

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

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATAS  
REPRODUTORAS E NÃO REPRODUTORAS AO LONGO DO  
ENVELHECIMENTO**

**Dissertação de Mestrado**

**Fernanda Maciel Heemann**

Porto Alegre  
2015

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

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATAS  
REPRODUTORAS E NÃO REPRODUTORAS AO LONGO DO  
ENVELHECIMENTO**

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

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

Dedico este trabalho à minha família, Fernando, Maristela, Isabella e Gabriel.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1. Estresse Oxidativo .....	10
1.1.1 Aspectos Gerais .....	10
1.1.2 Espécies Reativas e Radicais Livres .....	11
1.1.3 Dano Oxidativo.....	14
1.1.4 Sistema de Defesas Antioxidantes.....	15
1.2 Reprodução .....	20
1.2.1 Reprodução e Estresse Oxidativo .....	21
1.2.2 Ciclo Estral de Ratas.....	22
1.3 Efeitos Protetores do Estrogênio .....	24
1.3.1 Envelhecimento e Estresse Oxidativo .....	26
1.3.2 Cérebro e Envelhecimento.....	30
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>32</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
Artigo científico submetido à revista <i>Biogerontology</i> .....	33
<b>5. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR</b> .....	<b>67</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>77</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>115</b>

## AGRADECIMENTOS

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

Aos colegas de laboratório: Artur Schüller, Diego Canata, Fernanda Hackenhaar, Jordana Putti, Melany Natuane, Tiago Salomon e Vanessa Engers pela amizade, alegria e ajuda nestes dois anos.

Aos professores integrantes da comissão de acompanhamento, Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janette Palma Fett, pelas colocações ao longo do trabalho.

Ao professor Dr. Guido Lenz pelas colocações na correção do artigo científico para submissão.

Ao professor Dr. Diego Bonatto pelas colaboração como relator da dissertação de mestrado.

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

Ao meu namorado Gabriel por todo o amor e paciência, além de estar sempre ao meu lado, incentivando e apoiando.

Aos meus pais, Maristela e Fernando, e minha irmã Isabella, pelos valores ensinados, pelo apoio, amor e suporte incondicionais em toda minha vida.

## RESUMO

A reprodução é uma fase crítica e exigente na vida dos animais. Nos mamíferos, as fêmeas costumam investir muito mais no cuidado parental do que os machos e a lactação é o período mais exigente em termos energéticos da vida da fêmea. Aqui, testamos se o estresse oxidativo é uma consequência da reprodução em ratas Wistar. Foram avaliadas as atividades da glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superóxido dismutase, o consumo de peróxido de hidrogênio, carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica, níveis de nitrito e nitrato, glutathione total, níveis de vitamina C, bem como os níveis de estradiol no tecido cerebral em 3, 6, 12, e 24 meses de idade. Os animais foram agrupados de acordo com a experiência reprodutiva: reprodutores ou não reprodutores. A maioria dos parâmetros estudados mostrou uma diferença entre animais não reprodutores e reprodutores de 12 e 24 meses. Aos 24 meses de idade animais reprodutores apresentaram maior atividade de superóxido dismutase, consumo de peróxido de hidrogênio, glutathione peroxidase e carbonilação de proteínas do que os animais não reprodutores. Aos 6 meses de idade, durante o período que representaria o pico da atividade reprodutiva, animais não reprodutores apresentaram níveis mais altos de malondialdeído. Em animais não reprodutores aos 12 meses de idade observou-se níveis mais altos de estrogênio, vitamina C, consumo de peróxido de hidrogênio e atividades de superóxido dismutase e glutathione peroxidase em relação aos animais reprodutores. Demonstramos que o processo de envelhecimento induz a uma elevação no dano oxidativo e também nas defesas antioxidantes em cérebro de ratas reprodutoras, sendo de alguma forma, a reprodução um processo custoso. Este estudo mostra que existe um forte potencial para a investigação do custo reprodutivo e estresse oxidativo.

Palavras-chave: Custo da reprodução, estresse oxidativo, envelhecimento, enzimas antioxidantes, cérebro.

## ABSTRACT

Reproduction is a critical and demanding phase of the animals' life. In mammals, females usually invest much more in parental care than males and lactation is the most energetically demanding period of a female's life. In this work, we tested whether oxidative stress is a consequence of reproduction in female Wistar rats. We evaluated the activities of glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, consumption of hydrogen peroxide, protein carbonylation, lipid peroxidation, nitrite and nitrate levels, total glutathione, vitamin C levels, as well as sex hormone levels in brain tissue at 3, 6, 12, and 24 months of age. Animals were grouped according to reproductive experience: breeders or non-breeders. The parameters studied showed a difference between non-breeders and breeders animals at 12 and 24 months. At 24 months of age breeders animals showed higher superoxide dismutase activity, consumption of hydrogen peroxide, glutathione peroxidase and carbonyl level than non-breeders animals. At 6 months of age, during the period that represents peak reproductive activity, non-breeders animals showed higher levels of malondialdehyde. In non-breeders animals at 12 months of age we observed a higher level of estrogen, vitamin C, consumption of hydrogen peroxide, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities than breeders animals. Finally, we demonstrated that the aging process causes higher oxidative damage and higher antioxidant defenses in brain of breeders female rats, being the reproduction process costly somehow. This study shows that there is strong potential for research linking the cost of reproduction and oxidative stress.

**Keywords:** Cost of reproduction, oxidative stress, aging, antioxidant enzymes, brain.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**8OHdG** – 8-oxo-7,8-disidro-2'-desoxiguanosina

**BSA** – Albumina sérica bovina

**CAT** – Catalase

**DNPH** – Dinitrofenilhidrazina

**ER** – Espécie reativa

**ERB** – Espécie reativa de bromo

**ERC** – Espécie reativa de cloro

**ERE** – Espécie reativa de enxofre

**ERN** – Espécies reativas de nitrogênio

**ERO** – Espécies reativas de oxigênio

**FSH** – Hormônio folículo estimulante

**GPx** – Se-glutationa peroxidase

**GR** – Glutationa redutase

**GSH** – Glutationa

**tGSH** – Glutationa total

**GST** – Glutationa S-transferase

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

**LH** – Hormônio luteinizante

**MAP-cinase** – Proteína-cinases ativadas por mitógenos

**MDA** – Malondialdeído

**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

**NF-kB** – Fator nuclear kappa B

**NOs** – Óxido nítrico sintase

**PI3K**- Fosfatidilinositol 3 quinase

**Prxs** – Peroxirredoxinas

**RE** – Receptor de estrogênio

**RE- $\alpha$**  – Receptor de estrogênio alfa

**RE- $\beta$**  – Receptor de estrogênio beta

**SIRT1** – Sirtuína 1

**SOD** - Superóxido dismutase



**SVCT**- Transportador de vitamina C sódio-dependente

**VIT. C** – Ácido ascórbico/vitamina C

**XO** - Xantina oxidase

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Estresse Oxidativo

### 1.1.1 Aspectos Gerais

As moléculas de oxigênio diatômico ( $O_2$ ) na atmosfera terrestre são as maiores promotoras de reações bioquímicas nas células vivas. Exceto aqueles organismos que são especialmente adaptados para viver sob condições anaeróbicas, todos os animais e plantas requerem oxigênio para uma eficiente produção de energia química. O surgimento do oxigênio deve ter sido acompanhado pelo aparecimento da camada de ozônio ( $O_3$ ) na alta atmosfera, e a absorção dos efeitos danosos da radiação ultravioleta pela camada de ozônio provavelmente permitiu a evolução dos mais complexos organismos terrestres (Halliwell e Gutteridge, 2007). A molécula de oxigênio, além de atuar como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (Voet, 2001), pode ainda originar espécies químicas capazes de reagir com as demais biomoléculas, principalmente proteínas e fosfolipídios, inativando-as e, assim, prejudicando o metabolismo intracelular. Essas substâncias originadas a partir do oxigênio são chamadas de radicais livres (Cooper *et al.*, 2002).

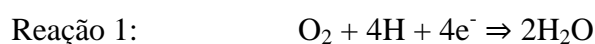
Os radicais livres foram descritos pela primeira vez por Moses Gomberg mais de um século atrás (Gomberg, 1900). Por um longo tempo eles não foram considerados presentes em sistemas biológicos devido a sua alta reatividade e tempo de vida curto. Em 1950, os radicais livres foram então encontrados em sistemas biológicos e imediatamente associados a diversos processos patológicos (Gerschman *et al.*, 1954) e no envelhecimento (Harman, 1956). Em 1969, McCord e Fridovich descreveram pela primeira vez uma enzima capaz de catalisar a dismutação de um radical (McCord e Fridovich, 1969). A existência de uma enzima cujo substrato é o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) levou a uma mudança de paradigmas, desta forma inúmeros estudos começaram a identificar estas

espécies em diversos processos biológicos. Culminando assim com o conhecimento que temos atualmente, onde radicais e outras espécies reativas são moléculas ubíquas em diversos processos fisiológicos e patológicos. Atualmente muito se sabe a respeito da química destes oxidantes e como estes reagem com biomoléculas (Winterbourn, 2008; Murphy *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Espécies Reativas e Radicais Livres

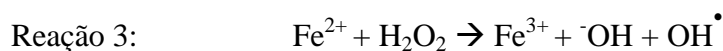
Espécies reativas (ERs) são moléculas ou elementos químicos altamente reativos com capacidade de interagir com outros elementos, alterando sua estrutura e carga. Os radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies reativas geradas em sistemas vivos, embora também existam espécies reativas de nitrogênio (ERNs), cloro (ERC), bromo (ERB) e enxofre (ERE) com grande importância biológica, podendo ser classificados como radicalares e não radicalares. A espécie reativa radicalar, ou radical livre, é qualquer espécie química (átomo, íon ou molécula) que possui um ou mais elétrons desemparelhados, enquanto as espécies reativas não radicalares não apresentam o elétron desemparelhado (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Normalmente, em torno de 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando-se água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do oxigênio pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo simultaneamente 4 elétrons para o oxigênio, que se reduz diretamente à água (reação 1):



O restante do oxigênio é reduzido univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não parelho, produzindo intermediários altamente reativos, as espécies reativas de oxigênio (EROs). EROs mais importantes biologicamente são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), peroxil ( $ROO^{\bullet}$ ), alcóxil ( $RO^{\bullet}$ ) e hidroperóxil ( $HO_2^{\bullet}$ ) (Rizzo *et al.*, 2012).

