no combate a micro-organismos invasores (p. ex. *Trypanosoma cruzi*). Em resposta a um estímulo feito por citocinas, a expressão de NOS2 aumenta. Quando o macrófago interage com o patógeno, NAPH oxidase (presente na membrana) inicia uma liberação de superóxido. Assim, com a liberação de NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ temos a rápida formação de peroxinitrito. Esta formação causa severas alterações na homeostase de cálcio e energia em *T. cruzi*. Também causa a depleção de tripanotona e citotoxicidade (Alvarez *et al.*, 2004).

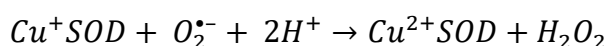
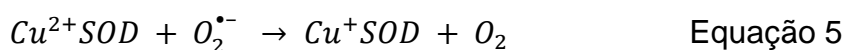
Como visto, apesar de as espécies reativas agirem como mensageiros celulares, elas podem também causar danos a componentes celulares. Estes danos podem ocorrer, na membrana, alterando a permeabilidade da mesma, através de uma cadeia de peroxidação lipídica, por exemplo; no DNA, podendo acarretar erros na transcrição ou na tradução e inclusive quebra da fita dupla. Um exemplo de ação seria a da inserção de um OH^\bullet à guanina nas posições 4, 5 ou 8 do anel purínico assim, por adição a C-4 e C-8, e em menor proporção com C-5, gerando 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG), 4,6-diamino-5-formamido-pirimidina (FapyA), 8-oxo-7,8-diidro-2'-

desoxiguanosídeo (8-oxoG). Para combater estes efeitos deletérios, os organismos desenvolveram defesas, que são chamadas de antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Antioxidantes são moléculas que são capazes de prevenir, inibir ou desfazer o dano oxidativo de outras moléculas. Podem ser classificadas como enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as enzimáticas temos, como exemplo, a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase, as peroxiredoxinas, entre outras.

A enzima superóxido dismutase (SOD) (Fukai e Ushio-Fukai, 2011), catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e água (Eq.5). Mamíferos possuem três tipos de SOD, duas possuem cobre (Cu) em seu sítio ativo, uma intracelular (constituída de duas subunidades) e uma extracelular (constituída de quatro subunidades), o terceiro tipo, possui manganês (Mn) em seu sítio ativo, e esta está localizada na mitocôndria.

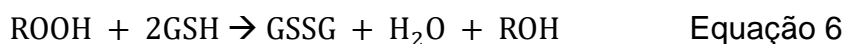
A CuZnSOD intracelular é encontrada em quase todas as células eucarióticas. Em mamíferos está presente no citosol, lisossomos, núcleo, peroxissomos e na mitocôndria (espaço intermembrana). Pode ser inibida por cianetos.



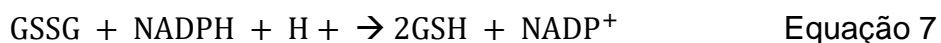
Já a CuZnSOD extracelular é secretada para o espaço extracelular e forma um homotetrâmero glicosilado, que fica ancorado na matriz extracelular e superfície celular (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A MnSOD é mais sensível a desnaturação por calor, solventes orgânicos e detergentes do que a CuZnSOD. Localizada dentro da mitocôndria ela é formada por quatro subunidades proteicas (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A família das glutathione peroxidases (GPx), possui um átomo de selênio (Se) em seu sítio ativo, atua na degradação de peróxidos no organismo (Eq. 6) (Halliwell e Gutteridge, 2015).



A GPx degrada peróxidos oxidando duas moléculas de glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG), esta glutathione oxidada pode ser reduzida novamente pela enzima glutathione redutase (Eq. 7) (Halliwell e Gutteridge, 2015).



Existem várias isoformas de GPx (em humanos 8) codificadas por diferentes genes, atuam em diferentes regiões, cada uma tendo preferência por um tipo de substrato.

Peroxiredoxinas (Prx) (Shuvaeva *et al.*, 2009) são enzimas que convertem peróxido de hidrogênio em água (Fig. 7) (papel desempenhado também pela catalase (CAT) nos peroxissomos), peróxidos orgânicos em álcool e peroxinitrito em nitrito.

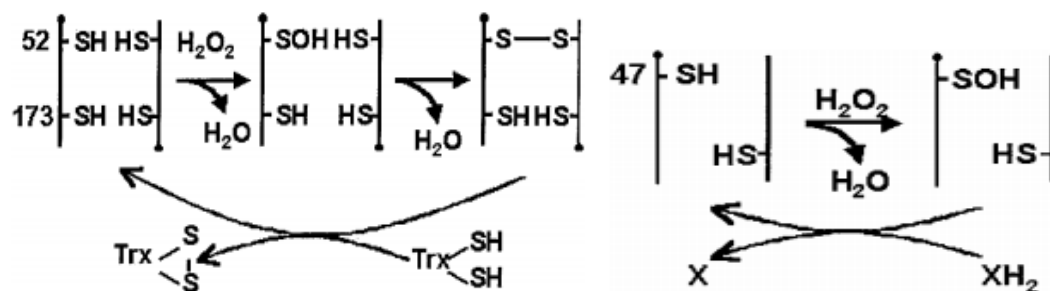


Figura 7: Mecanismo de reação das peroxiredoxinas. X denota um doador de hidrogênio não identificado. Imagem de Rhee *et al.* 2001

A família das glutathione S-transferases (GST) é composta por enzimas diméricas envolvidas na detoxificação de xenobióticos. Podem metabolizar clorofórmio, nitratos orgânicos, DTTs, naftaleno e paracetamol. Algumas isoformas podem inclusive metabolizar aldeídos citotóxicos produzidos pela peroxidação lipídica.

Como exemplos de defesas não enzimáticas temos:

Vitamina E, que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica, é considerada um dos principais inibidores. O termo vitamina E representa uma série de compostos que incluem tocoferóis e tocotrienóis. Atua também regulando (inibindo) a proteína cinase C – envolvida no crescimento de músculo liso (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Vitamina C, ou ácido ascórbico, é um doador de elétrons e também pode impedir a etapa de iniciação da peroxidação lipídica. Age como cofator de pelo menos oito enzimas, um exemplo importante seria de sua participação na síntese do colágeno, onde serve como cofator para enzimas hidroxilases. Embora não seja necessária para a síntese sua ausência leva a várias deficiências como vasos sanguíneos frágeis, cicatrização deficiente e, em casos extremos, o escorbuto (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A glutathione, o mais abundante antioxidante intracelular, que é oxidada a dissulfeto de glutathione ao reagir com radicais, além de ser substrato para outras enzimas como a GPx, por exemplo (Yoshihara *et al.*, 2010; Halliwell e Gutteridge, 2015). Problemas na síntese de GSH contribuem para doenças como *diabetes mellitus*, fibrose pulmonar, doença hepática alcoólica, tumores resistentes a drogas, entre outras.

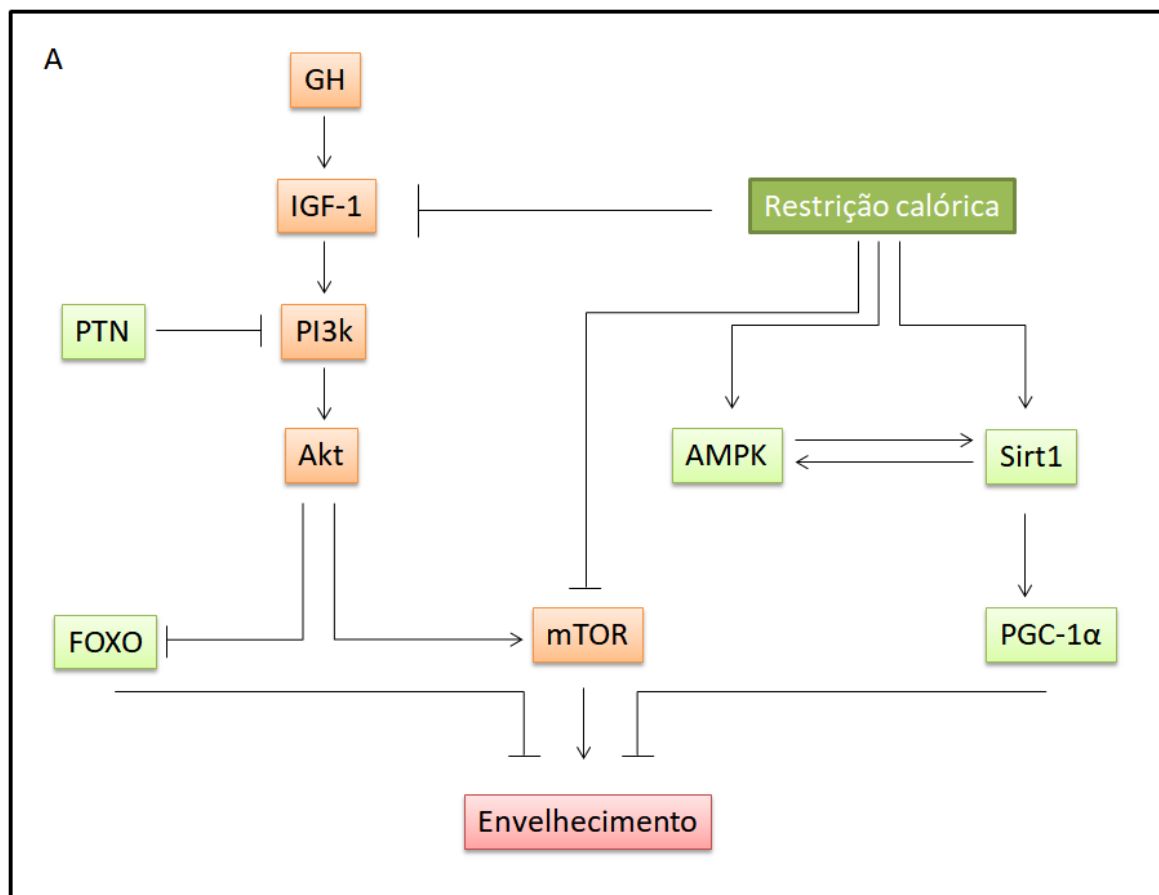
Estresse oxidativo

Definido por Helmut Sies em 1985, como “uma perturbação no balanço prooxidantes-antioxidantes a favor dos prooxidantes”. Este termo passou por diversas modificações até ser revisado pelo mesmo autor, em 2017, definindo estresse oxidativo como “o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização redox e/ou dano molecular” (Sies *et al.*, 1985; Sies *et al.*, 2017).

Porém para a sinalização redox é necessária a condição de estresse, surgindo então duas novas formas de classificação, de acordo com a intensidade: eustresse oxidativo e distresse oxidativo.

Eustresse oxidativo seria o desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pro-oxidantes no nível fisiológico, ou seja, uma relação em que a sinalização possa ocorrer. Quando os níveis de EO aumentam para quantidades tóxicas à célula, temos uma condição de distresse oxidativo (Sies *et al.*, 2017).

Condições de distresse podem levar a distúrbios neurológicos, e doenças neurodegenerativas de longo prazo como a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Doença de Huntington, bem como esclerose múltipla. Também distúrbios metabólicos como diabetes e obesidade devido ao importante papel que as reações redox exercem no metabolismo de lipídios e carboidratos. As ERs também alteram a sensibilidade da insulina (Jones e Sies, 2015; Sies *et al.*, 2017).



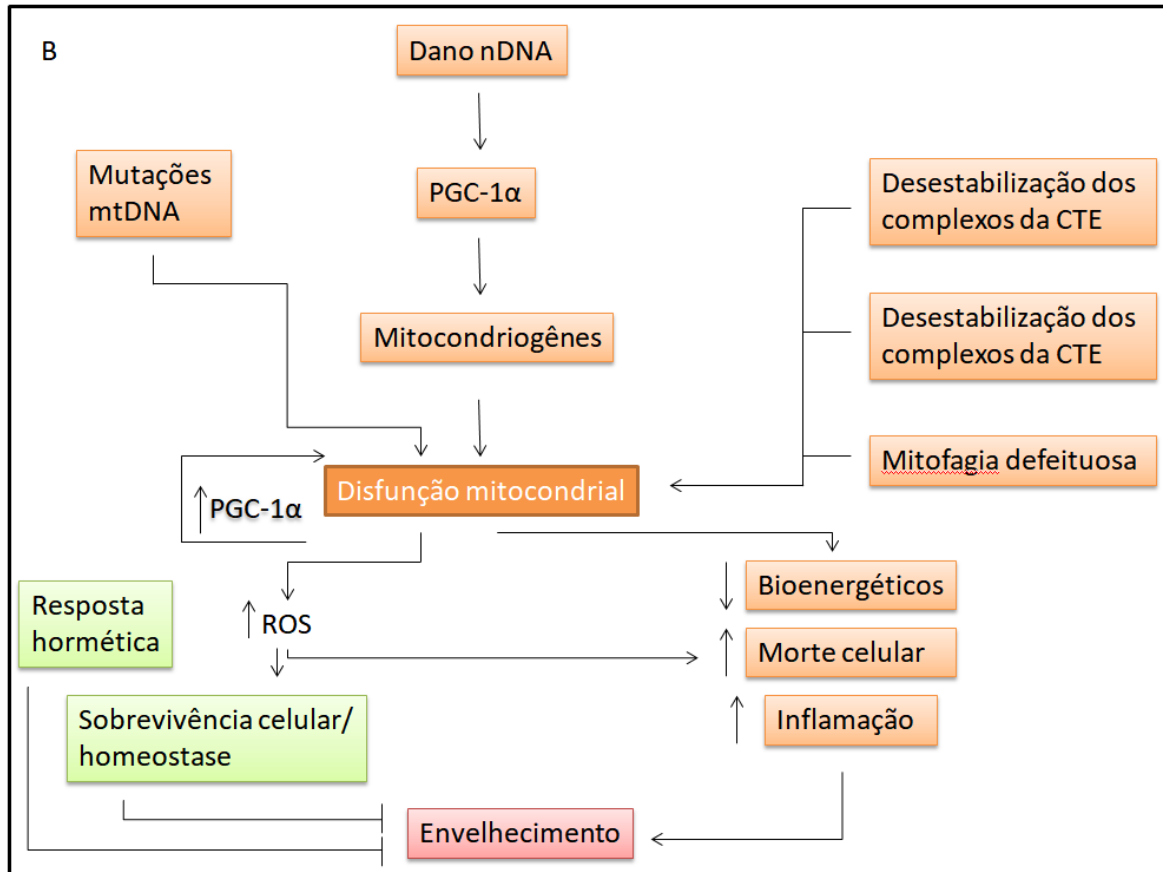


Figura 8: Alterações metabólicas.

(A) Sensibilidade de nutrientes desregulada. Eixo de sinalização envolvendo hormônio de crescimento (GH) e insulina/fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e sua relação com restrição calórica e envelhecimento. Moléculas pró-envelhecimento em laranja, anti-envelhecimento em verde.

(B) Disfunção mitocondrial. Funções mitocondriais são alteradas por mutações no mtDNA relacionadas pelo envelhecimento, reduzindo formação de mitocôndrias, desestabilizando complexos da cadeia transportadora de elétrons (ETC), alteração na dinâmica mitocondrial ou controle de qualidade de mitofagia defeituoso. Sinais de estresse e funções mitocondriais defeituosas geram EROS que contribuem para o envelhecimento.

Figura adaptada de López-Otín *et al.* (2013).

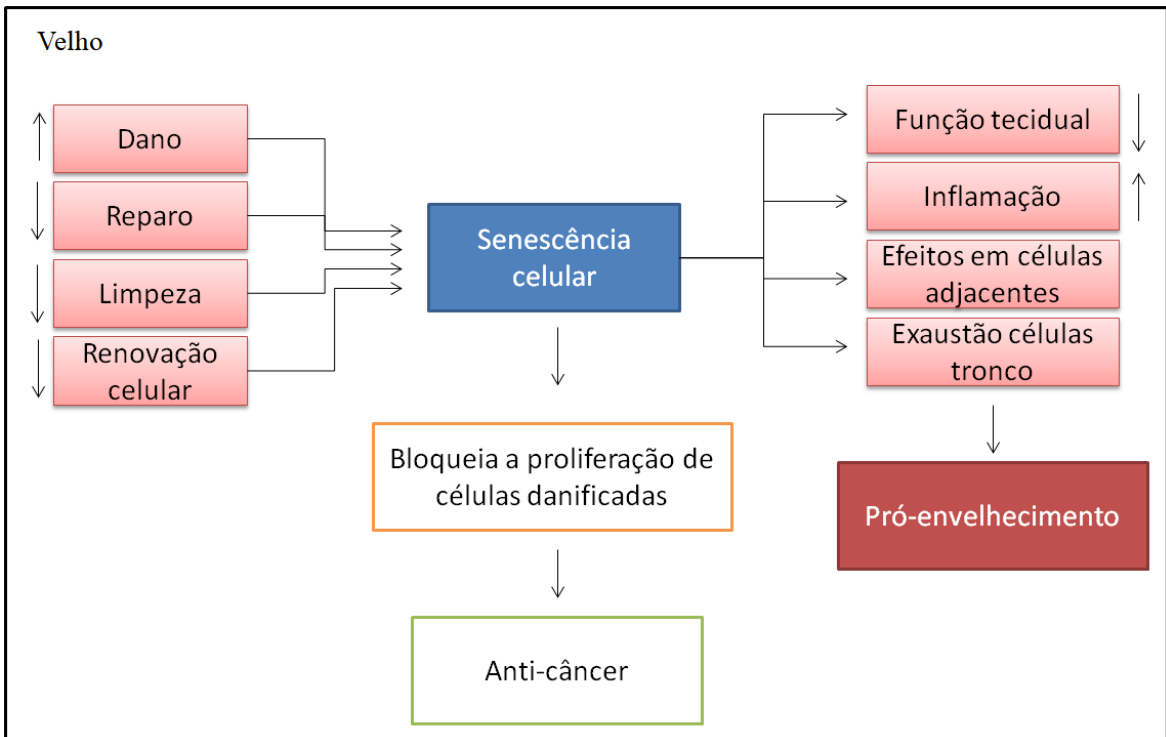
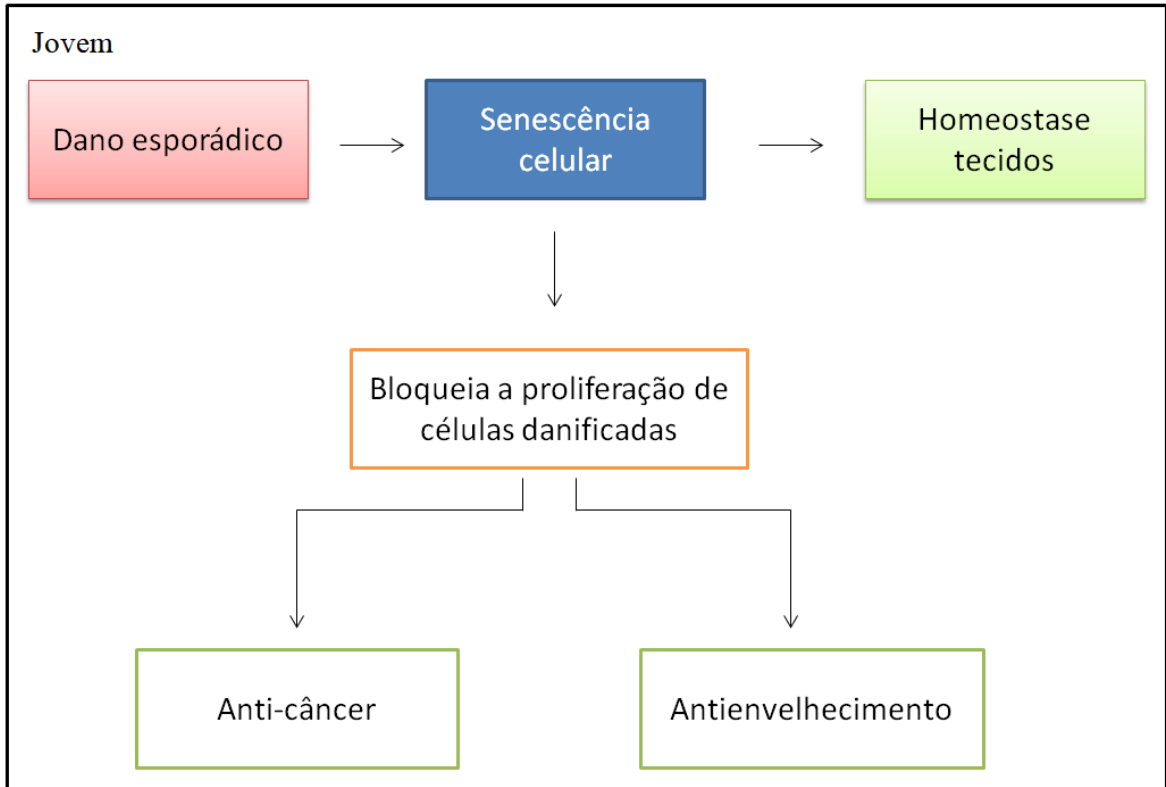


Figura 9: Senescência celular. Em organismos jovens, a senescência celular previne a proliferação de células danificadas, assim protegendo de câncer e contribuindo para a homeostase do tecido. Em organismos velhos, o dano e a “limpeza” de células senescentes deficiente resultam no seu acúmulo, e isto tem efeitos deletérios na homeostase do tecido, contribuindo para o envelhecimento. Adaptado de López-Otín et al. (2013).

Envelhecimento e estresse oxidativo estão extremamente correlacionados uma vez que diversos marcos do primeiro processo (envelhecimento) estão relacionados com o segundo (EO) (Figs. 8 e 9). Porém, como visto até agora, ambos são processos sistêmicos de extrema complexidade. Para melhor compreender esta relação, a primeira parte desta tese se propõe a fazer análises em um espectro mais amplo das alterações redox ao processo de envelhecimento influenciadas pela reprodução em ratos machos. Na segunda parte apresenta uma avaliação de quatro regiões do cérebro de ratos machos reprodutores e não reprodutores, analisando medidas de bioquímica redox para melhor elucidar este processo complexo e o quanto ele é influenciado pela reprodução.

Objetivos

Objetivo geral:

Este trabalho tem como objetivo caracterizar o perfil oxidativo de ratos machos, ao longo do envelhecimento (3, 6,12 e 24 meses), o comportamento, sistema motor e cognitivo, comparando animais reprodutores e não reprodutores diferenciando as estruturas hipocampo, córtex pré-frontal, hipotálamo e cerebelo, avaliando se a reprodução altera este perfil.

Objetivos específicos:

- Quantificar a atividade das enzimas: catalase/peroxirredoxina, superóxido dismutase e glutathione peroxidase no hipocampo, córtex pré-frontal, cerebelo e hipotálamo de ratos machos com e sem atividade reprodutiva nas diferentes idades.
- Quantificar a concentração de nitritos e nitratos e malondialdeído no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo de ratos machos com e sem atividade reprodutiva nas diferentes idades.
- Avaliar os níveis de antioxidantes não enzimáticos: vitaminas C e glutathione total no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo de

ratos machos com e sem atividade reprodutiva nas diferentes idades.

- Mensuração dos níveis de testosterona em ratos machos com e sem atividade reprodutiva nas idades de 3, 6, 12 e 24 meses.
- Análise de componentes principais do perfil oxidativo dos órgãos gônadas, cérebro, rins, pulmão e coração de ratos machos reprodutores e não reprodutores ao longo do envelhecimento.
- Avaliação dos níveis de ansiedade de animais reprodutores e não reprodutores ao longo do envelhecimento.
- Avaliação do sistema motor de animais reprodutores e não reprodutores ao longo do envelhecimento.
- Avaliação da memória de animais reprodutores e não reprodutores ao longo do envelhecimento.

Contribuição para os resultados:

Artigo I – Contribuí com a coleta de dados, análise estatística e redação.

Artigo II – Contribuí com parte da coleta de dados dos testes de campo aberto e localização de objetos; eutanásia e coleta dos órgãos; Treinei alunos de iniciação científica e colaborei na preparação dos extratos, e os ensaios bioquímicos e HPLC. Fiz a análise dos dados e redação do artigo.

Complementares – controle dos dados de criação de filhotes estatística e redação.

Artigo I

Artigo publicado na revista Biogerontology, p. 1-9, 2017



Artigo II

Artigo a ser submetido para a revista *Experimental gerontology*.

Oxidative profile changes along the aging process in prefrontal cortex, cerebellum, hippocampus, and hypothalamus of male Wistar rats

Abstract

The brain is an organ very susceptible to oxidative damage, and neurodegenerative diseases are a hallmark of the aging process. Aging is the accumulation of damages during the passage of time. In order to access the changes in the oxidative profile during the aging process, we studied four different regions of the brain of male rats (prefrontal cortex, hippocampus, hypothalamus, and cerebellum) in four different ages (3, 6, 12, and 24 months old). We found increased damages and defenses in elder animals. We found weak correlations among regions and those correlations disappeared when the effects of aging were removed (via partial correlation). The PCA found 2 major groups, one composed of 3 and 6 months old and another composed of 12 and 24 years old animals. With the results it is possible to infer that aging affects the entire brain, not separate regions in different ways.

Introduction

The brain demands large amounts of energy to function properly, thus it consumes large amounts of oxygen in order to produce the required energy. The energy production process generate many reactive species, that render the brain more susceptible to oxidative stress (Halliwell and Gutteridge 2015). As proposed by Harman (1956) the damage caused by free radical may be the cause of aging.

The aging process can be the result of a series of injures that affect metabolic performance, such as, injuries causing losses in mitochondrial efficiency that may alter metabolism producing characteristics of senescence and finally resulting in death (Rikans et al. 1992).

Our group, in a previous work, that the brain of non-breeders male rats showed very little difference during the aging process and a more in depth approach was suggested in order to better evaluate these changes (Alabarse et al. 2011b; Ehrenbrink et al. 2006).

In this paper we evaluated the redox profile of 4 different regions of the male rats' brains: prefrontal cortex, responsible for complex social behavior, decision making, among others; hippocampus involved in memory, hypothalamus, hormone signaling, and the cerebellum that is involved in motor learning and control. In 4 different ages (3, 6, 12, and 24 months) in order to access the changes made by the aging process.

Material and methods

Animals and organs

These studies were conducted with the approval of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ethical Committee (project number 23957). The study made use of 45 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). The animals aged in cages with other animals and when reached the appropriate age (3- 6- 12- 24- months old) they were euthanasiated.

Adult animals weighed between 250 and 500 g, and were weight-to-age proportional (Nistiar et al. 2012); they had good motor activity and did not present hair loss or any symptoms of disease. Sick animals were sacrificed and discarded from the sample (4 animals).

The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle at a temperature $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, with standard lab chow and drinking water *ad libitum*. All animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xilazine (i.p. 75 and 10 mg/kg, respectively). Their blood was collected and, after a saline infusion, the brains were

removed, their regions (prefrontal cortex, cerebellum, hippocampus and hypothalamus) separated and immediately frozen in liquid nitrogen for further analysis.

Samples were manually macerated, sonicated in 30 mM phosphate buffer (120 mmol/L KCl, 100 mmol/L PMSF, pH 7.4), and centrifuged (10 min, 2000 x g). The supernatant was transferred to a fresh tube and centrifuged for 10 min at 15800 x g. The supernatant from the second centrifugation was used for enzymatic assays.

Assays

Glutathione peroxidase (GPx) activity was obtained through commercial kit (RanSel[®] - Randox Laboratories Ltd.,Crumlin, UK). Measurement of superoxide dismutase (SOD) activity was obtained through commercial kit (RanSOD[®] - Randox Laboratories Ltd.,Crumlin, UK). The assay to measure total glutathione (tGSH) was performed by measuring the formation of p-nitrophenol from 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) in the presence of the enzyme glutathione reductase and NADPH (Kondo and Awada 2000). Color development was read at $A_{412\text{nm}}$.

As an index of protein damage, carbonyl levels were measured using absorbance at $A_{370\text{nm}}$ (Levine et al. 1990). Briefly, tissue extract aliquots (50 μ l) were added with either 2 mol/L HCl or 10 mmol/L 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/L HCl and incubated at 37 °C for 90 min. After the samples were centrifuged (8,000g, 10 min) and added with 75 μ l of 28% trichloroacetic acid. After the samples were centrifuged (8,000g, 10 min) and the DNPH excess was removed with ethanol–ethyl acetate 1:1 (v/v). The samples were centrifuged (8,000g, 10 min) and the protein was then dissolved by addition of 6 mol/L of guanidine hydrochloride. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone (21,000 (mol/L)⁻¹cm⁻¹). Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/g of protein.

As an index of nitric oxide levels, a variation of the Griess test was used to determine total nitrate and nitrite levels, standardized by sodium nitrite (Grisham et al. 1996). Color development was read at $A_{543\text{nm}}$.

Levels malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation, were measured by HPLC employing a reverse-phase column (SUPELCOSIL™ LC-18-DB HPLC column; 15 cm×4.6 mm, 5 μm), using a mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v); Samples were injected in a volume of 25 μL . The absorbance of the column effluent was monitored at 254 nm (Karatepe 2004). Under these conditions, the retention time of MDA was 5.6 min.

Data normalization

All results were normalized to protein content with BSA (bovine serum albumin) as a standard (Bradford 1976). All assays were independently performed in triplicate.

Object location/open field

For object location (OL) and open field (OF) tasks we used a rectangular arena (90 × 60) made of wood with distinct visual cues in the walls. The general protocol consisted of three distinct phases: (1) 4 consecutive days of 10-min exposure for habituation in the absence of objects, (2) 2 days of 10-min training session with two identical objects positioned in opposite corners (15 cm distant of the walls), and (3) 5-min test session for memory retention. The first 2 days of habituation were filmed and the travelled distance (exploration of space) was quantified. For OL retention test, one of the identical objects was displaced into a different position in the arena. Behavioral experiments were conducted only at daytime, being performed in a silent illuminated room (constant temperature of

26 ± 1 °C). All components of our apparatus were thoroughly cleaned with 70% ethanol solution between each trial to make sure no olfactory cues were present. A video camera installed above the arena was used to record the experiments. After, the records of OL were quantified by a blind observer, and the records of OFT were quantified by the software ETHOWATCHER (Junior et al. 2012).

Flow cytometry

Flow cytometry assay. Mitochondrial superoxide was measured using the probe MitoSOX Red (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR - USA), while mitochondrial mass and membrane potential were evaluated using MitoTracker Green and MitoTracker Red (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR - USA), respectively, in a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences). The tissue samples (100 mg) were dissociated with 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 1 mg% of collagenase IV, filtered and incubated with the probes. One hundred microliters of each sample was incubated in a bath at 37°C, in the dark, for 10 min in a final concentration of 1 μM MitoSOX; or 45 min in a final concentration of 100 nM Mitotracker green + red. After that, 10,000 cells were evaluated per sample. Data were analyzed using the software FlowJo.

DCF assay. The reactive oxygen species (ROS) and nitrogen reactive species (RNS) production was assessed through the 2',7'-DCF oxidation method (LeBel et al. 1992). Briefly, 60 μL of the biologic sample was incubated at 37°C, in the dark, for 30 min, with the addition of 240 μL of 2',7'-DCF diacetate (H₂DCFDA) in a 96-well plate. H₂DCFDA is cleaved by cellular esterases and form H₂DCF that is oxidized by ROS and RNS which are present in the sample, producing a fluorescent compound, DCF. DCF oxidation was measured fluorimetrically by using a 488 nm excitation and 525 nm emission wavelength. A standard curve, using standard DCF (0.25–10 μM), was performed in parallel with the samples.

Statistical analysis

Biochemical results are expressed as median (inter quartile range) and were analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn test to determine statistical significance among the different groups. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Animal's weight data, OL index, and total distance traveled are expressed as mean \pm sd. Animals' weight and total distance were analyzed by a ANOVA post hoc Tukey. OL index was analyzed by a T-test to see difference from 50%. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Multivariate analyses was applied to evaluate the overall model and to clarify the costs of reproduction: correlation and principal component analysis. Correlation is a statistical process that evaluates the extent by which two variables have a linear relationship with each other. After determining correlations, we performed a partial-correlation to determine the influence of a third variable on that linear relationship. Due the data distribution, Kendall rank correlation coefficient (T) was calculated in R software, followed by a partial correlation controlling for AGE variable.