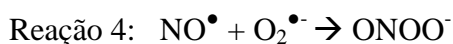
O  $O_2^{\bullet-}$  é o primeiro intermediário da reação de redução do oxigênio à água, e a partir dele serão formadas as outras ERO. Uma pequena quantidade de  $O_2^{\bullet-}$  também é produzido por atividades enzimáticas incluindo a enzima óxido nítrico sintase (NOs), xantina oxidase (XO), NADPH-oxidase, desidrogenases e peroxidases (Chance *et al.*, 1979; Rhee, 2006; Bao *et al.*, 2009; Finkel, 2011). O ânion radical superóxido é um radical que possui baixa reatividade com a maioria das moléculas biológicas, mas apresenta uma reatividade maior com grupamentos tiol e com metais, como cobre, manganês e ferro (Abreu e Cabelli, 2010). A dismutação do superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD) leva a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (reação 2), espécie reativa com alta capacidade de se difundir pelos tecidos, que reage com metais, principalmente ferro, na chamada reação de Fenton (reação 3):



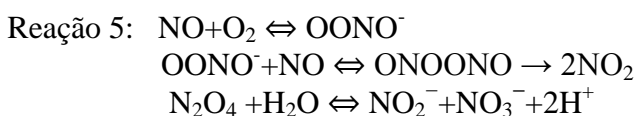
O  $H_2O_2$  reage com ferro e há a abstração de um elétron deste, decompondo o  $H_2O_2$  em ânion hidroxila ( $OH^-$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). O  $OH^{\bullet}$  é o radical mais reativo em sistemas biológicos devido a sua facilidade em ligar-se a metais, outros radicais ou

qualquer molécula biológica. A formação de radicais livres pela Reação de Fenton pode ocorrer principalmente com ferro e cobre, mas também ocorre com níquel, cromo e cádmio (Musci *et al.*, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) é uma espécie reativa de nitrogênio e atua como uma importante molécula sinalizadora em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso e regulação imunológica (Valko *et al.*, 2006). Esta espécie é formada pela ação da enzima NOS a qual converte L-arginina em NO<sup>•</sup> e L-citrulina. O NO<sup>•</sup> pode reagir com o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (reação 4) produzindo o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), principal espécie reativa de nitrogênio que causa danos oxidativos aos organismos vivos. (Halliwell e Gutteridge, 2007).



De um ponto de vista biológico, as reações importantes do óxido nítrico são aquelas que ocorrem com oxigênio, nas suas várias formas redox e com íons de metais de transição. A reação do NO com o oxigênio tanto na forma de gás ou aquosa é um processo complexo. O gás de óxido nítrico reage com o oxigênio para formar dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), que dimeriza para tetróxido de nitrogênio N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> dismuta espontaneamente em água e em tampão com pH 7,4 para se obter o produto final estável de nitrito (NO<sub>2</sub>) e nitrato (NO<sub>3</sub>) (reação 5) (Moncada *et al.*, 1991; Lewis e Deen, 1994).



### 1.1.3 Dano oxidativo

Os efeitos benéficos das espécies reativas ocorrem em concentrações baixas/moderadas e envolvem diversos processos biológicos como fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intra e intercelular (Valko *et al.*, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007). Um estado de estresse oxidativo pode surgir se a produção de EROs/ERNs superar as defesas antioxidantes ou mecanismos de reparo do organismo, resultando em aumento dos níveis de dano oxidativo e perda da função e homeostase redox celular. O dano oxidativo pode ser definido como qualquer modificação molecular, reversível ou não, com efeito deletério, causado por espécies reativas a moléculas biológicas, como proteínas, lipídeos e DNA. Há conhecidos marcadores de dano oxidativo que auxiliam no estudo do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Os aminoácidos que compõem as proteínas são susceptíveis a reações com EROs. A oxidação de um ou mais aminoácidos pode romper as estruturas secundária e terciária de proteínas, aumentando sua hidrofobicidade por exposição dos aminoácidos do seu interior. O radical hidroxila é particularmente proteotóxico, pois pode reagir com o carbono alfa de qualquer aminoácido (Ryter *et al.*, 1990). A carbonilação é um dano comum que ocorre em alguns resíduos de aminoácidos de proteínas como a L-arginina, L-lisina, L-prolina, e L-treonina. Grupos carbonila (aldeídos e cetonas) são produzidos nas cadeias laterais de proteínas quando estas são oxidadas (Dalle-Donne, Giustarini, *et al.*, 2003).

Os ácidos graxos poli-insaturados, constituintes das membranas biológicas são também um alvo importante para o ataque de EROs. A oxidação desses lipídeos é conhecida como peroxidação lipídica; um processo degradativo que leva a alterações estruturais e funcionais das membranas celulares e intracelulares, prejudicando seu metabolismo, podendo inclusive induzir a morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007). O

marcador mais utilizado para investigar o dano oxidativo em lipídeos é o malondialdeído (MDA), o mais estudado produto da peroxidação lipídica, que reage com proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos causando modificações estruturais nestes (Pandey e Rizvi, 2010). O MDA é mutagênico nas células bacterianas e de mamíferos e carcinogênico em ratos (Valko *et al.*, 2007).

A interação de espécies reativas com o DNA pode gerar uma enorme variedade de danos, tais como bases oxidadas, sítios abásicos, danos ao esqueleto de carbono, quebras de fitas simples ou duplas, e aductos DNA-proteínas (Kobayashi *et al.*, 2008). A guanina é a base mais vulnerável à oxidação devido ao seu baixo potencial redox, e a 8-oxoguanina (8-oxoG) é a lesão mais abundante. Modificação permanente de material genético resultante destes incidentes "danos oxidativos" representa o primeiro passo envolvido na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (Neeley e Essigmann, 2006).

Nitração e nitrosilação são reações relacionadas com espécies reativas de nitrogênio. A nitração acontece quando um grupamento nitro (NO<sub>2</sub>) reage irreversivelmente com alguma molécula. Já a nitrosilação, quando um grupamento NO (nitroso) reage de forma reversível com grupamentos tiol ou metais (Halliwell e Gutteridge, 2007).

#### **1.1.4 Sistema de defesas antioxidantes**

Espécies reativas são formadas constantemente em sistemas biológicos e, para isso, os organismos desenvolveram um sistema de defesas antioxidantes de forma a proteger-se dos possíveis danos causados por essas espécies. Halliwell e Gutteridge, 2007, definem antioxidante como: “qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo”. Os sistemas antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos

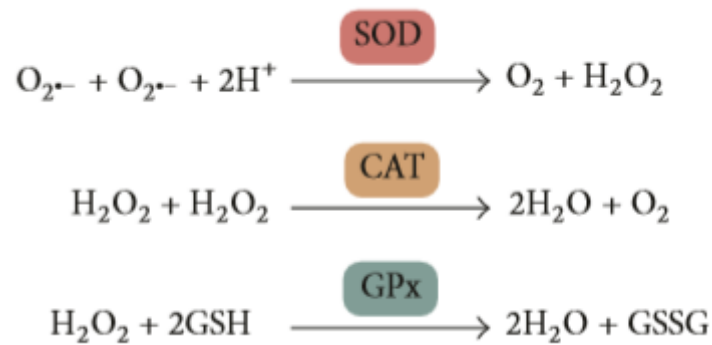
(Haliwell e Gutteridge, 2007). A tabela 1 apresenta de forma resumida as principais defesas antioxidantes aqui apresentadas.