Principal component analysis (PCA) (Abdi and Williams 2010; Pearson 1901) analyzes a data matrix of independent and (generally) inter-correlated variables, and expresses the information in a new set of orthogonal variables called principal components (PCs). The PCs may be used to find patterns of similarity within a data set, which is accomplished by plotting the data and evaluating cluster patterns and distances.

The data were standardized and logarithmically normalized, and a principal component analysis was performed in R software. The first two identified components (selected through the elbow method (Ketchen Jr and Shook 1996)) were included in the cluster analysis (eigenvalues at supplementary results). The results obtained from evaluating the distance of each point (animal) explain 88% of the variation (Abdi and Williams 2010).

Results

Animal's weight was measured every month (Figure 1) and average age group's weight did not differ from expected age values. Animals stress levels were evaluated by elevated plus maze (data not shown), no difference was found.

Biochemical results

Intra regions analysis

Cerebellum

The SOD activity was higher in 24 months than in 3 and 6 months old; GPx activity was lower in 12 months than in 6 and 24 months old animals (table 1); Nitrites and nitrates levels were lower in 12 months animals than in 3 months; Carbonyl levels were higher in 3 months old animals than in 12 months and higher in 24 than in 12 months old animals (table 2).

Hippocampus

Total glutathione levels were higher in 12 and 24 months old animals than in 3 and 6 months old (table 1). Nitrites and nitrates levels were higher in 12 and 24 months than in 6 months old animals. Carbonyl levels were higher in 12 and 24 months old animals than in 6 months and MDA levels were higher in 12 and 24 months old animals than in 3 and 6 months old (table 2).

Hypothalamus

SOD had higher activity in 12 months than in 24 months old animals. Total glutathione levels were higher in 12 and 24 than in 3 and 6 months old animals (table 1). Nitrites and nitrates were higher in 3 and 6 months old animals than in 24, also 3 months was higher than 12 months old. Carbonyl levels were higher in 6 than in 24 months old animals. MDA levels were higher in 24 than 3 and 6 months old levels (table 2).

Prefrontal cortex

GPx levels were higher in the older ages (12 and 24 months old) than in younger ages (3 and 6 months old animals). The older ages also had higher hydrogen peroxide consumption than 6 months old animals and 24 months old consumption was higher than in 3 months old animals (table 2). Total glutathione levels were higher in the older ages than in 6 months old, 24 months old animals' levels were higher than 3 months old levels. Nitrites and nitrates levels were higher in the older ages comparing with 6 months, and 24 months were higher

than 3 months old animals. Carbonyl levels were lower in 24 months old animals than in the younger ages (3 and 6 months old). MDA levels were higher in the younger ages than in 12 months old animals and 24 months had lower levels than 3 months old animals (table 1).

Inter regions analysis

SOD activity was significantly higher in hypothalamus than in hippocampus and cerebellum at the ages of 3, 6, 12, and 24 months. GPx activity was higher in hypothalamus than in pre frontal cortex. 3 months old total glutathione levels were lower in hippocampus than in pre frontal cortex and cerebellum; also hypothalamus was significantly lower than cerebellum levels. 6 months were lower in hippocampus than in pre frontal cortex and cerebellum; cerebellum levels were higher than hypothalamus and pre frontal cortex. 12 months old animals were higher in hypothalamus than hippocampus (Tables 1 and 2).

Nitrites and nitrate levels were higher in pre frontal cortex and hypothalamus than in the hippocampus at the age of 3 months. At 6 months the hippocampus levels were lower than in pre frontal cortex and hypothalamus, and hypothalamus were significantly higher than cerebellum levels. 12 months old nitrites levels of hippocampus were higher in pre frontal cortex and hypothalamus, and hypothalamus were significantly higher than cerebellum levels, also pre frontal cortex were lower than cerebellum levels. 24 months animals had higher nitrites and nitrates levels in hippocampus than in hypothalamus and pre frontal cortex; prefrontal cortex levels were higher than cerebellum (Tables 1 and 2).

Carbonyl levels in prefrontal cortex and hypothalamus were lower than in cerebellum at the age of 3 months. 6 months old animals had higher carbonyl levels in hippocampus and cerebellum than in hypothalamus; also prefrontal cortex levels were lower than cerebellum and hippocampus levels. 12 months animals had hippocampus levels higher than prefrontal cortex and hypothalamus. 24 old animals' hypothalamus levels were higher than hippocampus, but lower than cerebellum; prefrontal cortex had lower carbonyl levels than cerebellum and hippocampus (Tables 1 and 2).

MDA levels in 3 months animals were higher in prefrontal cortex than in hippocampus and hypothalamus levels were higher than cerebellum levels. 6 months animals had higher levels in prefrontal cortex than in hippocampus and hypothalamus, and hypothalamus levels were higher than cerebellum levels. 12 months levels were lower in prefrontal cortex than in hippocampus and hypothalamus levels were higher than hippocampus. 24 months animals had higher MDA levels in hippocampus than in prefrontal cortex, cerebellum and hypothalamus, also hypothalamus levels were higher than cerebellum and prefrontal cortex levels (Tables 1 and 2).

Correlations

Due the very heterogeneous distribution of our results, Kendall correlation was performed, followed by a partial correlation controlling for AGE.

SOD activity in the cerebellum correlated negatively (weak) with the activity in the hypothalamus, and this correlation disappeared when controlled by AGE. No significant correlation was found in GPx activity. Nitrites and nitrates levels positively correlated in cerebellum and hypothalamus (weak) and also in hippocampus and prefrontal cortex (weak). Hypothalamus and prefrontal cortex had a weak negative correlation. When controlled for AGE the cerebellum and hypothalamus correlation changed, but not significantly (0.36 to 0.26) and all other correlations disappeared.

Regarding total glutathione levels hypothalamus, hippocampus and prefrontal cortex all correlated among each other, with medium/weak positive correlations. When controlled for age, hypothalamus and prefrontal cortex activity changed from a medium to a weak correlation, all other correlations were not significant.

Damage to proteins (carbonyl levels) showed a very strong positive correlation in hypothalamus and prefrontal cortex, and both regions had weak correlations with hippocampus levels. Almost all correlations disappeared, remaining only the one between prefrontal cortex and hypothalamus, but the strong positive relation changed to a strong negative relation.

MDA levels in the cerebellum are negatively correlated with hypothalamus (very weak) and hippocampus (weak), but positively correlated with prefrontal cortex (weak). Prefrontal cortex levels were negatively correlated with hippocampus (medium) and hypothalamus (weak) levels. Hippocampus and hypothalamus had a weak positive correlation among them. After performing a partial correlation, the correlation between cerebellum and hippocampus did not change, and the negative correlation between prefrontal cortex and hippocampus changed from medium to weak. All other correlations disappeared.

Memory/motor

Older animals (12 and 24 months old) did not learn the position of the new object (significantly below 50% LO index). Older animals also explored less in the open field test and, when compared day one with day 2, the older animals explored equally in both days.

Flow cytometry

Dichlorofluorescein (DCFH) measures cellular antioxidant capacity. MitoSOX measures superoxide damage within mitochondria. MitoTracker is used to measure mitochondrial cellular integrity and form. DAF-FM is a fluorescent dye used to assess nitric oxide levels. No difference was found in any of the tests (table 3).

PCA

The principal component analysis showed 4 different clusters, one group composed of 3 months animals, and another of 6 months old and a third group composed of 3 and 6 months old animals. The fourth group was composed of 12 and 24 months old animals.

Discussion

The prefrontal cortex is located in the front part of the frontal lobe and it is involved in goal-directed behaviors, it is where decisions about what actions to take are made and their possible outcome is evaluated.

The hippocampus plays a role in binding sensory information for memory consolidation; also it supports spatial memories of the location of objects of behavioral importance; It is also involved in the storage of memories (the duration of these memories storage is controversial) (Bear 2006).

Located below the thalamus, the hypothalamus is responsible for many primitive functions such as visceral nervous system control, such as the visceral response to de fight or flight visceral response – increased heart rate to increase blood flow for muscle preparation. It also plays a role in motivating animals to find food, drink and sex and directs hormonal responses via the pituitary gland (Bear 2006).

The cerebellum is an important movement control center, receiving information about body position in space, and forwarding this information to the cortex. It also works by receiving information from the cortex, calculating the detailed muscle activation sequence necessary to achieve a specific intended movement and transmitting the information to the specific muscles. If the region is damaged it may result in uncoordinated movements (Bear 2006).

Cerebellum, hippocampus, and hypothalamus had, in general, lower defenses in the younger ages (3 and 6 months old) and this indicates that the animals suffered no major stress condition in early life, although, as the animals grew older it is possible to see that the animals suffer an increase in damage levels and the defenses rise to halt these damages, albeit unsuccessful since the damages kept increasing. These damages (especially in the hippocampus region) are a possible cause for the elder animals' poor performance in the LO test and in the relation of the OF, the elder animals also showed no difference between day 1 and day 2, thus indicating that the animals could not retain the memory of the previous explored space. Also the elder animals explored the test space less than younger animals, indicating that the animals were in a declined physical condition (when compared with younger ages).

The increased activity, in prefrontal cortex, of GPx is not in accordance with several studies that reported a decrease in the activity (Espinoza et al. 2008;

Okoduwa et al. 2015; Singh et al. 2009). Also GPx is associated with protection from lipid peroxidation, so this increased activity agrees with our reduced MDA levels in older animals (Raes et al. 1987).

In our previous works in brains, we found very little differences among elder and younger male rats (Alabarse et al. 2011a; Ehrenbrink et al. 2006). Also other works with aging also found this lack of major changes (Cand and Verdetti 1989; Jolitha et al. 2006). Hamezah et al. (2017) found that older animals had decreased performance in the memory and motor tests, but attributed these changes more to the changer in brain size than to oxidative stress in the brain.

If we compare the activities of the enzymes in different analyzed regions, we can see that hypothalamus had the highest activity through all ages. Also had higher concentrations of nitrites and nitrates than hippocampus and cerebellum, which was expected due the fact that nitric oxide is directly involved in hormonal signaling (Fukai and Ushio-Fukai 2011; Nathan and Xie 1994).

The correlations of the same samples in different regions were, in the most part, weak to moderate and very few of these correlations remained when the factor "AGE" was removed (4 correlations in total). This was, in part, expected due the fact that redox biochemistry is very compartmentalized, and changes in one region might not affect other, also the partial correlation indicates that the correlations found were indeed related with aging animals. These results corroborate with the general idea that aging is a multifactorial process, and oxidative stress is but one of the pathways that signal this process. On a curious note cerebellum did not correlate with other regions.

By the principal component analysis, it is possible to see that older animals are grouped together indicating how similar both ages are. The dispersion observed in the younger ages might be explained by the heterogeneous distribution of our biological replicates in each group sample. To the moment we have no explanation for these inter group divergences.

It is possible to summarize from this work that although each region is different with different functions and distinct redox profile, the changes caused by aging seem to have a similar effect in the entire brain.

References

- Abdi H, Williams LJ (2010) Principal component analysis Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics 2:433-459
- Alabarse PVG et al. (2011a) Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging Experimental Gerontology 46:241-248 doi:10.1016/j.exger.2010.10.009
- Alabarse PVG et al. (2011b) Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging Exp Gerontol 46:241-248
- Bear MFC, B.W.Paradiso, M.A. (2006) Neuroscience: Exploring the Brain, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, EUA
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding Anal Biochem 72:248-254
- Cand F, Verdetti J (1989) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats Free Radical Biology and Medicine 7:59-63
- Ehrenbrink G, Hakenhaar FS, Salomon TB, Petrucci AP, Sandri MR, Benfato MS (2006) Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes Exp Gerontol 41:368-371 doi:10.1016/j.exger.2006.02.007
- Espinoza SE et al. (2008) Glutathione peroxidase enzyme activity in aging The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences 63:505-509
- Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases Antioxidants & Redox Signaling 15 doi:10.1089/ars.2011.3999
- Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR (1996) Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids vol 268.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) Free radicals in biology and medicine. 5th edn. Oxford University Press, New York
- Hamezah HS et al. (2017) Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions Experimental Gerontology
- Harman D (1956) Aging - a theory based on free-radical and radiation-chemistry J Gerontol 11:298-300
- Jolitha A, Subramanyam M, Devi SA (2006) Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status Experimental gerontology 41:753-763

- Junior CFC, Pederiva CN, Bose RC, Garcia VA, Lino-de-Oliveira C, Marino-Neto J (2012) ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals *Computers in biology and medicine* 42:257-264
- Karatepe M (2004) Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV Lc Gc North America
- Ketchen Jr DJ, Shook CL (1996) The application of cluster analysis in strategic management research: an analysis and critique *Strategic management journal*:441-458
- Kondo T, Awada F (2000) Glutathione (oxidized and reduced form): assay mixture and measurement. In: Taniguchi N, Gutteridge JMC (eds) *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press, Oxford, pp 57–60
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress *Chemical research in toxicology* 5
- Levine RL et al. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins *Method Enzymol* 186:464-478
- Nathan C, Xie Q-w (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls *Cell* 78:915-918
- Nistiar F, Racz O, Lukacinova A, Hubkova B, Novakova J, Lovasova E, Sedlakova E (2012) Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 47:1224-1233
- Okoduwa SI, Umar IA, Ibrahim S, Bello F, Habila N (2015) Age-dependent alteration of antioxidant defense system in hypertensive and type-2 diabetes patients *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 14:32
- Pearson K (1901) LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 2:559-572
- Raes M, Michiels C, Remacle J (1987) Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase *Free Radical Biology and Medicine* 3:3-7
- Rikans LE, Snowden CD, Moore DR (1992) Effect of aging on enzymatic antioxidant defenses in rat-liver mitochondria *Gerontol* 38:133-138
- Singh K, Kaur S, Kumari K, Singh G, Kaur A (2009) Alterations in lipid peroxidation and certain antioxidant enzymes in different age groups under physiological conditions *J Hum Ecol* 27:143-147

Table 1: Antioxidant defenses (data – median Q1|Q2)

	GPX U/mg prot.		tglut mmol/mg prot.		SOD U/mg prot.	
Cerebellum						
3m	48.49	(34.43 65.69)	3.692	(3.439 7.613)	0.003	(0.001 0.010) d
6m	64.64	(48.86 89.43) c	2.323	(2.031 2.781)	0.006	(0.002 0.008) d
12m	27.16	(25.12 39.84) bd	2.499	(1.988 2.890)	0.009	(0.006 0.010)
24m	68.56	(52.11 74.05) c	3.623	(2.589 4.448)	0.013	(0.010 0.021) ab
Hippocampus						
3m	35.37	(20.85 37.16)	0.474	(0.474 0.510) cd	0.000	(0.000 0.018)
6m	34.20	(15.68 51.27)	0.600	(0.310 0.699) cd	0.034	(0.000 0.044)
12m	23.50	(19.87 29.34)	2.393	(1.700 2.393) ab	0.012	(0.005 0.030)
24m	26.95	(8.81 55.77)	4.002	(3.525 4.002) ab	0.010	(0.008 0.012)
Hipotalamus						
3m	9872.12	(9005.42 13405.55)	0.153	(0.112 0.282) cd	248.047	(231.802 295.407)
6m	10517.89	(9731.55 11065.45)	0.103	(0.079 0.206) cd	248.076	(229.644 266.409)
12m	11862.35	(10132.10 13814.48)	39.478	(32.458 42.838) ab	348.911	(260.981 383.935) d
24m	9413.22	(8993.46 10804.89)	26.568	(13.678 45.167) ab	211.032	(175.316 245.016) c
Prefrontal cortex						
					H ₂ O ₂ ΔH ₂ O ₂ /min/mg prot	
3m	27.94	(23.21 31.07) cd	0.446	(0.326 0.638) d	0.336	(0.197 0.418)
6m	19.69	(18.20 20.86) cd	0.227	(0.173 0.283) cd	0.120	(0.092 0.143)
12m	141.23	(133.22 159.10) ab	2.858	(1.092 3.557) b	1.897	(1.650 2.082)
24m	155.28	(143.77 173.00) ab	4.104	(2.217 4.824) ab	3.196	(2.026 3.452)

a - differs from 3 months
b - differs from 6 months

c - differs from 12 months
d - differs from 24 months

Table 2: Nitrites and nitrates and oxidant damages (data – median Q1|Q2)

	Carbonyl mmol/mg prot.	Nitrites and nitrates mmol/mg prot.	MDA nmol/mg prot.
Cerebellum			
3m	7.06 (4.91 11.92) c	0.205 (0.147 0.210) c	0.164 (0.134 0.251)
6m	6.58 (4.13 11.67)	0.096 (0.047 0.121)	0.160 (0.157 0.199)
12m	2.89 (0.37 5.31) ad	0.081 (0.076 0.088) a	0.125 (0.114 0.160)
24m	9.96 (8.36 11.11) c	0.091 (0.068 0.135)	0.153 (0.133 0.167)
Hippocampus			
3m	1.10 (0.71 2.40)	0.025 (0.021 0.026)	0.015 (0.010 0.018) cd
6m	0.67 (0.55 1.45) cd	0.022 (0.017 0.025) cd	0.012 (0.010 0.016) cd
12m	3.41 (1.82 7.07) b	0.047 (0.034 0.086) b	0.054 (0.037 0.080) ab
24m	3.09 (2.28 4.12) b	0.047 (0.037 0.084) b	0.050 (0.035 0.083) ab
Hipotalamus			
3m	0.15 (0.13 0.20)	0.779 (0.646 1.041) d	3.855 (2.087 3.927) d
6m	0.12 (0.09 0.14) d	0.606 (0.540 0.644) cd	3.566 (2.982 4.151) d
12m	0.27 (0.11 1.32)	0.517 (0.427 0.560) a	4.505 (3.661 5.058)
24m	0.37 (0.25 0.51) b	0.432 (0.409 0.454) ab	4.811 (4.393 4.941) ab
Prefrontal cortex			
3m	4.40 (3.36 5.25) d	0.446 (0.326 0.638) d	0.601 (0.569 0.889) cd
6m	5.75 (5.07 10.74) d	0.227 (0.173 0.283) cd	0.310 (0.275 0.376) c
12m	3.01 (2.71 5.68)	2.858 (1.092 3.557) b	0.002 (0.001 0.003) ab
24m	2.22 (1.74 2.42) ab	4.104 (2.217 4.824) ab	0.141 (0.113 0.169) a

a - differs from 3 months

b - differs from 6 months

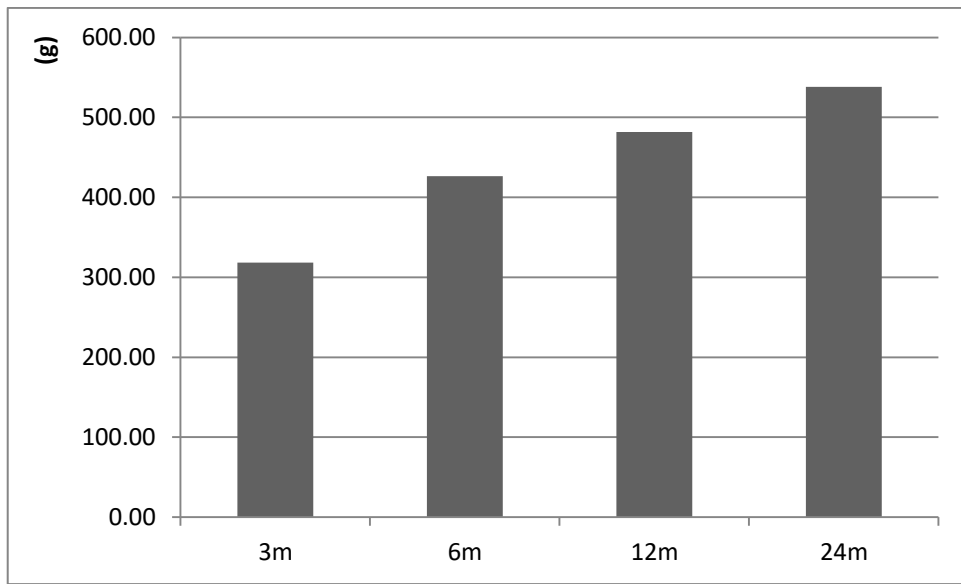
c - differs from 12 months

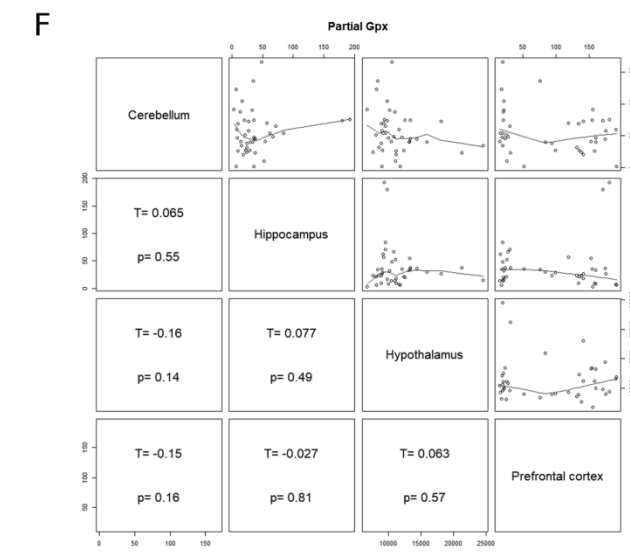
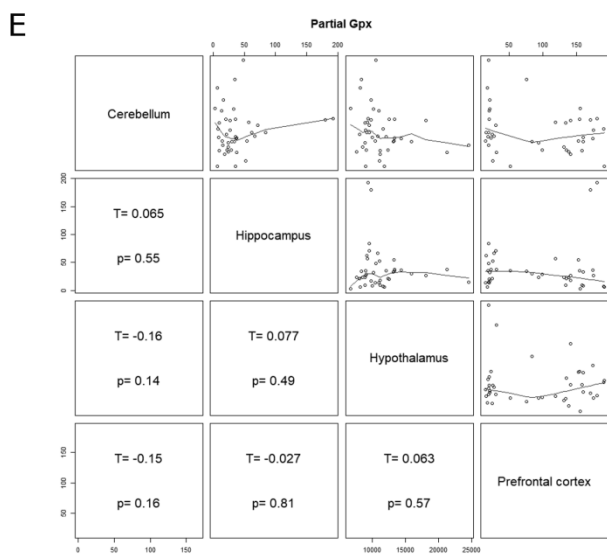
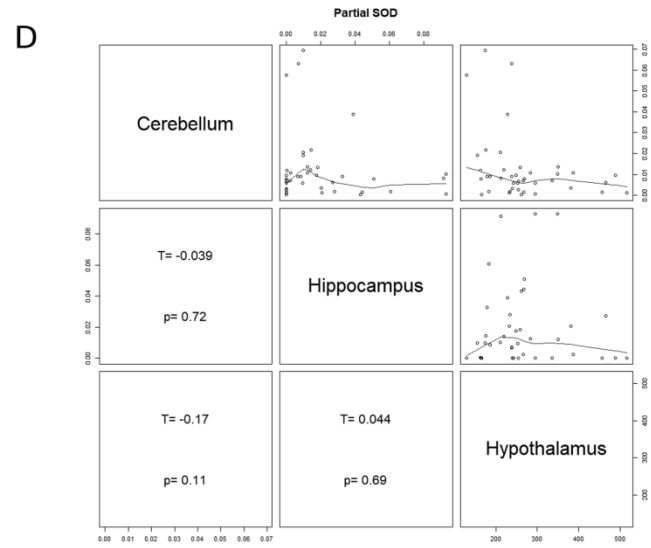
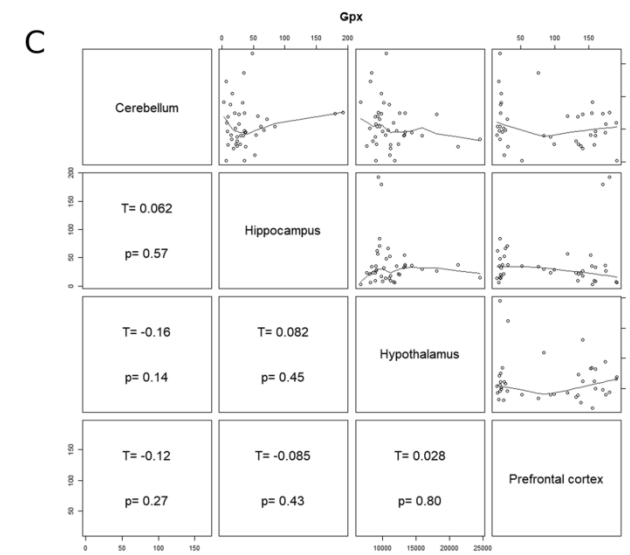
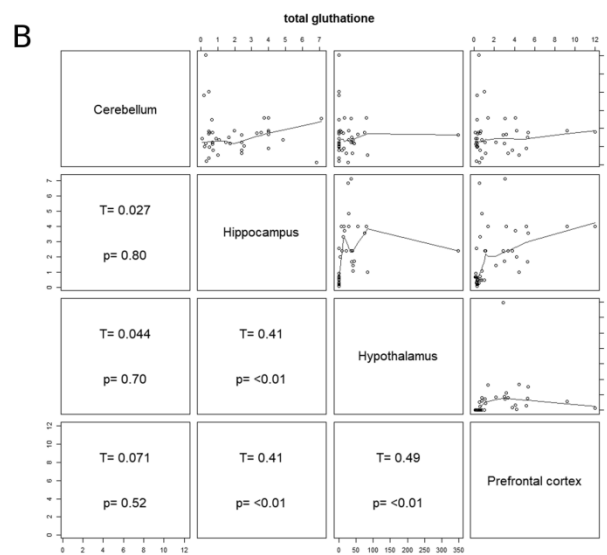
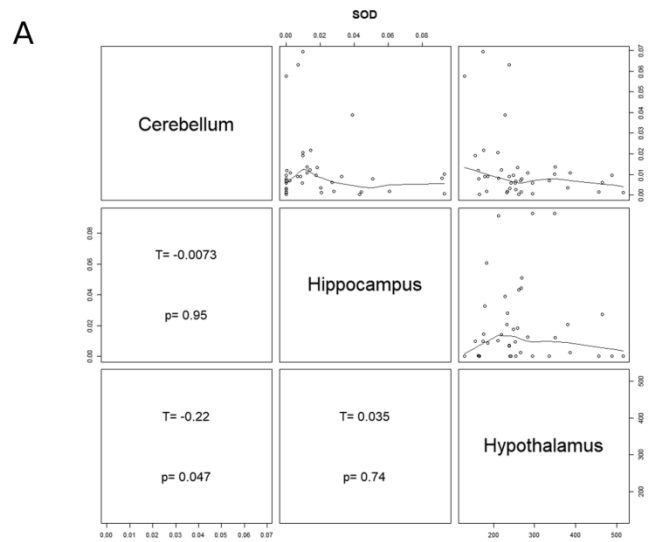
d - differs from 24 months

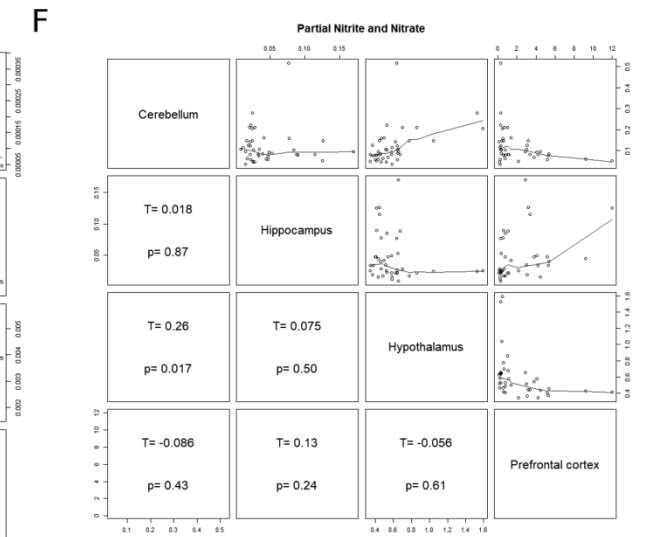
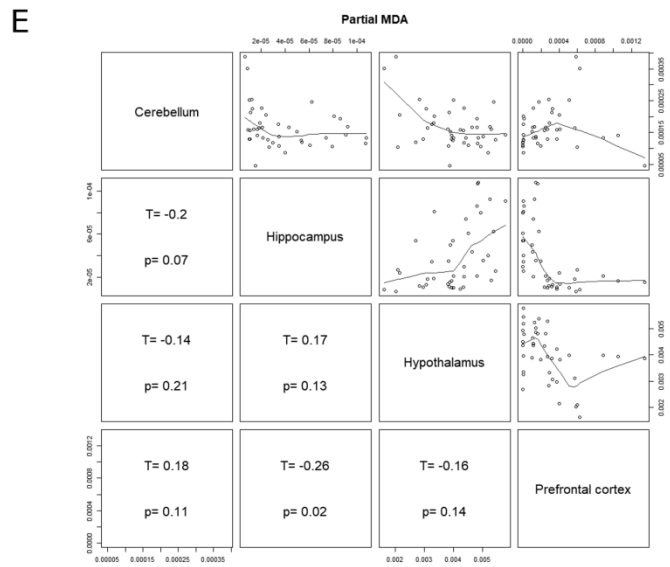
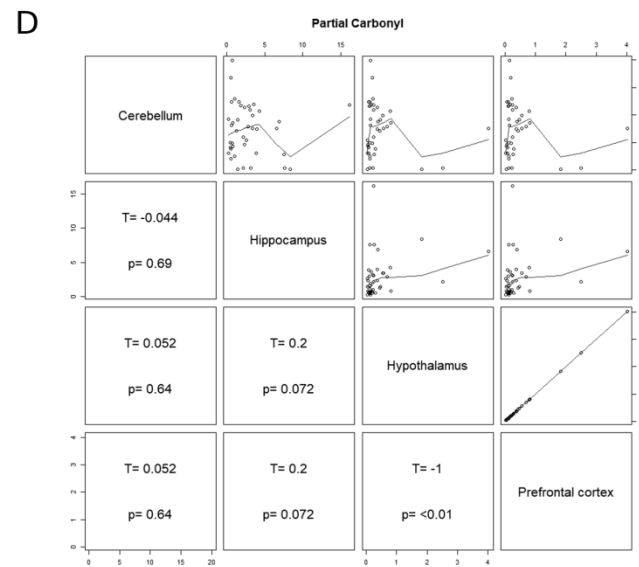
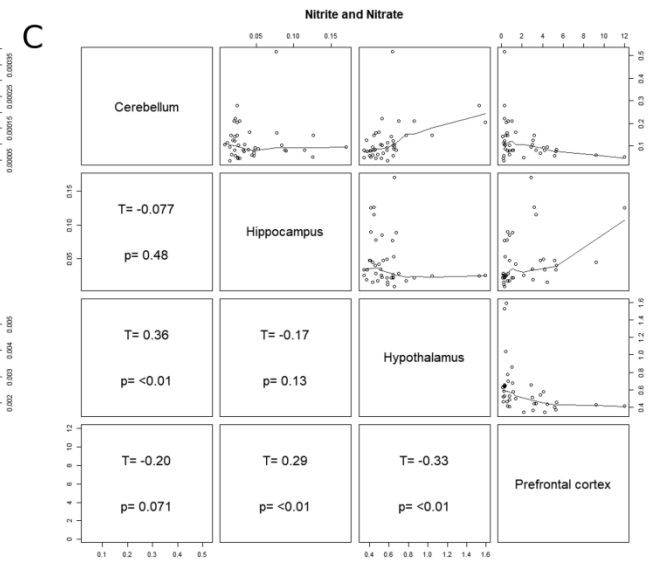
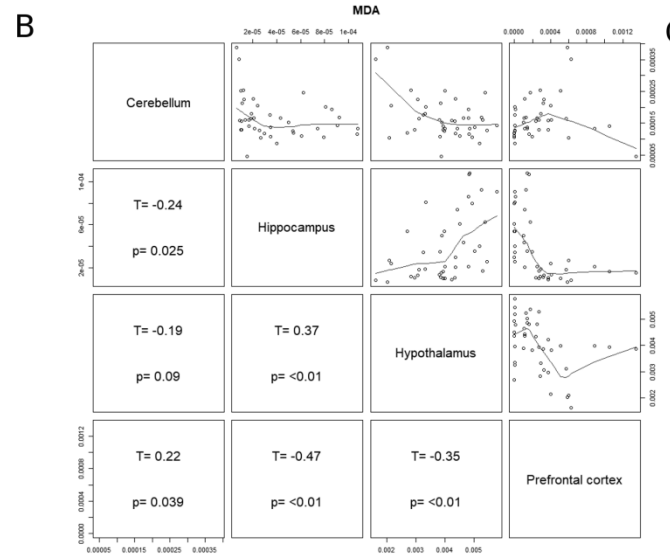
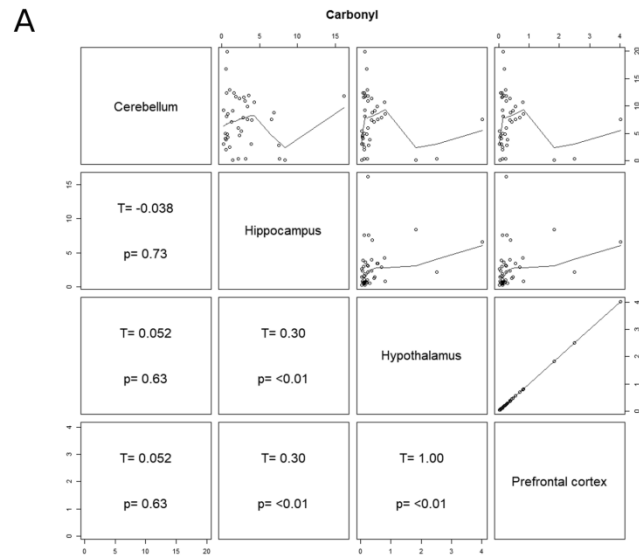
Table 3: Flow cytometry results (mean±DP)