**Tabela 1:** Defesas antioxidantes Enzimáticas e Não Enzimáticas e suas principais ações.

Antioxidante	Ação	
<b>Enzimáticos</b>	<b>SOD</b>	Catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a $H_2O_2$ e $O_2$
	<b>CAT</b>	Catalisa a decomposição do $H_2O_2$ a água e $O_2$
	<b>GPx</b>	Capaz de remover o $H_2O_2$ e outros peróxidos através do acoplamento da redução do peróxido a $H_2O$ à oxidação da glutathiona reduzida (GSH)
	<b>GST</b>	Envolvida no metabolismo de xenobióticos e peróxidos orgânicos, exceto $H_2O_2$
<b>Não Enzimáticos</b>	<b>Glutathiona</b>	Sequestrador de radicais livres em condições fisiológicas além de participar na regeneração dos antioxidantes ácido ascórbico e tocoferol
	<b>Vitamina C</b>	Habilidade para agir como agente redutor; cofator de várias enzimas

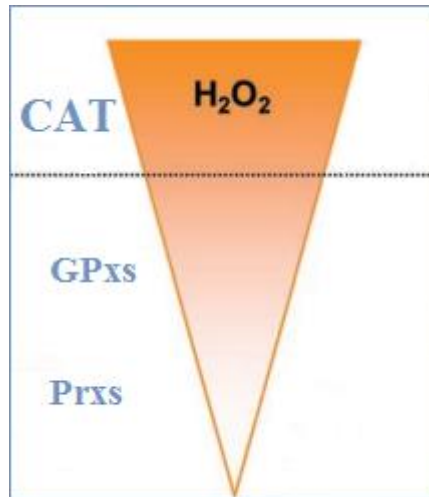
O sistema antioxidante enzimático mais estudado é composto pelas seguintes enzimas: SOD, que catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$ , catalase (CAT), que catalisa a decomposição do  $H_2O_2$  a água e  $O_2$ , a glutathiona peroxidase (GPx) que atua em peróxidos em geral, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como cofator e formando o dissulfeto glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 1) e a glutathiona S-transferase que possui um importante papel fisiológico na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo herbicidas, pesticidas e xenobióticos (Vasconcelos *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2014). Além destas enzimas, existem famílias de proteínas que exercem importante papel na sinalização redox na célula: as peroxirredoxinas, glutarredoxinas e tiorredoxinas.





**Fig.1:** Principal sistema enzimático de defesa antioxidante *in vivo* e as suas reações na eliminação de radicais livres e de peróxido de hidrogênio.

Em mamíferos existem três diferentes tipos de SOD: a MnSOD – mitocondrial, enzima de estrutura tetramérica que contém um átomo de manganês em seu sítio ativo, a CuZnSOD - citosólica, a qual contém em seu sítio ativo um átomo de cobre e zinco e ainda uma forma extracelular da enzima, conhecida como EC-SOD ou SOD3, a qual também contém um átomo de cobre em seu sítio ativo. Essas três formas da enzima catalisam a dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  celulares são controlados sequencialmente por peroxidases. Peroxirredoxinas (Prxs) e GPxs removem pequenas quantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  enquanto a enzima CAT catalisa montantes mais elevados (Figura 2) (Neumann *et al.*, 2009). CAT esta localizada no interior dos peroxissomos, degradando apenas o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido nesta organela e em algumas condições podendo haver vazamento da enzima para o citosol, provavelmente por lise do peroxissomo, que possui uma membrana frágil. A CAT é uma enzima tetramérica que contém um grupamento  $\text{Fe}_{\text{III}}$ -heme em seu sítio ativo (Haliwell e Gutteridge, 2007).



**Fig.2:** Níveis de  $H_2O_2$  controlado por peroxidases. Adaptado de (Neumann *et al.*, 2009).

Existem pelo menos quatro formas da enzima GPx. Uma é a enzima citosólica, chamada também de GPx1. O plasma de mamíferos contém outra forma, uma glicoproteína chamada de GPx3, que também é encontrada em outros fluidos extracelulares e origina-se principalmente do rim. A GPx3 também pode utilizar, além da glutatona, outro tipo de substrato, a tioredoxina. Existe ainda uma isoforma encontrada no trato gastrointestinal, a GPx2 ou GI-GPx e um quarto tipo, a GPx4 a única que reduz não apenas peróxidos orgânicos sintéticos e  $H_2O_2$ , mas também hidroperóxidos de colesterol e ácidos graxos (Halliwell e Gutteridge, 2007). As GSTs de mamíferos podem ser divididas em três grandes famílias: GST citossólica, GST mitocondrial e GST microsomal. As duas primeiras compreendem enzimas solúveis, enquanto que as do tipo microsomal se encontram associadas à membrana (Sheehan *et al.*, 2001). A enzima GST pode possuir duas principais funções, como enzima detoxificadora de segunda ordem agindo sobre xenobióticos e como enzima GPx degradando peróxidos orgânicos, utilizando GSH. Sua atividade como GPx se diferencia das outras peroxidases por não possuir atividade sobre o  $H_2O_2$  (Matsumoto *et al.*, 2000; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As peroxirredoxinas (Prxs) são peroxidases multifuncionais dependentes de tiol que catalisam a redução de diversos substratos de peróxido como o  $H_2O_2$ , outros hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito (Rhee e Woo, 2011). Mamíferos possuem seis diferentes tipos de peroxirredoxinas: Prxs 1, 2 e 6 localizadas no citosol, Prx3 localizada na matriz mitocondrial, sendo responsável por cerca de 90% da detoxificação do peróxido de hidrogênio neste local, Prx4 no retículo endoplasmático e Prx5 nas mitocôndrias, peroxissomos e no citosol (Peskin *et al.*, 2010). Há indícios de que o papel das Prxs como antioxidante seja mais complexo do que a remoção de hidroperóxidos. Prxs possuem susceptibilidade à inativação por hiperoxidação na presença de peróxido em excesso e possuem a capacidade de formar complexos de estruturas oligoméricas. Estas propriedades, em conjunto com uma elevada abundância celular e reatividade com peróxido de hidrogênio, levaram à especulação de que Prxs teriam uma função como sensores redox, transmitindo sinais como parte da resposta celular ao estresse oxidativo (Poynton e Hampton, 2014).

Dentre as defesas antioxidantes não enzimáticas, a glutathiona (GSH), possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. É um sequestrador de radicais livres em condições fisiológicas além de participar na regeneração dos antioxidantes ácido ascórbico e tocoferol (Monostori *et al.*, 2009). Este tripeptídeo é formado por glicina, cisteína e ácido glutâmico. É encontrado intracelularmente em altas concentrações sendo altamente abundante no citosol (1-11 mmol/L), núcleos (3-15 mmol/L), e mitocôndrias (5-11 mm) onde é o principal antioxidante solúvel nestes compartimentos celulares (Masella *et al.*, 2005; Halliwell e Gutteridge, 2007). Outro antioxidante não enzimático bastante importante é a vitamina C (ácido ascórbico) que é hidrossolúvel e também age contra os radicais livres, tanto nas

mitocôndrias como no citosol. Plantas e animais podem sintetizá-la, com exceção de humanos, outros primatas, morcegos e porquinhos-da-índia, que não conseguem e necessitam obtê-lo na dieta (Halliwell e Gutteridge, 2007). O ácido ascórbico é necessário *in vivo* como cofator de várias enzimas, sendo as mais conhecidas a prolina-hidroxilase e a lisina-hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno. A deficiência do ascorbato na dieta humana causa o escorbuto. A mais impressionante propriedade química do ascorbato é a sua habilidade para agir como agente redutor (doador de elétrons) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

## 1.2 Reprodução

A reprodução é um evento que se tornou natural e comum a diversas espécies, evoluindo em complexidade e se adaptando para garantir maior sucesso na passagem dos genes a gerações seguintes (Miles *et al.*, 2007).

A teoria da história de vida assume que a reprodução e a longevidade são limitados por *trade-offs* que previnem o seu aumento simultâneo. A reprodução é geralmente interpretada como um recurso (energia, nutrientes, tempo) - processo exigente que implica em um custo para o indivíduo em termos de declínio da fecundidade e sobrevivência subsequente (Reznick, 1992; Stearns, 2011). Considera-se que indivíduos de espécies iteróparas enfrentem um conflito de escolha entre investir estes recursos para a sua automanutenção versus a reprodução atual (Alonso-Alvarez e Velando, 2012). Antioxidantes provenientes da dieta (por exemplo, algumas vitaminas e carotenoides) podem adicionalmente atuar como recursos limitantes. Assim um *trade-off* entre investir estes antioxidantes na proteção do organismo versus proteger componentes reprodutivos como gametas e embriões também pode ser sugerido (Blount *et al.*, 2000; Velando *et al.*,

2008; Pike *et al.*, 2010). Estes *trade-offs* citados podem levar a um custo oxidativo na reprodução.

### **1.2.1 Reprodução e Estresse Oxidativo**

A reprodução tem custos significativos para os animais e alterações na estrutura e função celular são susceptíveis de ocorrer como resultado (Pichaud *et al.*, 2013). Em mamíferos, as fêmeas costumam investir muito mais em cuidado parental do que os machos (Clutton-Brock, 1991) e a lactação é o período mais exigente em termos energéticos na vida de uma fêmea. Como consequência, tem sido previsto que o estresse oxidativo pode aumentar durante este período reprodutivo (Speakman, 2008).

A via mais frequentemente sugerida que liga o estresse oxidativo com a reprodução relaciona-se com os altos níveis do metabolismo associados com o investimento reprodutivo (Garratt *et al.*, 2013). Como a maioria das EROs são produzidas a partir do sistema de transporte de elétrons durante a cadeia respiratória, o aumento na taxa metabólica necessária para facilitar o investimento reprodutivo poderia produzir maiores níveis de EROs (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004; Speakman, 2008). Além disso, os investimentos na reprodução podem limitar a disponibilidade dos recursos necessários para a produção ou a manutenção dos mecanismos de defesa que protegem contra o estresse oxidativo (Monaghan *et al.*, 2009).