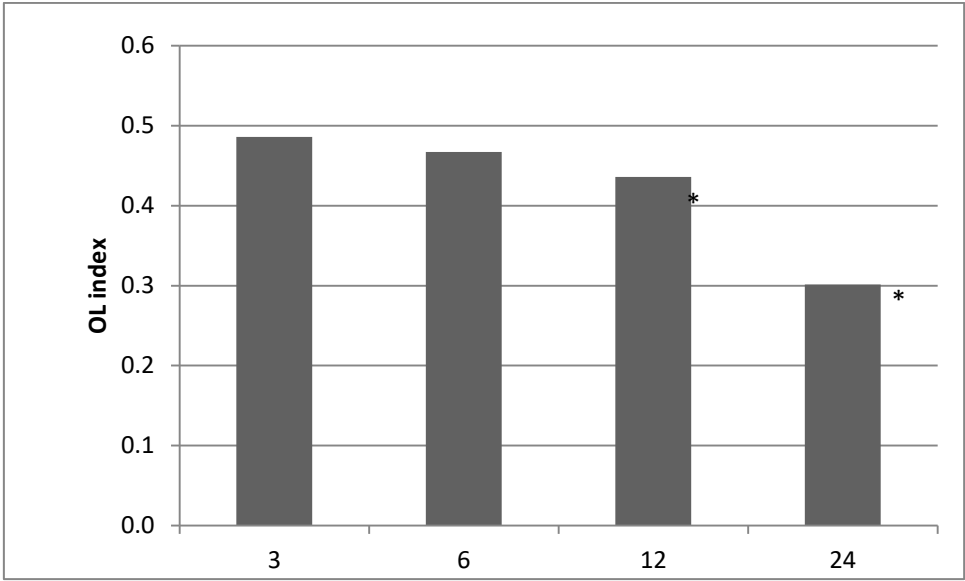
	DAF-FM				DCFH			
	3m		24m		3m		24m	
Hippocampus	53.45 ± 7.14	41.95 ± 9.79	46.33 ± 9.00	52.13 ± 14.53				
Hypothalamus	44.70 ± 8.74	37.55 ± 15.08	55.54 ± 6.50	58.78 ± 10.55				
Prefrontal cortex	64.66 ± 21.12	57.21 ± 26.46	56.68 ± 8.41	57.98 ± 19.49				

	MITOSOX				MITOTRACKER			
	3m		24m		3m		24m	
Hippocampus	52.80 ± 10.55	49.22 ± 11.44	89.32 ± 5.72	84.67 ± 6.70				
Hypothalamus	50.32 ± 12.98	37.77 ± 10.40	88.61 ± 8.75	87.57 ± 6.76				
Prefrontal cortex	56.20 ± 20.29	44.70 ± 18.09	76.56 ± 8.81	92.87 ± 3.80				









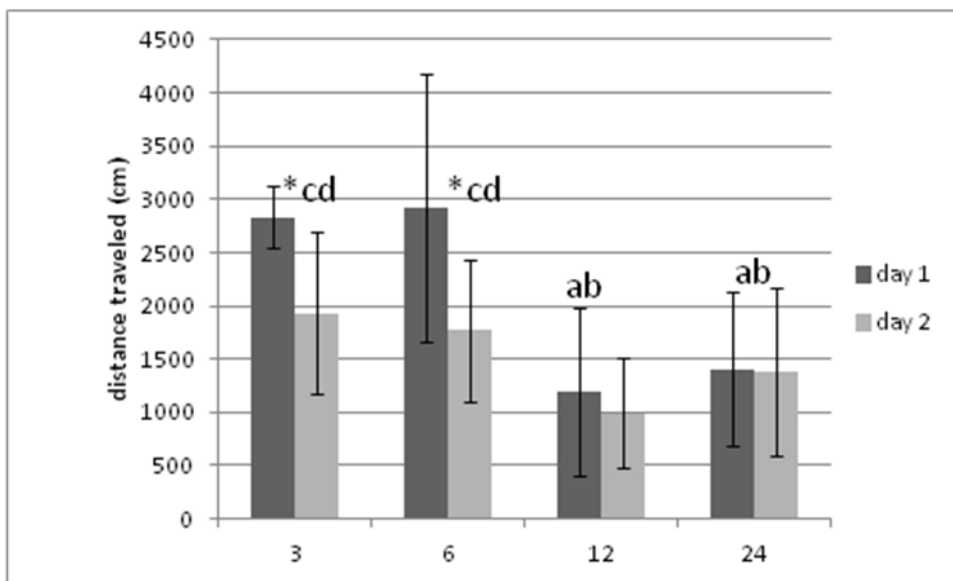


Figure 1: Animals' weights; data = mean \pm sd . m=months

Figure 2: Antioxidant defenses. Correlation (bottom panels) and scatter plot (top panels) matrices. Superoxide dismutase (A), total Glutathione (B) and glutathione peroxidase (C). Scatter plot includes Loess curve. D-F, I. Partial correlation controlled by age (bottom panels) and scatter plot (top panels) matrices. Superoxide dismutase (D), total Glutathione (E) and glutathione peroxidase (F). T, Kendall coefficient

Figure 3: Antioxidant damage and nitrites and nitrates. Correlation (bottom panels) and scatter plot (top panels) matrices. Carbonyl levels (A), MDA (B) and nitrites and nitrates (C). Scatter plot includes Loess curve. D-F, I. Partial correlation controlled by age (bottom panels) and scatter plot (top panels) matrices. Carbonyl levels (D), MDA (E) and nitrites and nitrates (F). T, Kendall coefficient

Figure 4: Object location index. * significantly below 50% index. $p \leq 0.05$

Figure 5: Total distance traveled (cm). a - differs from 3 months, b - differs from 6 months, c - differs from 12 months, d - differs from 24 months, and * - day 1 different than day 2. $p \leq 0.05$.

Material e métodos complementares

Todos os procedimentos deste trabalho foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (projeto número 23957). Foram utilizados 70 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Os animais provenientes do CREAL-UFRGS, após completarem dois meses de idade, foram transportados para o biotério local do departamento de biofísica onde foram alojados em gaiolas de fundo sólido com outros animais, animais reprodutores foram pareados com fêmeas, e não reprodutores permaneceram com cinco animais na mesma caixa (nas idades mais tenras, os animais que atingiram pelo menos dez meses foram separados em 2 caixas). Quando os animais atingiram a idade estipulada pelo projeto (3, 6, 12 e 24 meses de idade) eles foram eutanasiados (todas as eutanásias ocorreram no período final do outono ou início do inverno). Filhotes não utilizados foram doados para outro projeto.

O peso dos animais estava entre 250 e 500g, estavam na faixa proporcional esperada pela idade. Eles apresentavam boa atividade motora e não apresentavam perda de pelos ou qualquer outro sintoma de doença. Animais doentes foram eutanasiados (seis animais).

O biotério era mantido em um ciclo claro/escuro de 12 horas e a temperatura era controlada a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com ração padrão de laboratório e água *ad libitum*.

Coleta de dados

Periodicamente os animais eram pesados, e os dados reprodutivos, como número de ninhadas/filhotes eram registrados em planilhas de controle.

Ensaio bioquímicos - realizados de acordo com o artigo 2.

Níveis hormonais

Os níveis de testosterona foram mensurados em soro por radioimunoensaio utilizando o kit Testosterone RIA DSL-4100[®] kits (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Oxford, UK). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes.

Estatística

PCA foi realizada de acordo com as especificações do artigo 2, porém foram adicionados os níveis de testosterona e construído um cladograma baseado na distância entre os pontos (animais).

Resultados e discussão complementares

A fim de realizar uma expansão dos resultados do perfil redox de cinco órgãos (coração, rim, gônadas, pulmão e cérebro) de ratos machos com e sem atividade reprodutora, apresentados no artigo 1, obtidos durante um período de seis anos e reanalisados em conjunto para esta tese, a segunda parte deste trabalho se propôs a analisar o perfil oxidativo de quatro regiões distintas do cérebro de ratos machos, ao longo do envelhecimento.

Entre os projetos apresentados nos artigos 1 e 2 houve uma diferença de seis anos, neste ínterim a criação dos animais fornecidos pela universidade passou por uma reestruturação, os animais passaram a ser criados em condições assépticas, em caixas fechadas alocadas em estantes de microisolamento e manipulados apenas com o auxílio de pinças. Ao completarem dois meses de idade, os animais foram transportados para o biotério setorial do Departamento de Biofísica – UFRGS, e separados de acordo com a metodologia descrita no material e métodos suplementar.

Dados dos animais

Um dos objetivos deste trabalho era a documentação detalhada de todos os dados de reprodução dos animais utilizados durante seu período de envelhecimento, que por dificuldades técnicas não foram possíveis manter no experimento anterior. Com isso foram registrados os pesos dos machos, as datas que as fêmeas pariram as ninhadas e o número de filhotes. O peso das fêmeas não foi registrado devido à inconstância do acesso a elas, para evitar perturbar

quando estivessem prenhes podendo levar a um aborto, nascimento prematuro ou deficiências cognitivas (Dole *et al.*, 2003; Glover *et al.*, 2010).

Os resultados aqui apresentados, sobre o número de filhotes, foram apurados após a prole completar alguns dias (± 7 dias), para não perturbar a fêmea. Ou seja, o tamanho da prole é o número de animais que sobreviveram aos primeiros dias, não incluindo os animais que foram descartados pelas mães, um processo natural em ratos. Os motivos para este infanticídio são diversos, podendo ser estresse materno, ou ainda a mãe pode descartar um filhote por considerá-lo inadequado (Sengupta, 2013). Ela pode matar os filhotes quando as condições de alimentação não são favoráveis ou se ela sofreu um desgaste físico/emocional durante o parto, então comeria um ou mais filhotes. Estes dois últimos motivos ficam descartados para nossos resultados, uma vez que o acesso à comida e água era livre, então infanticídio por inanição seria improvável.

Os dados coletados indicam que os animais tiveram mais ninhadas, e conseqüentemente mais filhotes, durante a primavera e menos durante o outono (Fig. 10a). Porém o tamanho destas ninhadas não se alterou drasticamente durante as estações (Fig. 10b).

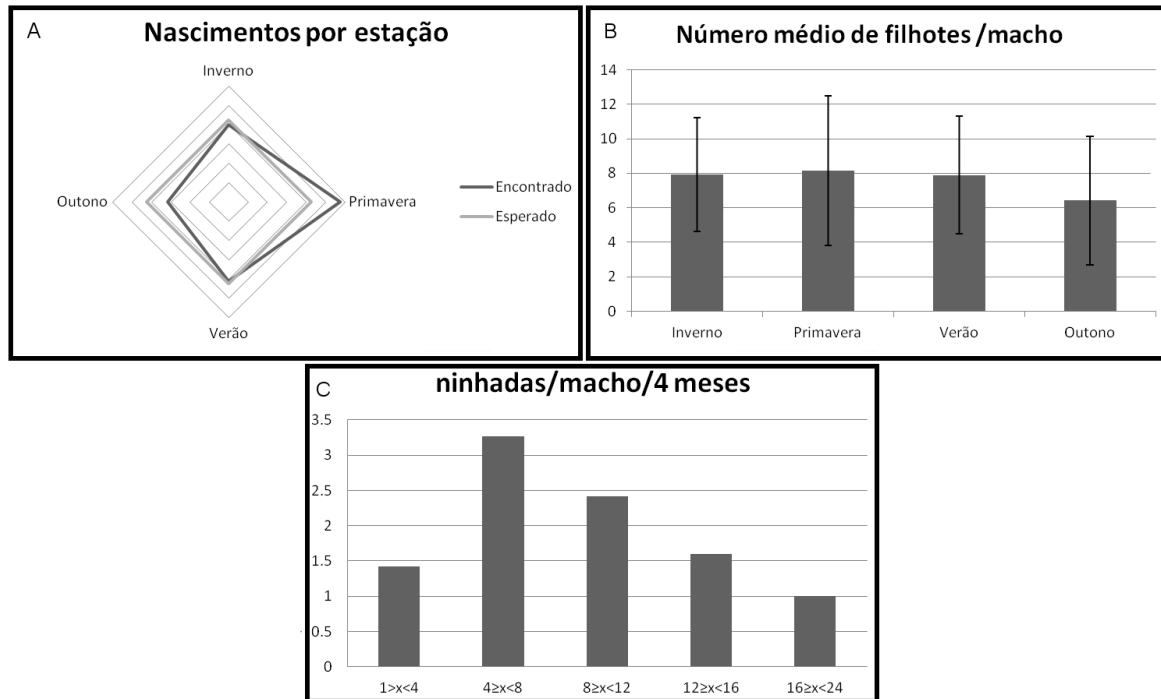


Figura 10: a) número de nascimentos por estação; b) Número médio de filhotes por animal; c) Número médio de ninhadas no período de 4 meses de idade de cada animal.

Em projetos anteriores (artigo I desta tese) os animais reproduziram até atingirem 11 meses (aproximadamente), porém durante o desenvolvimento deste projeto, os animais continuaram a produzir prole até idades avançadas (24 meses). Como esperado (Fig. 10c), com o avanço da idade, após o pico reprodutivo em seis meses temos uma redução da quantidade de prole gerada por animal no período determinado - intervalos de 4 meses. Considerando que em animais o *fitness* da prole reduz com o avanço da idade (Carnes *et al.*, 2011), esta redução progressiva é esperada. Outro ponto relevante é que ratos selvagens (vida livre) possuem uma expectativa de vida de 10 meses (Panti-May *et al.*, 2016).

O tamanho da prole não se alterou durante as estações, porém o número de proles aumentou na primavera, este resultado foi interessante, pois uma vez que animais de laboratório não estão sujeitos a alterações de temperatura e umidade por causa do controle eletrônico (ar condicionado) e o fotoperíodo dos animais também é controlado, mantendo sempre um ciclo de 12h claro/escuro. O contato com o ambiente externo é quase desprezível. Embora os mecanismos específicos deste fenômeno, em animais com um ambiente controlado, ainda não estejam esclarecidos, sabe-se que os animais de laboratório têm uma diferença nos testes de comportamento e níveis hormonais oscilam durante a variação cicanual (Caldwell *et al.*, 1984; Vazquez *et al.*, 2007). Macacos rhesus apresentam uma variação nos níveis de testosterona, onde os níveis mais baixos ocorrem na primavera, e os mais altos no inverno, como apresentado no trabalho de Robinson *et al.* (1975). Com esta alteração nos níveis de testosterona os macacos ficariam motivados a procurar parceiras durante o inverno e a prole nasceria na primavera.

Resultados de bioquímica redox também podem ser alterados dependendo de qual estação sejam realizadas as eutanásias dos animais (Ramos-Vasconcelos *et al.*, 2005). Belló-Klein *et al.* (2000) reportaram alterações nos resultados de GPx e catalase, no fígado e coração de ratos, que apresentaram atividade maior no verão.

Zeitgeber é um assunto amplamente estudado (Field, 1975), e é possível diferenciar em dois tipos principais: o tipo I que está ligado diretamente às mudanças no fotoperíodo e secreções de melatonina pela glândula pineal (Paul *et al.*, 2008); o tipo II funcionaria como um oscilador endógeno, não precisando de

estímulos para desencadear mudanças sazonais, porém este tipo de “relógio” precisaria ser ajustado ocasionalmente, por estímulos ambientais. Comumente sugere-se que os estímulos seriam fotoperíodo, temperatura ou campo geomagnético (Bartsch *et al.*, 1994; Kriegsfeld *et al.*, 2000). Em animais criados em laboratório o fotoperíodo e temperatura são controlados, e evidências apontam que não há influência pelo campo geomagnético (Tryon *et al.*, 2012). Entretanto Ferguson e Maier (2013) sugerem que os estímulos podem vir de informações olfatórias (p.e. grãos de pólen microscópicos) ou ainda da própria ração do biotério, que pode variar de acordo com a data de fabricação (Thigpen *et al.*, 2007; Heindel e Vom Saal, 2008).

Análise de componentes principais

Como resultados principais da análise dos órgãos dos animais reprodutores e não reprodutores ao longo do envelhecimento (artigo 1 da tese), podemos ver que claramente temos uma divisão dos animais em dois grupos, pelo menos quanto à semelhança do seu perfil oxidativo, os reprodutores e não reprodutores. Os animais não reprodutores apresentaram pouca variação ao longo do processo de envelhecimento, diferenciando-se apenas na idade mais avançada (24 meses). Já os animais reprodutores apresentaram um perfil diferenciado, com a divisão em três grupos: 3 e 24 meses formando um grupo, 6 meses formando outro e o último composto por animais de 12 meses (Fig. 11a). Como discutido no artigo 1 este resultado reforça o custo metabólico da reprodução e concorda com a teoria do soma descartável onde investimentos na reprodução acarretariam em deficiências em outras áreas, como por exemplo no reparo e manutenção do soma (corpo).

A nova leva de animais, utilizada no artigo 2, apresentou diferenças nos resultados. Nenhuma das medidas do perfil oxidativo apresentou diferença nas quatro regiões cerebrais estudadas quando comparados reprodutores contra não reprodutores. Uma complicação nas análises foi a distribuição heterogênea das réplicas biológicas, uma vez que as réplicas técnicas estavam bem homogêneas. Os testes de locomotores (CA) e de memória (CA, LO) também não apresentaram diferenças entre os animais reprodutores e os não reprodutores.

Para avaliar se a presença dos filhotes poderia estressar os animais foi realizado um teste de labirinto em cruz elevado com animais reprodutores e não reprodutores o teste não apresentou diferença entre nenhum dos grupos. Os animais de 24 meses foram descartados do teste, pois eles ficaram imóveis no meio da plataforma. Este resultado comparado com o desempenho deles no teste de campo aberto indica que os animais não exploraram por questões de baixa capacidade física.

Para ter um controle da influência dos filhotes, animais não reprodutores, na idade de três meses, que foram colocados com fêmeas prenhes na metade do período de gestação e os reprodutores foram deixados com outros machos. Os animais não reprodutores não atacaram as fêmeas e também não mataram os filhotes, e os machos não brigaram entre si, nenhum dos grupos diferiu (resultados não mostrados).

Os resultados da PCA (Fig. 11b) mostram 4 grupos, 1 formado por 12 e 24 meses, outro formado por 12 meses, e dois grupos formados por 3 e 6 meses

combinados. Em nenhum caso a reprodução parece influenciar na formação dos grupos.

Um dos possíveis motivos para esta alteração entre os dois grupos (primeiro e segundo artigo) de animais poderia ser a variação da testosterona. É sabido o papel da testosterona como pró-oxidante em quase todos os tecidos, exceto nos testículos (Salomon *et al.*, 2013; Halliwell e Gutteridge, 2015), porém os mecanismos exatos ainda não estão bem definidos.

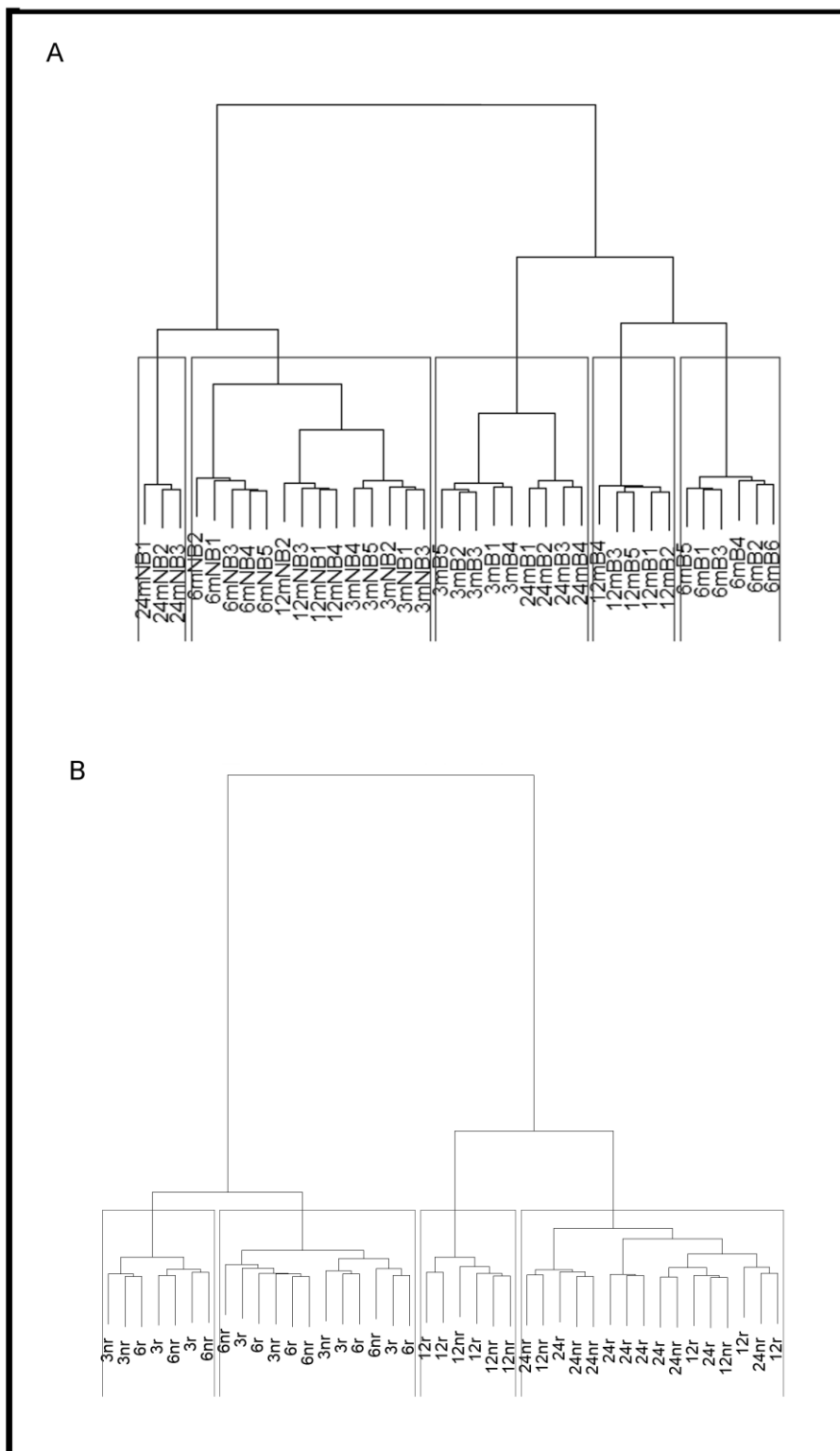


Figura 11: Análise de componentes principais, A) primeira criação de animais B) segunda criação de animais.

Testosterona

A testosterona é um esteroide androgênico anabólico e o principal hormônio sexual masculino. Promove o desenvolvimento dos tecidos sexuais masculinos como a próstata, os testículos e as características sexuais secundárias, por exemplo, a galhada de cervídeos ou o aumento da musculatura e massa óssea de primatas. Sua biossíntese é sinalizada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadas (Fig. 12) e está detalhada na Figura 13.

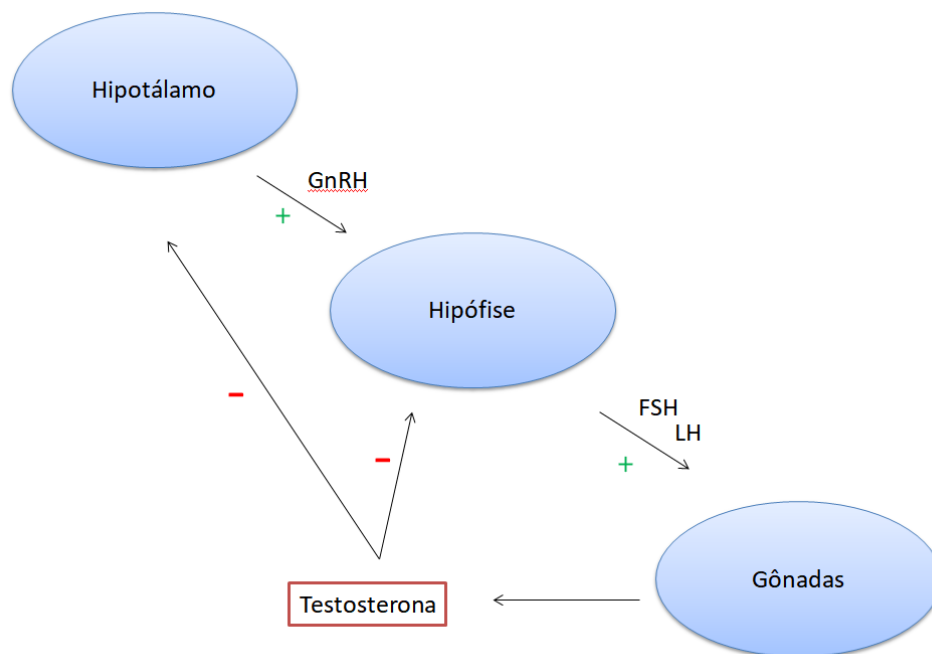


Figura 12: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

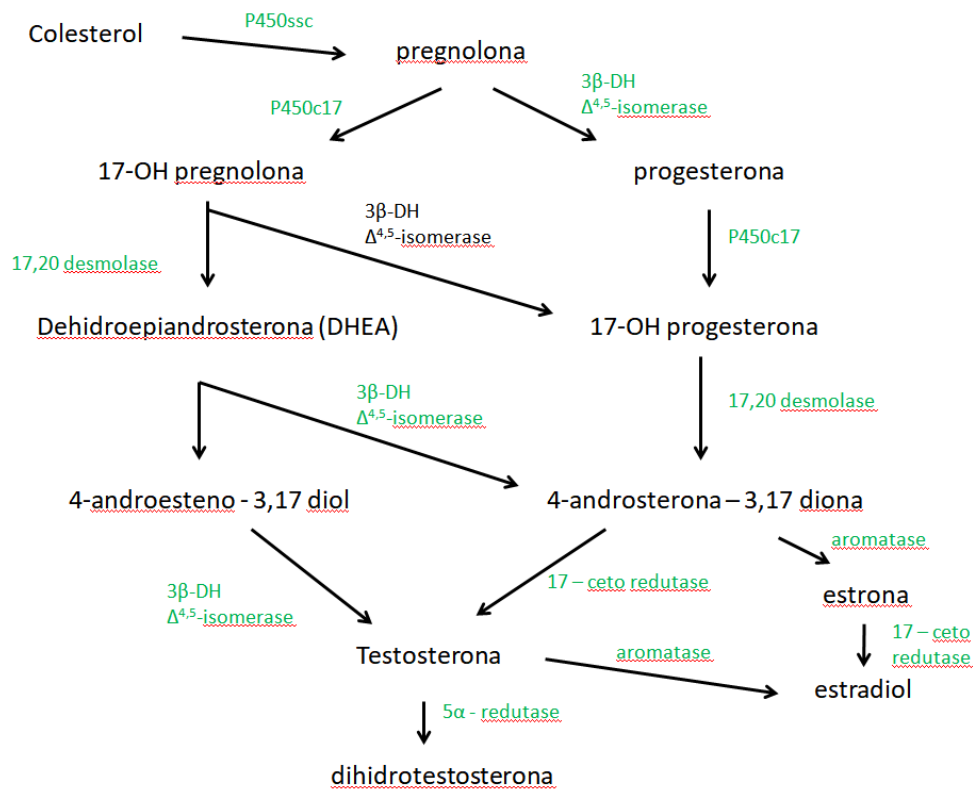


Figura 13: Rota de síntese da testosterona

Ela atua principalmente através da ligação e ativação do receptor de andrógeno (RA). O RA é um fator de transcrição localizado no citoplasma, após a ligação com um andrógeno ele se transloca para o núcleo e estimula a transcrição de genes responsivos aos andrógenos (Fig. 14), porém existem poucos dados referentes aos efeitos da testosterona diretamente no cérebro (Pihlajamaa *et al.*, 2015).

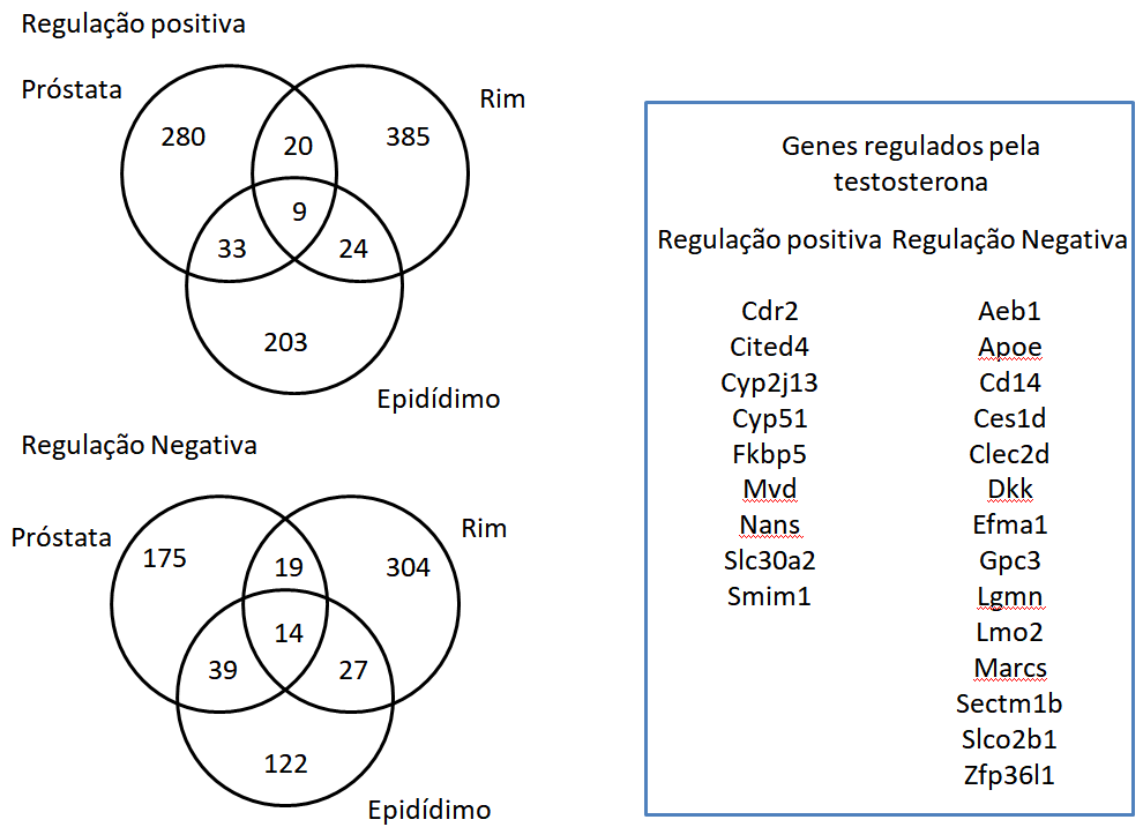


Figura 14: Genes regulados pela testosterona em próstata, rim e epidídimo. Adaptada de (Pihlajamaa *et al.*, 2015)

Uma possível via para a testosterona gerar espécies reativas poderia ser no desenvolvimento de características sexuais secundárias (Buchanan *et al.*, 2001) que aumentariam a síntese proteica (para o aumento da musculatura, por exemplo), aumentando assim a geração de ERs (produzidas como subprodutos no retículo endoplasmático) e este aumento levaria a danos, como previamente discutido.