O dano oxidativo está positivamente associado com o esforço reprodutivo em diversas espécies de fêmeas. No entanto, paradoxalmente, as comparações categóricas de animais reprodutores versus não reprodutores revelam que a transição para o estado reprodutivo está associada com a redução do dano oxidativo em certos tecidos e marcadores. Essa redução poderia funcionar como uma proteção para as mães, gametas e

filhotes em desenvolvimento contra lesões oxidativas que inevitavelmente aumentam com o investimento reprodutivo (Blount *et al.*, 2015).

A reprodução é uma fase exigente na vida dos animais. Em camundongos lactantes (*Mus musculus*), a taxa metabólica pode aumentar para mais de 400% em relação a fêmeas não reprodutoras (Hammond, 1997). A lactação impõe enormes exigências nutricionais sobre as mães: órgãos como o fígado e o trato alimentar crescem, enquanto as reservas armazenadas são catabolizadas (Speakman, 2008), aumentando a produção de espécies reativas e o risco de estresse oxidativo (Schaeff *et al.*, 2012). O estresse oxidativo em fêmeas que amamentam podem ter diversos impactos deletérios sobre a prole, por exemplo, reduzindo a produção de leite (Suriyasathaporn *et al.*, 2009; Chandra *et al.*, 2013), e danificando a qualidade do colostro e do leite em termos de conteúdo antioxidante (Rizzo *et al.*, 2013).

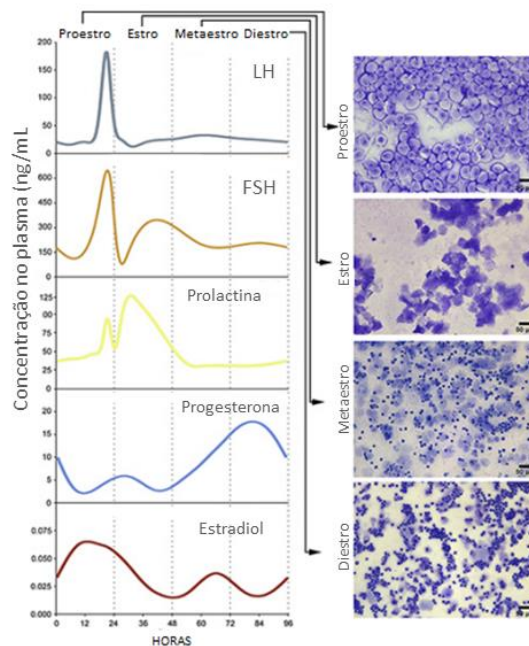
Na reprodução, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios tanto ao sistema reprodutor feminino como ao masculino. No que diz respeito às fêmeas, os problemas podem ocorrer desde o processo de maturação do oócito até à gestação, e nos machos os distúrbios podem ocorrer durante as várias etapas da espermatogênese. O estresse oxidativo também pode ocasionar lesões ao DNA das células da linha germinativa de ambos os sexos, e se tal processo não for contido, os descendentes do indivíduo em questão poderão apresentar defeitos de diversas ordens (Thomas *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2005).

### **1.2.1 Ciclo estral de ratas**

O ciclo reprodutivo em ratas é chamado de ciclo estral. Em razão da curta duração de seu ciclo estral, ratas constituem bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem

durante o ciclo reprodutivo. Esse ciclo tem uma duração de 4 a 5 dias, se repete durante o ano inteiro e é composto por quatro fases: diestro (55 a 57 h), proestro (12 a 14h), estro (25 a 27h) e metaestro (6 a 8h). Cada uma das fases do ciclo caracteriza-se por expressar mudanças no útero e cérvix uterino, detectadas por características do epitélio vaginal, como a presença predominante de leucócitos (diestro), de células epiteliais nucleadas (proestro), de células epiteliais cornificadas (estro) ou de uma mistura homogênea de todos os tipos já citados (metaestro). As fases mudam conforme as variações nas concentrações de gonadotrofinas e, conseqüentemente, de esteroides gonadais (Smith *et al.*, 1975; Marcondes *et al.*, 2002).

Durante o ciclo, a prolactina, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) permanecem baixos aumentando na fase de proestro. Os níveis de estradiol começam a aumentar no metaestro, alcançando níveis extremos durante o proestro e retornando à linha de base no estro. A secreção de progesterona aumenta também durante o metaestro e diestro com uma diminuição mais tardia (Spornitz *et al.*, 1999). A figura 3 ilustra as alterações hormonais observadas durante o ciclo estral de ratas.



**Fig.3:** Níveis hormonais nas diferentes fases do ciclo estral regular de 4-5 dias em roedores. Adaptado e traduzido de (McClean *et al.*, 2012).

Como acontece com os seres humanos, ratas passam por um processo de senescência reprodutiva (estropausa) que é caracterizada pela perda de ciclicidade hormonal gonadal. A estropausa no rato começa em torno de 9 - 12 meses de idade, altura em que o ciclo se torna irregular e tanto pode continuar ao longo deste curso ou pode parar completamente (Ehrenbrink *et al.*, 2006). O ciclo estral de ratas compõe um meio natural e competitivo para estudar as variações dos hormônios esteroides e suas ações fisiológicas.

### 1.2.2 Efeitos Protetores do Estrogênio

Os estrogênios são hormônios esteroides que existem em três principais formas: estrona, estradiol e estriol. Por causa das suas respectivas posições na sequência de biossíntese, a estrona é citada como E1, o estradiol como E2 e o estriol como E3 (Guyton e



Hall, 2011). Os efeitos benéficos dos estrogênios têm sido amplamente documentados e os benefícios fisiológicos atribuídos às respostas desencadeadas pelos estrogênios são provenientes, na sua grande maioria, do 17 $\beta$ -estradiol (E2). E2 é comumente reconhecido por desempenhar um papel fundamental na fisiologia reprodutiva feminina. No entanto, também está envolvido no metabolismo ósseo e lipídico, na manutenção dos sistemas cardiovasculares e neuronais e no desenvolvimento da fisiologia reprodutiva masculina (Kumar *et al.*, 2011). Em geral, o estradiol possui um efeito profundo sobre o sistema nervoso, influenciando a diferenciação sexual do cérebro (Gorosito *et al.*, 2008; Schaub *et al.*, 2008; Mouriec *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009) e o controle central do comportamento reprodutivo (Pfaff *et al.*, 2000) em nível do hipotálamo, a área mais sensível do cérebro envolvida no dimorfismo sexual.

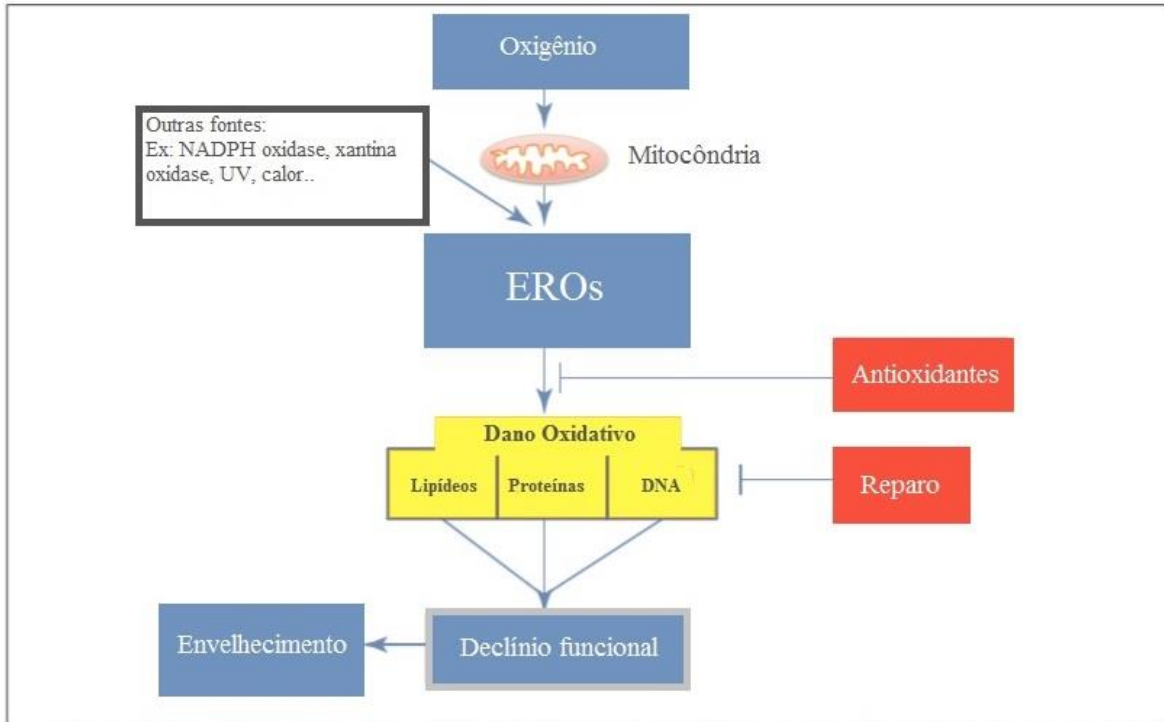
A ação de E2 é mediada principalmente por receptores nucleares de estrogênio (REs) chamados de receptor de estrogênio alfa (RE- $\alpha$ ) e receptor de estrogênio beta (RE- $\beta$ ) (Mermelstein e Micevych, 2008). Tal como os outros receptores de hormônios esteroides, REs regulam a ativação transcricional, ligando como dímeros a sequências específicas de DNA chamadas elementos responsivos ao estrogênio (ERE) (Sharma e Thakur, 2006). Após a ligação do estradiol, os REs ativados induzem a expressão dos genes e modulam o desenvolvimento de uma variedade de alvos dentro do cérebro. Além dos seus efeitos nucleares, existem ações deslocadas do núcleo (citoplasmáticas e na membrana celular), bem como ações diretas e indiretas independente de receptor ou do próprio receptor não ligado ao hormônio (Pellegrini *et al.*, 2014).