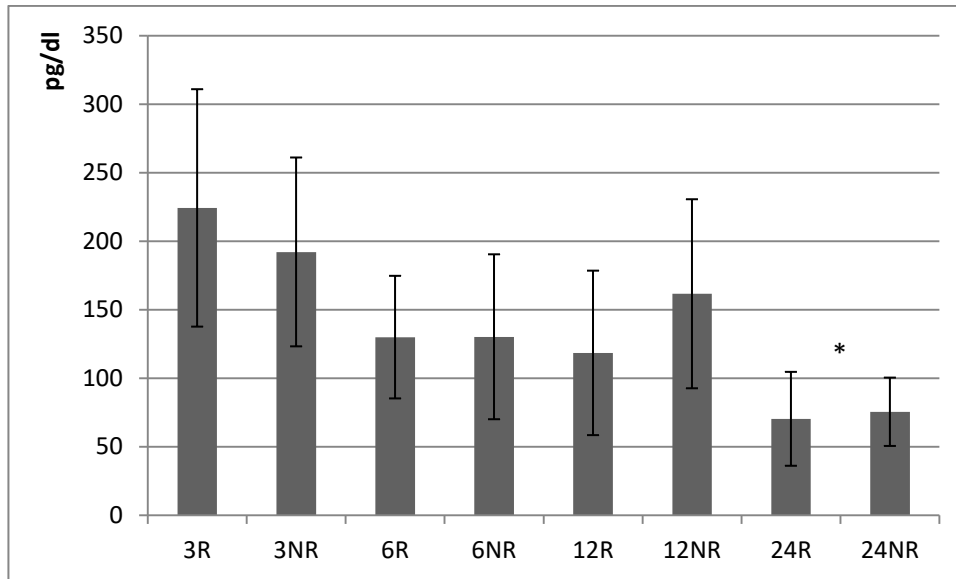


Figura 15: Níveis de testosterona em ratos machos com a sem atividade reprodutora. R reprodutor, NR não reprodutor. * difere de 3 meses

Os níveis de testosterona não variaram entre os animais reprodutores e não reprodutores (Fig. 15). Isto poderia ter ocorrido de duas formas, os animais não reprodutores estariam com níveis muito altos de testosterona, ou os reprodutores com níveis de testosterona muito baixos. Quando comparados os níveis de testosterona dos animais não reprodutores do artigo 1 e artigo 2 podemos perceber que os resultados da segunda hipótese são mais precisos, os níveis de testosterona estão significativamente mais baixos quando comparados com os dos primeiros animais. Um dos motivos para estes níveis baixos poderia ser por estes animais terem sido criados em condições assépticas, o que prejudicaria sua microbiota intestinal. Alterações na microflora intestinal levam a alterações nos níveis de andrógenos (Markle *et al.*, 2013; Al-Asmakh *et al.*, 2014; Hoban *et al.*, 2016).

Embora a reprodução não tenha alterado os níveis da testosterona o envelhecimento parece ter afetado, estes níveis se mantêm constantes nas idades de 3, 6 12 meses até uma queda nos níveis animais de 24 meses.

Então a ausência de níveis elevados de testosterona poderiam ter levado a esta incongruência entre o primeiro grupo de experimentos no animal inteiro e os resultados em cérebro. Para confirmar os resultados seria interessante realizar ensaios em animais não reprodutores, com injeções de testosterona avaliar as alterações no perfil oxidativo dos animais.

A testosterona foi a única variável mensurável que conseguimos identificar que apresentou alterações entre um trabalho e o outro, entretanto ocorrem outras explicações que não pudemos avaliar como alterações na microbiota e parasitas dos animais que poderiam levar a alterações no perfil redox dos animais (Brooks e Garratt, 2017), uma vez que os animais foram criados em condições assépticas esses fatores poderiam ter desempenhado um papel importante, seria interessante realizar os experimentos com ratos wistar provenientes de outro biotério, com os animais criados em condições diferentes.

Os resultados ressaltam a importância de entender melhor os mecanismos pelos quais a testosterona influencia na bioquímica redox e ressaltam ainda mais a importância de cuidados experimentais como a época de realizar a eutanásia dos animais ou a forma como eles foram criados, pois as condições controladas ainda contêm muitas variáveis.

Em conclusão, a reprodução parece estar afetando o perfil redox dos animais ao longo do envelhecimento, possivelmente por influência hormonal, visto que quando a testosterona não se alteraram o perfil entre reprodutores e não reprodutores não apresentou diferenças.

Referências

AL-ASMAKH, M. et al. The gut microbiota and developmental programming of the testis in mice. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e103809, 2014. ISSN 1932-6203.

ALVAREZ, M. N. et al. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, n. 2, p. 222-232, 2004. ISSN 0003-9861.

AZZI, A. Oxidative stress: a dead end or a laboratory hypothesis? **Biochemical and biophysical research communications**, v. 362, n. 2, p. 230-232, 2007. ISSN 0006-291X.

BARTSCH, H. et al. Seasonality of Pineal Melatonin Production in the Rat: Possible Synchronization by the Geomagnetic Field. **Chronobiology International**, v. 11, n. 1, p. 21-26, 1994/01/01 1994. ISSN 0742-0528.

BEHLER, J. L.; KING, F. W. **Audubon Society field guide to North American reptiles and amphibians**. Knopf: Distributed by Random House, 1979. ISBN 0394508246.

BELLÓ-KLEIN, A. et al. Circaannual changes in antioxidants and oxidative stress in the heart and liver in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 203-208, 2000. ISSN 0742-8413.

BROOKS, R. C.; GARRATT, M. G. Life history evolution, reproduction, and the origins of sex-dependent aging and longevity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1389, n. 1, p. 92-107, 2017. ISSN 1749-6632.

BUCHANAN, K. L. et al. Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling? **Proc R Soc B Biol Sci**, v. 268, n. 1474, p. 1337-1344, 2001. ISSN 0962-8452.

BURNETT, A. L. et al. NITRIC-OXIDE - A PHYSIOLOGICAL MEDIATOR OF PENILE ERECTION. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 401-403, Jul 17 1992. ISSN 0036-8075.

CALDWELL, G. S.; GLICKMAN, S. E.; SMITH, E. R. Seasonal aggression independent of seasonal testosterone in wood rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 16, p. 5255-5257, August 1, 1984 1984.

CANTEROS, G. et al. Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: Increased by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 4246-4250, Apr 30 1996. ISSN 0027-8424.

CARNES, B. A.; RIESCH, R.; SCHLUPP, I. The delayed impact of parental age on offspring mortality in mice. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 67, n. 4, p. 351-357, 2011. ISSN 1758-535X.

COSTANTINI, D. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. **Ecology letters**, v. 11, n. 11, p. 1238-1251, 2008. ISSN 1461-0248.

DA SILVA, S. M. et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 166, n. 1, p. 159-162, 2009. ISSN 0304-4017.

DOLE, N. et al. Maternal stress and preterm birth. **American journal of epidemiology**, v. 157, n. 1, p. 14-24, 2003. ISSN 1476-6256.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proc R Soc B Biol Sci**, v. 276, n. 1663, p. 1737-1745, 2009. ISSN 0962-8452.

FABIAN, D.; FLATT, T. The evolution of aging. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 9, 2011.

FERGUSON, S. A.; MAIER, K. L. A review of seasonal/circannual effects of laboratory rodent behavior. **Physiology & behavior**, v. 119, p. 130-136, 2013. ISSN 0031-9384.

FIELD, A. C. Seasonal changes in reproduction, diet and body composition of two equatorial rodents. **African Journal of Ecology**, v. 13, n. 3-4, p. 221-235, 1975. ISSN 1365-2028.

FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Evolutionary analysis**. Pearson Education Upper Saddle River (NJ), 2004. ISBN 0131018590.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, Sep 2011. ISSN 1523-0864.

GILBERT, L. E. Pollen feeding and reproductive biology of Heliconius butterflies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 6, p. 1403, 1972.

GLOVER, V.; O'CONNOR, T.; O'DONNELL, K. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 1, p. 17-22, 2010. ISSN 0149-7634.

GOODENOUGH, J.; MCGUIRE, B.; JAKOB, E. **Perspectives on animal behavior**. John Wiley & Sons, 2009. ISBN 0470045175.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 5th. New York: Oxford University Press, 2015. 704

HAMILTON, W. D. The moulding of senescence by natural selection. **Journal of theoretical biology**, v. 12, n. 1, p. 12-45, 1966. ISSN 0022-5193.

HARMAN, D. Aging - a theory based on free-radical and radiation-chemistry. **J Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956. ISSN 0022-1422.

HARMAN, D. The biologic clock: the mitochondria? **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 20, n. 4, p. 145-147, 1972. ISSN 1532-5415.

HARSHMAN, L. G.; ZERA, A. J. The cost of reproduction: the devil in the details. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 2, p. 80-86, 2007. ISSN 0169-5347.

HEADS, M. Birds of paradise, biogeography and ecology in New Guinea: a review. **Journal of Biogeography**, v. 28, n. 7, p. 893-925, 2001. ISSN 1365-2699.

HEINDEL, J. J.; VOM SAAL, F. S. Meeting report: batch-to-batch variability in estrogenic activity in commercial animal diets—importance and approaches for laboratory animal research. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 3, p. 389, 2008.

HOBAN, A. E. et al. Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. **Neuroscience**, v. 339, p. 463-477, 2016. ISSN 0306-4522.

IRESTED, M. et al. An unexpectedly long history of sexual selection in birds-of-paradise. **Evolutionary Biology**, v. 9, n. 235, p. 235, 2009.

JONES, D. P.; SIES, H. The redox code. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 9, p. 734-746, 2015. ISSN 1523-0864.

KATSUYAMA, M. NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. **Journal of pharmacological sciences**, v. 114, n. 2, p. 134-146, 2010. ISSN 1347-8613.

KENYON, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 504-512, 2010. ISSN 0028-0836.

KIRKWOOD, T. B. Evolution of ageing. **Nature**, v. 270, n. 5635, p. 301-304, 1977. ISSN 0028-0836.

KIRKWOOD, T. B.; MELOV, S. On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history. **Current Biology**, v. 21, n. 18, p. R701-R707, 2011. ISSN 0960-9822.

KIRKWOOD, T. B. L. Sex and ageing. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 3, p. 413-418, Mar 2001. ISSN 0531-5565.

KNOBIL, E. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. Gulf Professional Publishing, 2006. ISBN 012515402X.

KRIEGSFELD, L. J. et al. Photoperiod and Temperature Interact to Affect the GnRH Neuronal System of Male Prairie Voles (*Microtus ochrogaster*). **Journal of Biological Rhythms**, v. 15, n. 4, p. 306-316, 2000.

KUMAR, A.; POTTIBOYINA, V.; SEVILLA, M. D. Hydroxyl radical (OH•) reaction with guanine in an aqueous environment: a DFT study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 50, p. 15129-15137, 2011. ISSN 1520-6106.

LENART, P.; BIENERTOVÁ-VAŠKŮ, J. Keeping up with the Red Queen: the pace of aging as an adaptation. **Biogerontology**, v. 18, n. 4, p. 693-709, 2017. ISSN 1389-5729.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194-1217, 2013. ISSN 0092-8674.

MAGALHÃES, J. P. D.; COSTA, J.; CHURCH, G. M. An analysis of the relationship between metabolism, developmental schedules, and longevity using phylogenetic independent contrasts. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 2, p. 149-160, 2007. ISSN 1758-535X.

MARINHO, H. S. et al. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. **Redox biology**, v. 2, p. 535-562, 2014. ISSN 2213-2317.

MARKLE, J. G. et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. **Science**, v. 339, n. 6123, p. 1084-1088, 2013. ISSN 0036-8075.

MEDAWAR, P. B. **An unsolved problem of biology**. College, 1952.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993. ISSN 0028-4793.

NATHAN, C.; XIE, Q.-W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 915-918, 1994. ISSN 0092-8674.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 67, 2012. ISSN 1756-3305.

NIGRELLI, R. F. SECTION OF BIOLOGY: SOME LONGEVITY RECORDS OF VERTEBRATES. **Transactions of the New York Academy of Sciences**, v. 16, n. 6 Series II, p. 296-299, 1954. ISSN 2164-0947.

OLSSON, M.; MADSEN, T.; SHINE, R. Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. **Proc. R. Soc. B**, v. 264, n. 1380, p. 455-459, Mar 1997. ISSN 0962-8452.

OSTROW, R. S. et al. A rhesus monkey model for sexual transmission of a papillomavirus isolated from a squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 20, p. 8170-8174, 1990. ISSN 0027-8424.

PANCARCI, Ş. et al. Changes in follicular blood flow and nitric oxide levels in follicular fluid during follicular deviation in cows. **Animal reproduction science**, v. 123, n. 3, p. 149-156, 2011. ISSN 0378-4320.

PANTI-MAY, J. A. et al. A two-year ecological study of Norway rats (*Rattus norvegicus*) in a Brazilian urban slum. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0152511, 2016. ISSN 1932-6203.

PARTRIDGE, L. The new biology of ageing. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1537, p. 147-154, 2010. ISSN 0962-8436.

PAUL, M. J.; ZUCKER, I.; SCHWARTZ, W. J. Tracking the seasons: the internal calendars of vertebrates. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1490, p. 341-361, 08/07 2008. ISSN 0962-8436
1471-2970.

PÉREZ, V. I. et al. Is the oxidative stress theory of aging dead? **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1005-1014, 2009. ISSN 0304-4165.

PIHLAJAMAA, P.; SAHU, B.; JÄNNE, O. A. Determinants of receptor-and tissue-specific actions in androgen signaling. **Endocrine reviews**, v. 36, n. 4, p. 357-384, 2015. ISSN 0163-769X.

RAMOS-VASCONCELOS, G. R.; CARDOSO, L. A.; HERMES-LIMA, M. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 165-174, 2005/02/01/ 2005. ISSN 1532-0456.

REBRIN, I.; KAMZALOV, S.; SOHAL, R. S. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. **Free Rad Biol Med**, v. 35, n. 6, p. 626-635, Sep 2003. ISSN 0891-5849.

ROBINSON, J. A. et al. Effects of Age and Season on Sexual Behavior and Plasma Testosterone and Dihydrotestosterone Concentrations of Laboratory-

Housed Male Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*)¹. **Biology of Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 203-210, 1975. ISSN 0006-3363.

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.

ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970-972, 2005. ISSN 0022-3395.

RUBNER, M. **Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zu wachstum und ernährung**. Oldenbourg, 1908.

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 2013. ISSN 0531-5565.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 197-223, 2005. ISSN 0732-0582.

SELMAN, C. et al. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? **Trends in ecology & evolution**, v. 27, n. 10, p. 570-577, 2012. ISSN 0169-5347.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with human's. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 6, 2013. ISSN 2008-7802.

SHUVAEVA, T. M. et al. Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 5, Sep 2009. ISSN 1068-1620.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, n. 0, 2017. ISSN 0066-4154.

SIES, H. et al. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, p. 617-631, 1985. ISSN 0080-4622.

SIES, H.; JONES, D. In G. Fink. **Oxidative stress in Encyclopedia of stress**, p. 45-48, 2007.

SKARZYNSKI, D. J. et al. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin F₂-induced luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1674-1681, 2003. ISSN 0006-3363.

SMITH, G.; DOBSON, A. Sexually transmitted diseases in animals. **Parasitology Today**, v. 8, n. 5, p. 159-166, 1992. ISSN 0169-4758.

SOHAL, R. S.; ORR, W. C. The redox stress hypothesis of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 3, p. 539-555, 2012. ISSN 0891-5849.