Estudos em ratas mostraram que a ovariectomia conduz a um aumento de danos oxidativos, enquanto que a administração de estrogênio aumenta os níveis de GSH e a atividade de GPx resultando em uma diminuição da peroxidação lipídica em vários tecidos

(Persky *et al.*, 2000; Borras *et al.*, 2003; Kireev *et al.*, 2007; Aksakal *et al.*, 2011). Embora a estrutura química do estrogênio favoreça sua ação antioxidante *in vitro* os efeitos benéficos *in vivo* do mesmo acontecem devido à indução da expressão de genes de enzimas antioxidantes, como SOD e GPx, através da ligação do estrógeno ao seu receptor por cascatas de sinalização que envolvem MAP-quinasas e o NF-kB (Vina *et al.*, 2005; Vina, Sastre, *et al.*, 2006b). Além disso, os estrógenos reduzem a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial, além de aumentar a expressão de diversas proteínas da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, como o citocromo c e as subunidades do complexo IV (Stirone *et al.*, 2005).

### **1.3 Envelhecimento e Estresse Oxidativo**

Espécies reativas, estresse oxidativo e dano oxidativo estão cada vez mais assumindo um papel importante na ciência biomédica como fatores deletérios em diversas patologias e no envelhecimento (Figura 4) (Murphy *et al.*, 2011). O envelhecimento pode ser definido como um declínio funcional gradual e deterioração da função fisiológica ao longo do tempo, incluindo uma menor taxa metabólica, declínio no desempenho do exercício, uma série de alterações endócrinas, e uma diminuição no desempenho da tarefa cognitiva e memória (Who, 2011). Este processo varia muito entre as espécies, mas também entre os indivíduos de uma mesma espécie, pela influência de fatores genéticos, ambientais e estocásticos (Kirkwood *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2014).



**Fig.4:** Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas principalmente dentro da mitocôndria durante a fosforilação oxidativa, embora elas também sejam produzidas por fatores endógenos e exógenos adicionais. EROs são subsequentemente neutralizadas por uma rede de antioxidantes endógenos e exógenos, embora algumas EROs sempre escapem deste sistema de proteção. São essas EROs que induzem danos oxidativos para componentes celulares, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Apesar de existirem mecanismos destinados ao reparo, algum dano ainda permanece. É este dano oxidativo que provoca o declínio fisiológico, envelhecimento, e, finalmente, morte. Adaptado e traduzido de (Selman, C. *et al.*, 2012).

O processo de envelhecimento é extremamente complexo e multifatorial e, pela sua natureza multidisciplinar, o estudo desse fenômeno tem gerado um grande número de teorias e uma vasta literatura. Estas teorias examinam o assunto sob a ótica da degeneração da função e estrutura dos sistemas orgânicos e das células, elas tendem a focalizar os problemas que afetam a precisão do sistema orgânico durante o processo de envelhecimento, sejam eles de origem genética, metabólica, celular ou molecular (Weinert e Timiras, 2003). A contribuição das espécies reativas para o envelhecimento foi sugerida pela primeira vez pela Teoria dos Radicais Livres do Envelhecimento (Harman, 1956),

onde o envelhecimento resultaria de um acúmulo de danos causado por espécies reativas associadas a um decréscimo das defesas antioxidantes ao longo do tempo, levando à disfunção celular e aumento da mortalidade. Desde 1956 muitas teorias surgiram a fim de elucidar o processo de envelhecimento, porém, a Teoria dos Radicais Livres ainda é válida podendo ser incluída dentro de outras teorias (Kirkwood e Kowald, 2012). Embora o papel das espécies reativas no envelhecimento seja controverso, é evidente que níveis elevados destas espécies reativas sejam tóxicos (Muller *et al.*, 2007; Van Raamsdonk e Hekimi, 2012).

As fêmeas vivem mais do que os machos em muitas espécies de mamíferos, incluindo seres humanos (Borras *et al.*, 2007; Vina *et al.*, 2011) e mostram uma menor incidência de várias doenças neurodegenerativas (Baldereschi *et al.*, 2000). Alguns estudos com aves e mamíferos mostram que fêmeas tendem a ter níveis mais baixos de dano oxidativo e níveis mais altos de antioxidantes (Casagrande *et al.*, 2011; Vina *et al.*, 2011). Fêmeas de ratos parecem ter mitocôndrias altamente diferenciadas, o que significa uma melhor maquinaria mitocondrial, e como resultado, as mitocôndrias mostram uma maior capacidade e eficiência de oxidação de substratos do que a dos machos no fígado (Valle *et al.*, 2007), tecido adiposo (Rodriguez-Cuenca *et al.*, 2002; Justo *et al.*, 2005), tecido cardíaco (Colom *et al.*, 2007) e no cérebro (Guevara *et al.*, 2009), sendo estes resultados associados com uma maior funcionalidade mitocondrial.

Uma série de evidências suporta a hipótese de que o processo de envelhecimento seja regulado por um ‘crosstalk’ contínuo entre as EROs e sirtuína 1 (SIRT1), a SIRT1 mais extensivamente estudada. Sirtuínas são uma família de desacetilases dependentes de NAD<sup>+</sup>, que possuem um importante papel na regulação do metabolismo celular (Michan e

Sinclair, 2007; Morris, 2013). De acordo com a literatura, um dos mecanismos através dos quais a SIRT1 promove a sobrevivência de células sob estresse oxidativo seja por desacetilação de FOXO3a, um fator de transcrição que ativa a expressão de MnSOD (Caito *et al.*, 2010). A superexpressão de SIRT1 em ratos mostrou aumentar a sobrevivência das células após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **1.3.1 Cérebro e envelhecimento**

O cérebro é um órgão altamente diferenciado e possui uma taxa metabólica bastante elevada, pois consome cerca de 20% do oxigênio inspirado em repouso, enquanto representa apenas 0,5-2% do peso corporal. Esta alta demanda metabólica existe porque os neurônios necessitam de grandes quantidades de adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção de gradientes iônicos através da membrana das células e para a neurotransmissão (Shulman *et al.*, 2004).

Muitas mudanças biológicas contribuem para a variabilidade no envelhecimento do cérebro, a literatura indica o estresse oxidativo como um fator importante na deterioração do cérebro entre indivíduos mais velhos (Mariani *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2007). A produção intracelular de espécies reativas é bastante elevada em muitas doenças neurodegenerativas, em conjunto com a inflamação e disfunção mitocondrial (Sayre *et al.*, 2008; Jomova *et al.*, 2010). A elevada suscetibilidade do cérebro ao estresse oxidativo deve-se ao seu alto consumo de oxigênio, grandes quantidades de cadeias lipídicas insaturadas, abundância de íons metálicos e uma relativa escassez de antioxidantes quando comparado a outros órgãos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, o cérebro pode ser considerado como o tecido mais susceptível ao dano oxidativo por radicais livres (Haider *et al.*, 2014).

As disfunções desencadeadas pelo excesso de EROs são encontradas em várias doenças neurodegenerativas (Yague *et al.*, 2008). Na doença de Alzheimer, EROs causam mutações de perda de função no gene da presilina1, uma enzima responsável pela clivagem da proteína precursora amiloide (PPA) em peptídeo  $\beta$ -amilóide, ocasionando acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amilóide, formação de placas senis e déficits de memória em ratos modelos dessa doença (Simpson *et al.*, 2015). Nas doenças de Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) o aumento do estresse oxidativo e dos danos no DNA são responsáveis pela apoptose ou morte celular programada neural (Haroutunian *et al.*, 2008).

A prevalência de doenças neurodegenerativas é maior em mulheres na pós-menopausa do que em mulheres jovens (Rasgon e Jarvik, 2004), sugerindo que o declínio da função ovariana desempenha um papel fundamental nas consequências negativas do envelhecimento sobre a função cerebral (Gonzalez *et al.*, 2007). Estudos experimentais e observações clínicas também têm destacado a importância do estrogênio na preservação da função cognitiva no cérebro de mamíferos (Sherwin, 2003). Os estrogênios também possuem uma influência importante na aprendizagem e memória em ratos (Mcewen, 2002), que têm uma queda acentuada com o envelhecimento, como em seres humanos (Alonso-Alvarez *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2008; Alonso-Alvarez *et al.*, 2010), representando, assim, um modelo adequado para verificar os efeitos estrogênicos sobre o envelhecimento. Uma série de estudos têm relatado o papel neuroprotetor deste hormônio (Alonso *et al.*, 2008; Moran *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014), que, entre outras maneiras, pode ser mediado através da ativação da via de sinalização da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) (Gonzalez *et al.*, 2007).

Acredita-se que o estresse oxidativo é um importante mecanismo ligado a deterioração gradual da função corporal que define o envelhecimento (Halliwell e

Gutteridge, 2007) e, portanto, poderia explicar os custos da reprodução. Resultados de trabalhos realizados pelo nosso laboratório sugerem que a experiência reprodutiva altera o perfil oxidativo em cérebro e testículos de ratos machos (Gil Alabarse *et al.*, 2011; Salomon *et al.*, 2013) e também nos rins de fêmeas durante o envelhecimento (Da Silva *et al.*, 2013). Neste trabalho nós analisamos o perfil oxidativo do cérebro de ratas durante o envelhecimento a fim de elucidar os custos da reprodução neste órgão.

## **2. OBJETIVO**

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

### **2.1 Objetivos específicos**

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

#### **No cérebro:**

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

#### **No soro:**

- ❖ Determinar os níveis hormonais de estradiol.



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

**Artigo científico submetido à revista *Biogerontology*.**

Oxidative stress in the brain of reproductive female rats during aging

**Fernanda Maciel Heemann<sup>a,b</sup>, Ana Carolina A. da Silva<sup>a,b</sup>, Jordana Putti<sup>a,b</sup>, Vanessa K. Engers<sup>a,b</sup>, Fernanda S. Hackenhaar<sup>a,b</sup>, Tiago B. Salomon<sup>a,b</sup>, Mara S. Benfato<sup>a,b</sup>**

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

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

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

## **Abstract**

Reproduction is a critical and demanding phase of the animals' lives. In mammals, females usually invest much more in parental care than males and lactation is the most energetically demanding period of a female's life. Here, we test whether oxidative stress is a consequence of reproduction in female Wistar rats. We evaluated the activities of glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, consumption of hydrogen peroxide, protein carbonylation, lipid peroxidation, nitrite and nitrate levels, glutathione total, vitamin C levels, as well the sex hormone levels in brain tissue at 3, 6, 12, and 24 months of age. Animals were grouped according to reproductive experience: breeders or non-breeders. The most parameters studied showed a difference between non-breeders and breeders at 12 and 24 months. At 24 months of age breeders showed higher activity of superoxide dismutase, consumption of hydrogen peroxide, glutathione peroxidase and carbonyl level than non-breeders. At 6 months of age, during the period that would represent peak reproductive activity, non-breeders showed higher levels of malondialdehyde. In non-breeders at 12 months of age we observed a higher level of estrogen, vitamin C, consumption of hydrogen peroxide, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities than breeders. Here we demonstrated that the aging process causes higher oxidative damage and higher antioxidant defenses in brain of breeders female rats, being the reproduction process costly somehow. This study shows that there is strong potential for research linking the cost of reproduction and oxidative stress.

**Keywords:** Cost of reproduction, oxidative stress, aging, antioxidant enzymes, brain.

## INTRODUCTION

Reproduction has significant costs to animals and changes in cellular structure and function are likely to occur as a result (Pichaud *et al.*, 2013). In mammals, females usually invest much more in parental care than males (Clutton-Brock 1991) and lactation is the most energetically demanding period of a female's life. As a consequence, it has been predicted that oxidative stress could increase during this reproductive period (Speakman, 2008).

The most frequently suggested pathway linking oxidative stress with reproduction relates to the high levels of metabolism associated with reproductive investment (Garratt *et al.*, 2013). The high metabolic effort associated with reproduction increases the production of damaging reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) that escape from metabolic processes (Bergeron *et al.*, 2011a). Although ROS have an important signaling role (Dickinson e Chang, 2011), they can also cause oxidative damage to biomolecules such as lipids, proteins and DNA (Halliwell, 2007).

We currently know very little about how costs of reproduction are actually incurred, since the majority of studies have focused on the ultimate outcomes rather than the proximate mechanisms (Costantini, 2014). It has been suggested that oxidative stress may be one key cellular mechanism underlying the costs of reproduction (Costantini, 2008; Monaghan *et al.*, 2009; Metcalfe e Alonso-Alvarez, 2010). This is because high investment in reproduction would result in faster somatic deterioration and reduced life expectancy since resources allocated to reproduction are no longer available for self-maintenance (Metcalfe e Monaghan, 2013). The few studies in which reproductive effort was manipulated, for example, found that enzymatic and non- enzymatic antioxidant defenses may be altered, possibly sacrificed in favor of investment in reproduction (Alonso-Alvarez

*et al.*, 2004; Wiersma *et al.*, 2004; Losdat *et al.*, 2011) or upregulated in response to an increase in free radical production (Garratt *et al.*, 2013).

In animal societies, the competition for and acquisition of status may be very intense; hence, it may also carry significant fitness costs. In many cooperatively breeding mammals, a single female has a dominant status, and she prevents subordinate females from breeding (Solomon e French, 1997). Upon investigating oxidative stress in various tissues, the aforementioned studies also reveal that in some species reproducing females are experiencing less oxidative damage than those that do not reproduce (Schmidt *et al.*, 2014). Like social bees, ants and termites, there is only one female in a Damaraland mole-rat colony that reproduces, all other female colony members are reproductively suppressed (Bennett *et al.*, 2005; Remolina e Hughes, 2008) and the reproductive female lives longer than her non-reproductive counterparts (Schmidt *et al.*, 2013). The reduction in oxidative damage in breeding females may be attributable to the unusual social structure of this species, as similar relationships have been observed between reproductive and non-reproductive eusocial insects (Schrempf *et al.*, 2011; Aurori *et al.*, 2014).

Aging could be defined as a gradual functional decline and deterioration of physiological function over time, including lower metabolic rate, declines in exercise performance, multiple endocrine changes, and a decrease in cognitive and memory task performance (Who, 2011). Many biological changes contribute to variability in brain aging, the literature indicates an important impact of oxidative stress on brain deterioration among older individuals (Mariani *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2007). The brain is an aerobic organ that has one of the highest oxygen consumption rates on the basis of the weight. Thus, the brain may be considered as the tissue more susceptible to oxidative damage by free radicals (Haider *et al.*, 2014).

Females live longer than males in many mammalian species including humans (Borras *et al.*, 2007; Vina *et al.*, 2011) and show a lower incidence of several neurodegenerative disease (Baldereschi *et al.*, 2000). Some studies on birds or mammals showed that females tend to have lower levels of oxidative damage and higher levels of antioxidants (Casagrande *et al.*, 2011; Vina *et al.*, 2011). Female rats show more highly differentiated mitochondria, meaning a greater mitochondrial machinery, and, as a result, the mitochondria show a higher capacity and efficiency of substrate oxidation than those of males in liver (Valle *et al.*, 2007), brown adipose (Rodriguez-Cuenca *et al.*, 2002; Justo *et al.*, 2005), cardiac (Colom *et al.*, 2007) and brain (Guevara *et al.*, 2009), which has been associated with greater mitochondrial functionality.

The trade-off between reproductive investment and lifespan is the single most important concept in life-history theory. A variety of evidence support the existence of this trade-off, but the physiological costs of reproduction that underlie this relationship remain poorly understood. We have demonstrated previously that reproductive experience alters the oxidative profile in kidneys of females rats during aging (Da Silva *et al.*, 2013). The aim of this study is to examine how reproductive experience alters the oxidative profile in brain of female rats during aging.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

All animal studies were approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. This study employed 80 Wistar female rats (*Rattus norvegicus*) aged three, six, twelve, and twenty-four months. At one month of age, rats were divided into two groups: with (breeders) or without (non-breeders) reproductive activity (n=10 for each age and group). Breeders rats were maintained in a

box with a single male of the same age (1 male and 1 female per box). Non-breeders rats were grouped with other female rats without any contact with males (5 per box). Reproduction was considered to have occurred when the females gave birth to litters. Pups were separated from the couple at 21 days of age, i.e., before the initiation of the pubertal stage, which corresponds to an age of 30–70 days for males and 33–42 days for females (Krinke, 2000). Litter size ranged from 3 to 11 pups, and each couple had 8 to 12 litters. The females had litters until 12 months of age, and one had a litter at 15 months. The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle at a temperature of  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , and animals were provided with standard lab chow and drinking water *ad libitum*. Vaginal smears were performed periodically to monitor the estrous cycle, and all females were sacrificed at the proestrus stage.

### **Brain dissection and processing**

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

Organ processing was made as previously performed by (Hackenhaar *et al.*, 2009). Briefly, brains were processed with manual maceration. The samples were sonicated in 30 mmol/L phosphate buffer (120 mmol/L KCl, 100  $\mu\text{mol/L}$  PMSF, phenylmethanesulfonylfluoride, pH 7.4) and centrifuged for 10 min at 3,500 g. The supernatant was transferred to a fresh tube and a second centrifugation was performed for 10 min at 15,800 g. The supernatant from the second centrifugation was used for all assays.

## **Sample Collection**

Before perfusion, blood was quickly collected by puncturing the left ventricle of the heart. Fresh blood was centrifuged for 4 min at 3,209g, and the serum was separated for subsequent radioimmunoassay.

## **Hormonal level measurements**

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

## **Assays for antioxidant molecules in brain tissue**

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

The assay to measure total GSH (tGSH) was performed by measuring the formation of p-nitrophenol from 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid, DNTB) in the presence of the enzyme GR and NADPH. Briefly, we used 20  $\mu$ L of potassium phosphate 0.1 mol/L to calibration curve and 20  $\mu$ L of tissue extract sample. Added 120  $\mu$ L of DNTB plus GR and after 30 seconds added 60  $\mu$ L of NADPH. Color development was read at 412 nm and the level was expressed as  $\mu$ mol of glutathione/mg of protein.