THIGPEN, J. E. et al. Variations in phytoestrogen content between different mill dates of the same diet produces significant differences in the time of vaginal opening in CD-1 mice and F344 rats but not in CD Sprague-Dawley rats. **Environmental health perspectives**, v. 115, n. 12, p. 1717, 2007.

TRYON, V. L. et al. Magnetic field polarity fails to influence the directional signal carried by the head direction cell network and the behavior of rats in a task requiring magnetic field orientation. **Behavioral neuroscience**, v. 126, n. 6, p. 835, 2012. ISSN 1939-0084.

TURNER, J. R. Experiments on the demography of tropical butterflies. II. Longevity and home-range behaviour in *Heliconius erato*. **Biotropica**, p. 21-31, 1971. ISSN 0006-3606.

VAZQUEZ, N. et al. Seasonal variations of gonadotropins and prolactin in the laboratory rat. Role of maternal pineal gland. **Physiological research**, v. 56, n. 1, p. 79, 2007. ISSN 0862-8408.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular cell**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2007. ISSN 1097-2765.

WAITT, C. et al. Evidence from rhesus macaques suggests that male coloration plays a role in female primate mate choice. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 2, p. S144-S146, 2003. ISSN 0962-8452.

WEISMANN, A.; POULTON, E. B.; SHIPLEY, A. E. **Essays upon heredity and kindred biological problems**. Clarendon press, 1891.

WIERSMA, P. et al. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 271, p. S360-S363, Aug 2004. ISSN 0962-8452.

WILLIAMS, G. C. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. **Evolution**, v. 11, n. 4, p. 398-411, 1957. ISSN 00143820, 15585646.

WINTERBOURN, C. C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. **Methods in enzymology**, v. 528, p. 3-25, 2013. ISSN 0076-6879.

WLASCHEK, M.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, n. 5, p. 452-461, 2005. ISSN 1524-475X.

YANG, J.-N. Viscous populations evolve altruistic programmed ageing in ability conflict in a changing environment. **Evolutionary Ecology Research**, v. 15, n. 5, p. 527-543, 2013. ISSN 1522-0613.

YOSHIHARA, D.; FUJIWARA, N.; SUZUKI, K. Antioxidants: Benefits and risks for long-term health. **Maturitas**, v. 67, n. 2, p. 103-107, Oct 2010. ISSN 0378-5122.

Anexo I – Carta do conselho de ética



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23957

Título: Avaliação de estresse oxidativo ao longo do envelhecimento em hipocampo, cortex pré-frontal e hipotálamo de ratos machos com e sem atividade reprodutiva

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARA DA SILVEIRA BENFATO - coordenador de 01/03/2013 até 31/12/2016

TIAGO BOEIRA SALOMON - Aluno de Doutorado de 01/03/2013 até 31/12/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 328 ratos Wistar (212 machos e 116 fêmeas), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 13 de Dezembro de 2012

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética

Anexo II – Curriculum vitae

Identificação

Nome

Tiago Boeira Salomon

Nome em citações bibliográficas

SALOMON, Tiago Boeira;Salomon, Tiago Boeira;Salomon, Tiago B.;Tiago B. Salomon;SALOMON, Tiago B.;BOEIRA SALOMON, TIAGO

Endereço

Endereço Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica.

Avenida Bento Gonçalves, 9500 prédio 43431 sala 110

Agronomia

90540000 - Porto Alegre, RS - Brasil

Telefone: (51) 33087372

Fax: (51) 33167003

Formação acadêmica/titulação

2013

Doutorado em andamento em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

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

Título: Avaliação de estresse oxidativo e consequências cognitivas ao longo do envelhecimento em hipocampo, cortex pré-frontal e hipotálamo de ratos machos com e sem atividade reprodutiva,

Orientador: Mara da Silveira Benfato.

Coorientador: Lucas de Oliveira Alvares.

Grande área: Ciências Biológicas

Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.

2011 - 2013

Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).

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

Título: Estresse oxidativo em ratos machos com e sem atividade reprodutiva durante o

processo de envelhecimento, Ano de Obtenção: 2013.

Orientador: Mara da Silveira Benfato.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Palavras-chave: Aging; Gonads; Male Rats; Oxidative stress; Reproductive cycle.

Grande área: Ciências Biológicas

Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.

2004 - 2009

Graduação em Ciências Biológicas.

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

Título: Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity.

Orientador: Mara da Silveira Benfato.

Formação Complementar

2007 - 2007

Extensão universitária em Introdução ao Dreamweaver. (Carga horária: 20h).

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

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Vínculo institucional

2012 - 2012

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Tutor, Carga horária: 40

Vínculo institucional

2010 - 2011

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Técnico, Carga horária: 20

Atividades

4/2005 - Atual

Estágios , Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica.

Estágio realizado

Estágio no Laboratório de Estresse Oxidativo.

3/2006 - 7/2006

Estágios , Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica.

Estágio realizado

Monitoria na disciplina de Estresse Oxidativo em Sistemas Biológicos.

Idiomas

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Português

Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Russo

Produções

Artigos publicados em periódicos

1. **Salomon, Tiago Boeira**; **BENFATO, Mara Silveira** . Sexual activity affects the redox profile along the aging process in male rats. *BIOGERONTOLOGY* **JCR**, 2017.
2. Schüller, Ártur Krumberg ; MENA CANATA, DIEGO ANTONIO ; **HACKENHAAR, Fernanda Schäfer** ; **ENGERS, VANESSA KRÜGER** ; **HEEMANN, FERNANDA MACIEL** ; **PUTTI, JORDANA SALETE** ; **Salomon, Tiago Boeira** ; **BENFATO, Mara Silveira** . Effects of lipoic acid and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid on the liver ovariectomized rat model of menopause. *Pharmacological Reports* **JCR**, 2017.
3. **MACIEL AUGUST, PAULINE** ; **GRINGS, MATEUS** ; **BOEIRA SALOMON, TIAGO** ; **BENFATO, Mara da Silveira** ; **LEIPNITZ, GUILHIAN** ; **MATTÉ, CRISTIANE** . Antioxidant supplementation during pregnancy enhances mitochondrial function and alters redox status on offspring's cerebellum. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE* **JCR**, v. 108, p. S27, 2017.

4. STONE, VINÍCIUS ; AUGUST, PAULINE M. ; STOCHER, DANIELA P. ; KLEIN, CAROLINE P. ; COUTO, PABLO R. G. ; SILVA, YASMINI D. ; SAGINI, JOÃO P. ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BENFATO, M. S. ; MATTÉ, CRISTIANE . Food restriction during pregnancy alters brain's antioxidant network in dams and their offspring. *Free Radical Research JCR*, v. 50, p. 1-33, 2016.
5. VERONA, CLÉBER ; Hackenhaar, Fernanda S. ; TEIXEIRA, CASSIANO ; Medeiros, Tássia M. ; ALABARSE, PAULO V. ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; SHÜLLER, ÁRTUR K. ; MACCARI, JUÇARA G. ; CONDESSA, ROBLEDO LEAL ; OLIVEIRA, ROSELAINÉ P. ; RIOS VIEIRA, SILVIA R. ; BENFATO, M. S. . Blood markers of oxidative stress predict weaning failure from mechanical ventilation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine (Print) JCR*, v. 19, p. 1253-1261, 2015.
6. MAHL, CAMILA DONATO ; BEHLING, CAMILE SAUL ; Hackenhaar, Fernanda S. ; DE CARVALHO SILVA, MÉLANY NATUANE ; PUTTI, JORDANA ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALVES, SYDNEY HARTZ ; FUENTEFRIA, ALEXANDRE ; BENFATO, M. S. . Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease JCR*, v. 82, p. 203-208, 2015.
7. BEHLING, CAMILE S. ; ANDRADE, ALEXEY S. ; PUTTI, JORDANA S. ; MAHL, CAMILA D. ; Hackenhaar, Fernanda S. ; DA SILVA, ANA CAROLINA A. ; E SILVA, MÉLANY NATUANE C. ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; DOS SANTOS, CARLA E. I. ; DIAS, JOHNNY F. ; BENFATO, M. S. . Treatment of oxidative stress in brain of ovariectomized rats with omega-3 and lipoic acid. *Molecular Nutrition & Food Research (Print) JCR*, v. 59, p. n/a-n/a, 2015.
8. ANDRADE, ALEXEY S. ; **SALOMON, Tiago B.** ; BEHLING, CAMILE S. ; MAHL, CAMILA D. ; Hackenhaar, Fernanda S. ; PUTTI, JORDANA ; Benfato, Mara S. . Alpha-lipoic acid restores tear production in an animal model of dry eye. *Experimental Eye Research JCR*, v. 120, p. 1-9, 2014.
9. Abegg, Maxwel A. ; Mendes, Marcus F. A. ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; MEDEIROS, T. M. ; Schüller, Ártur Krumberg ; ALABARSE, P. V. G. ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BENFATO, Mara da Silveira . In vitro response of clinical isolates of *Candida* species to oxidative stress. *Revista Brasileira de Biociências (Online)*, v. 12, p. 1-8, 2014.
10. SILVA, ANA CAROLINA A. ; **SALOMON, Tiago B.** ; BEHLING, CAMILE SAUL ; PUTTI, JORDANA ; Hackenhaar, Fernanda S. ; ALABARSE, PAULO V. G. ; Schüller, Artur K. ; Benfato, Mara S. . Oxidative stress in the kidney of

reproductive female rats during aging. *Biogerontology* (Dordrecht) **JCR**, v. 14, p. 411-422, 2013.

11. **Salomon, Tiago Boeira**; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; ALMEIDA, ANA CAROLINA ; SCHÜLLER, ARTHUR KRUMBERG ; GIL ALABARSE, PAULO V. ; EHRENBRINK, Guilherme ; BENFATO, Mara Silveira . Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity. *Experimental Gerontology* **JCR**, v. 48, p. 940-946, 2013.
12. Alabarse, Paulo Vinicius Gil ; Hackenhaar, Fernanda Schäfer ; Medeiros, Tássia Machado ; Mendes, Marcus Fabiano Almeida ; Viacava, Paula Ramos ; Schüller, Ártur Krumberg ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; EHRENBRINK, Guilherme ; BENFATO, M. S. ; Benfato, Mara Silveira . Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. *Experimental Gerontology* **JCR**, v. 46, p. 241-248, 2011.
13. Alabarse, Paulo V.G. ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; Medeiros, Tássia M. ; Hackenhaar, Fernanda S. ; Schüller, Artur K. ; EHRENBRINK, Guilherme ; BENFATO, M. S. ; Benfato, Mara S. . Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. *Experimental Gerontology* **JCR**, p. 773-780, 2011.
14. Abegg, Maxwel Adriano ; ALABARSE, P. V. G. ; Alabarse, Paulo Vinicius Gil ; Casanova, Anderson ; Hoscheid, Jaqueline ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; Hackenhaar, Fernanda Schäfer ; Medeiros, Tássia Machado ; Benfato, Mara Silveira . Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic Yeast Species of the Genus *Candida*. *Mycopathologia* (1975. Print) **JCR**, v. 170, p. 11-20, 2010.
15. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; Alabarse, Paulo V. Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; BENFATO, Mara Silveira . Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochemistry and Function* **JCR**, v. 27, p. 378-382, 2009.
16. EHRENBRINK, Guilherme ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; PETRUCCI, Antonella Pilla ; SANDRI, Marcia Rodrigues ; BENFATO, Mara Silveira . Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. *Experimental Gerontology* **JCR**, Oxford, v. 41, n.4, p. 368-371, 2006.

Capítulos de livros publicados

1. Benfato, Mara Silveira ; Medeiros, Tássia Machado ; **Salomon, Tiago B.** . Coronary Artery Disease and Oxidative Stress. In: Illya Chaikovsky; Nataliia N. Sydorova. (Org.). *Coronary Artery Disease*. 1ed.: , 2012, v. , p. 2-24.

Resumos publicados em anais de congressos

1. Alabarse, Paulo V. Gil ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; Medeiros, Tássia Machado ; MENDES, M. ; SCHULLER, A. K. ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; EHRENBRINK, Guilherme ; BENFATO, Mara Silveira . Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. In: Annual Meetings of Society for Free Radical Research & The European Environmental Mutagen Society, 2010, Oslo. Programme & Abstracts. Oslo, 2010. p. 219-219.
2. **SALOMON, Tiago Boeira**; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BENFATO, Mara Silveira . Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GPx) activities in naïve and experienced male rats gonads. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 129-129.
3. ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; BENFATO, Mara Silveira . BRAIN AND AGEING: OXIDATIVE STRESS PROFILE IN REPRODUCTIVE MALE RATS. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 122-122.
4. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BENFATO, Mara Silveira . ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITIES IN KIDNEY OF NAÏVE AND EXPERIENCED MALE RATS. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 122-122.
5. Medeiros, T.M. ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; BENFATO, Mara Silveira . PULMONAR ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY AND PROTEIN DAMAGE IN FEMALE RATS OF 3, 6, 12, AND 20 MONTHS OF AGE. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 130-130.
6. **SALOMON, Tiago Boeira**; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BENFATO, Mara Silveira . Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) activities and the protein carbonylation among naïve and experienced male rat heart. In: V Meeting of

SFRBM- South American Group, 2007, Montevideo. V Meeting of SFRBM-South American Group. Montevideo: Imprensa Gega s. r. l, 2007. p. 120-120.

7. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BENFATO, Mara Silveira . Pulmonary activities of antioxidant enzymes and protein damage in naive and experienced male rats.. In: V Meeting of SFRBM-South American Group, 2007, Montevideo. V Meeting of SFRBM-South American Group. Montevideo: Imprensa Gega s. r. l., 2007. p. 59-59.

8. ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; BENFATO, Mara Silveira . Catalase, Glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities and protein damage in brains of naive and experienced male rats.. In: V Meeting of SFRBM-South American Group, 2007, Montevideo. V Meeting of SFRBM- South American Group. Montevideo: Imprensa Gega s. r. l., 2007. p. 111-111.

9. **SALOMON, Tiago Boeira**; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE CARDÍACAS ENTRE RATOS MACHOS REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006. p. 384-384.

10. BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E CATALASE (CAT) EM GÔNADAS DE RATOS MACHOS REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006. p. 384-385.

11. ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM RATOS MACHOS DE 12 MESES REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006. p. 385-385.

12. ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM RATOS MACHOS DE 12 MESES REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p. 2-2.
13. BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E CATALASE (CAT) EM GÔNADAS DE RATOS MACHOS REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p. 11-11.
14. **SALOMON, Tiago Boeira**; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . Atividade das Enzimas Catalase e Superóxido Dismutase Cardíacas Entre Ratos Machos Reprodutores e Não-Reprodutores. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p. 96-96.
15. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BINS, Sofia Costa ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p. 43-43.
16. BENFATO, Mara Silveira ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil . Aprendizado usando o princípio da redescoberta. In: 2º Salão de Ensino a Distância, 2006, PORTO ALEGRE. ANAIS DO 2º SALÃO DE EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA. PORTO ALEGRE: EDITORA DA UFRGS, 2006.
17. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BINS, Sofia Costa ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE

PULMONARES ENTRE RATOS MACHOS REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006. p. 384-384.

18. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; EHRENBRINK, Guilherme ; SALOMON, Tiago Boeira ; BENFATO, Mara Silveira . Atividade da superóxido dismutase em coração de ratos de ambos os sexos ao longo do envelhecimento. In: XVII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2005, Porto Alegre. Livro de resumos do XVII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2005. p. 368-368.

Produção técnica

Programas de computador sem registro

1. BENFATO, Mara Silveira ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; SALOMON, Tiago Boeira . Controle de pH em Mamíferos. 2008.
2. BENFATO, Mara Silveira ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; SALOMON, Tiago Boeira ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil . Dano oxidativo no DNA. 2007.
3. SALOMON, Tiago Boeira; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; BENFATO, Mara Silveira . Replicação de DNA. 2006.

Eventos

1. XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB. Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GPx) activities in naïve and experienced male rats gonads. 2008. (Congresso).
2. V Meeting of SFRBM-South American Group. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) activities and the protein carbonylation among naïve and experienced male rat heart. 2007. (Congresso).
3. XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. ATIVIDADES DAS ENZIMAS CATALASE (CAT), SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) E A CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO CORAÇÃO DE RATOS MACHOS COM E SEM ATIVIDADE REPRODUTIVA. 2007.