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

### **Assays for enzyme activities in brain tissue**

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

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

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

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

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



## **Oxidative damage assays in brain tissue**

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

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

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

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

## Statistical analysis

The results were analyzed using SPSS 18.0 statistical software. Because variance was heterogeneous ( $p$  value  $\leq 0.05$ ). Weighted least squares method was used to determine glutathione peroxidase, consumption of hydrogen peroxide, glutathione S -transferase Vitamin C, Carbonyl level, Malondialdehyde level and Nitrite and Nitrate level. Natural Logarithm test was used to determine superoxide dismutase. One way ANOVA test with Bonferroni post hoc test was used to determine differences among groups. Pearson correlation tests were used for correlation analyses. Statistical analysis was accomplished with the support of the Statistical Nucleus of the Federal University of Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS).

## RESULTS

### Body and brain weight and length

As shown in table 1, the body and brain weight and length without tail increased with the age as expected, but did not differ among animals of the same group nor between groups.

**Table 1** Body and brain weight, and length (without tail) of animals aged 3, 6, 12 and 24 months, grouped as non-breeders or breeders

		Age <sup>a</sup>			
		3	6	12	24
Body weight <sup>b</sup>	NB	202 ± 17.1	241.5 ± 21.2	260.6 ± 21.4	305.3 ± 32.0
	B	211.5 ± 9.2	263.2 ± 27.7	265.2 ± 22.4	292.2 ± 24.9
Brain weight <sup>b</sup>	NB	1.8 ± 0.09	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.09	1.9 ± 0.04
	B	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1
Length <sup>c</sup>	NB	18.0 ± 0.7	18.0 ± 1.0	19.0 ± 0.7	20.0 ± 1.6
	B	17.7 ± 0.4	19.2 ± 0.5	20.0 ± 0.6	19.8 ± 1.3

Results are expressed as mean ± SE

NB non-breeders, B breeders

a Age expressed in months.

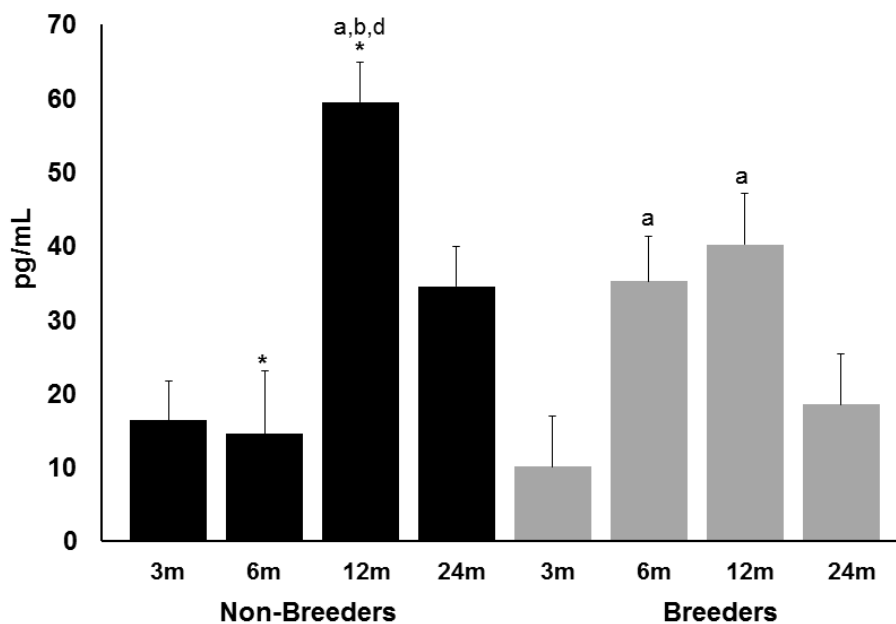
b Brain and body weight expressed in grams.

c Length (without tail) expressed in centimeters.

## Hormonal levels

Estrogen levels were higher in non-breeders at 12 months of age than in breeders of the same age (Fig. 1). Estrogen levels were higher in breeders than non-breeders at 6 months of age. In non-breeders, estrogen levels increased from 6 to 12 months, and decreased from 12 to 24 months of age. Estrogen levels were lower in breeders at 3 months of age than in older animals, but no difference was found in relation to 24-month-old animals.

### Estradiol Levels



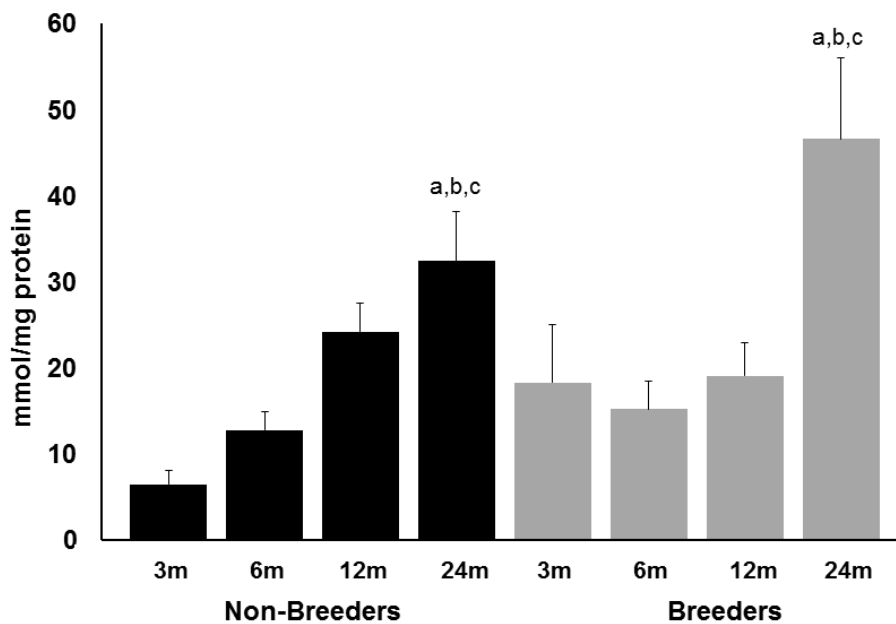
**Fig 1** Hormone levels of estrogen in brain of non-breeders and breeders over aging. Estrogen levels expressed in pg/mL. \* Significant difference between non-breeders and breeders at the same age;  $p \leq 0.05$ . a- significant difference from 3 months; b- significant

difference from 6 months; c- significant difference from 12 months; d- significant difference from 24 months.  $p \leq 0.05$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SE.

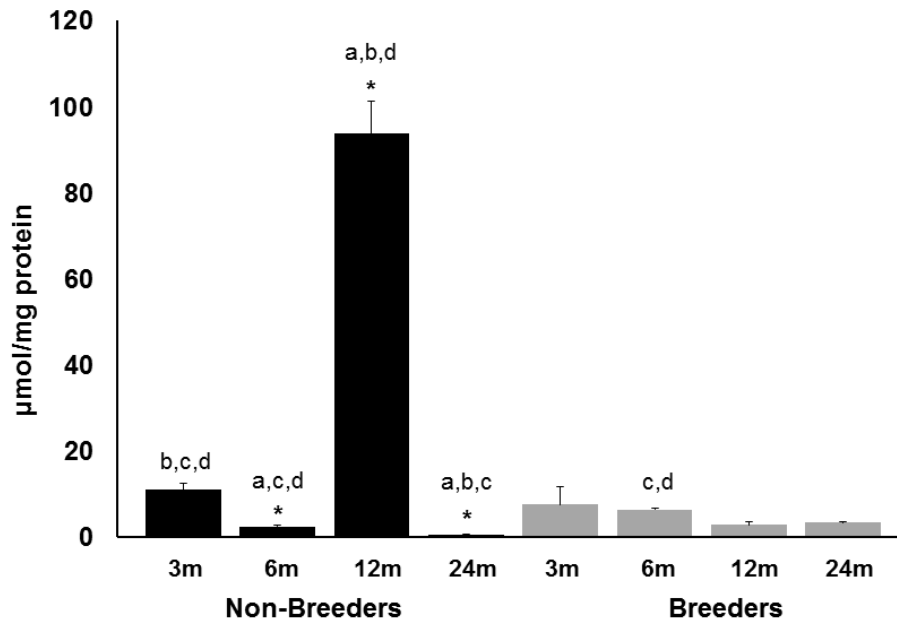
### Antioxidant defenses

With respect to non-enzymatic defenses, no difference was found during aging for tGSH levels among non-breeders and breeders (Fig. 2A). Levels of tGSH in non-breeders and breeders were higher at 24 months of age in comparison to other ages. In non-breeders, Vitamin C levels was higher at 12 months of age than in breeders at the same age; however, breeders at 6 and 24 months showed a higher levels of Vitamin C when compared with non-breeders at the same age( Fig. 2B). Vitamin C content was lower in breeders at 12 and 24 months of age when compared at 6 months of age at the same group. In non-breeders, all ages differ from one another.

#### A- Total Glutathione



B- Vitamin C levels

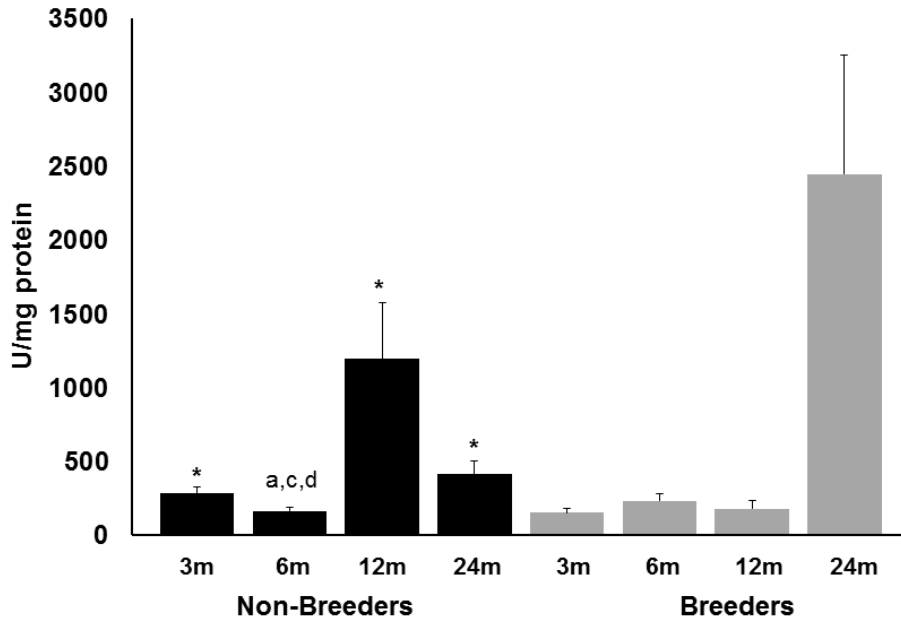


**Fig. 2:** Total Glutathione levels (A) and Vitamin C levels (B) in brain of females rats. Total Glutathione expressed in mmol/mg of protein. Vitamin C expressed in  $\mu\text{mol/mg}$  of protein. \* Significant difference between non-breeders and breeders at the same age;  $p \leq 0.05$ . a- significant difference from 3 months; b- significant difference from 6 months; c- significant difference from 12 months; d- significant difference from 24 months.  $p \leq 0.05$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SE.

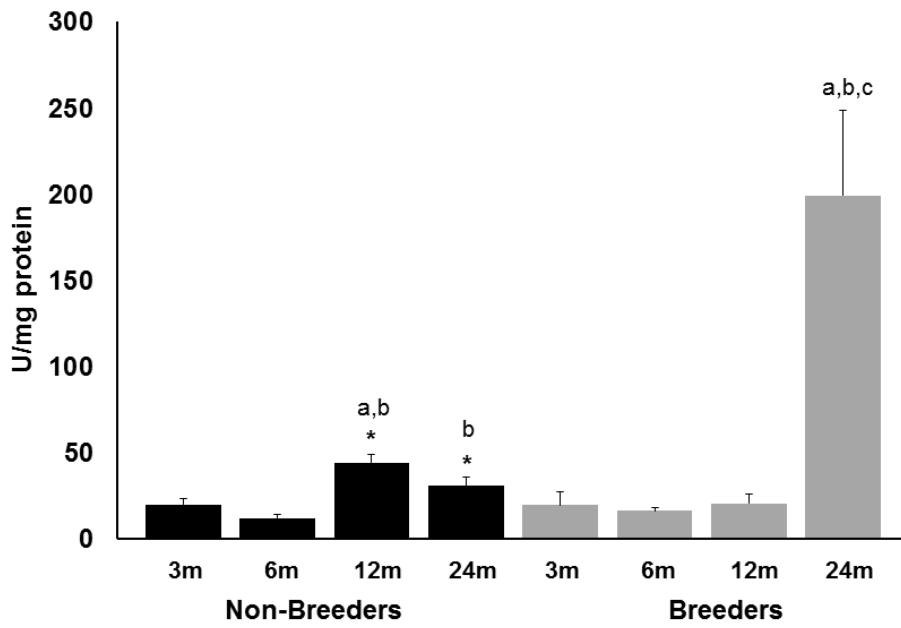
With respect to enzymatic antioxidant defenses, we found that consumption of hydrogen peroxide was higher in non-breeders at 3 and 12 months of age than in breeders at the same age (Fig. 3A). Consumption of hydrogen peroxide was higher in breeders at 24

months of age than in non-breeders at the same age. In non-breeders, consumption of hydrogen peroxide was lower at 6 months of age in comparison to those with 3, 12 and 24 months at the same group. No significant differences were found among breeders of different ages. In non-breeders, GPx activity was lower at 24 months of age than in breeders at the same age, (Fig. 3B) and non-breeders at 12 months of age showed a higher GPx activity than breeders at the same age. GPx activity was higher in non-breeders at 12 months of age in comparison to 3 and 6 months and was also higher at 24 months of age in comparison to non-breeders at 6 months of age. In breeders, GPx activity was higher at 24 months of age than in the other ages of the same group (breeders). A similar profile was observed in SOD, where the activity of this enzyme was higher at 12 months of age in non-breeders than in breeders of the same age (Fig. 3C). In breeders, SOD activity was higher at 24 months of age than in non-breeders of the same age. Non-breeders at 12 months of age showed a higher SOD activity in comparison to those with 3, 6 and 24 months and non-breeders at 24 months of age also showed a higher SOD activity than animals at 6 months of age. SOD activity was also higher in breeders at 24 months of age than in breeders at other ages. GST activity was higher in non-breeders at 6 and 24 months of age than in breeders at the same age (Fig. 3D). GST activity was higher in breeders at 12 months of age than in non-breeders at the same age. GST was lower in non-breeders at 12 and 24 months in comparison to younger animals. In breeders, GST activity increased from 6 to 12 months of age and decreased from 12 to 24 months of age.

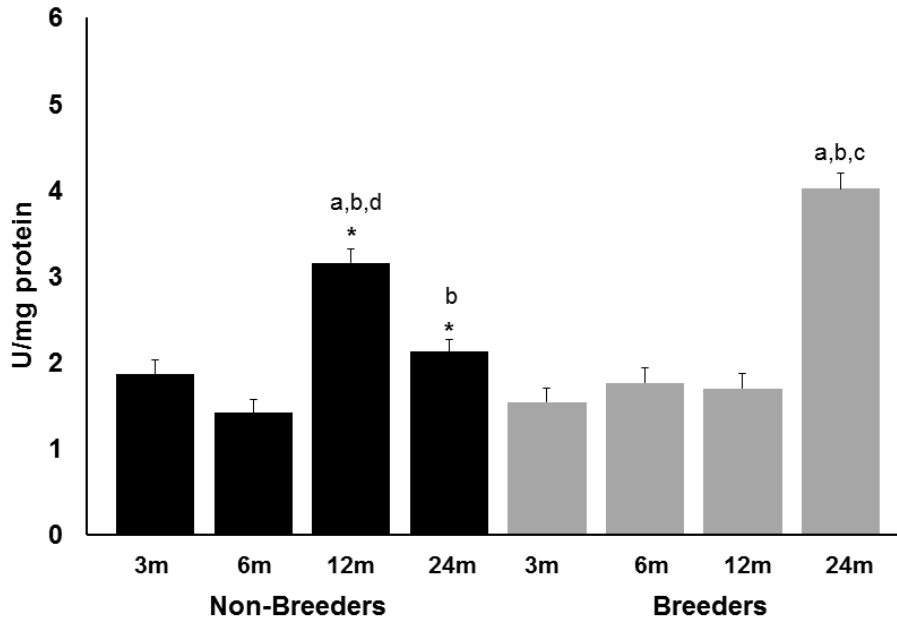
A- Hydrogen peroxide consumption



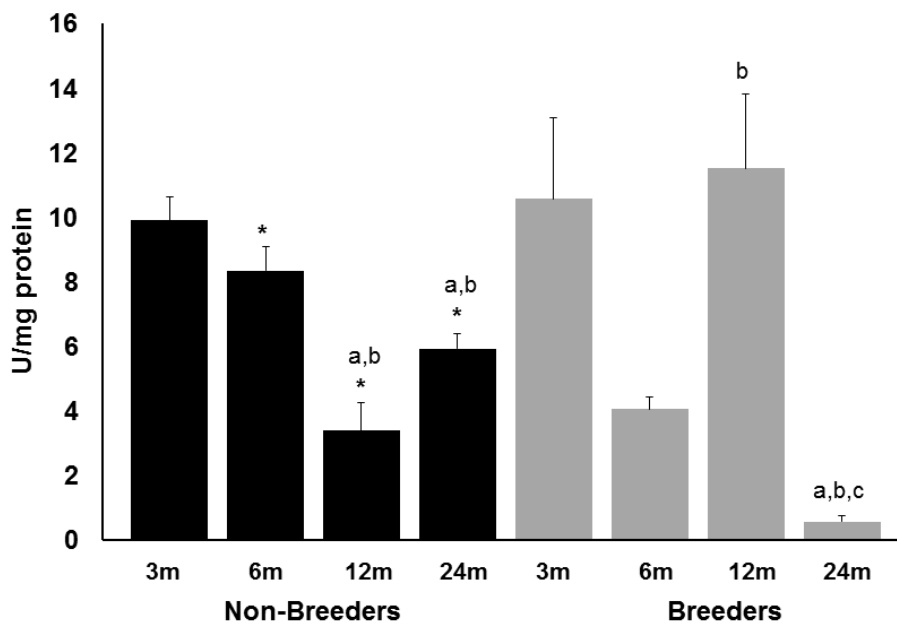
B- Glutathione peroxidase



C- Total superoxide dismutase



D- Glutathione S-transferase



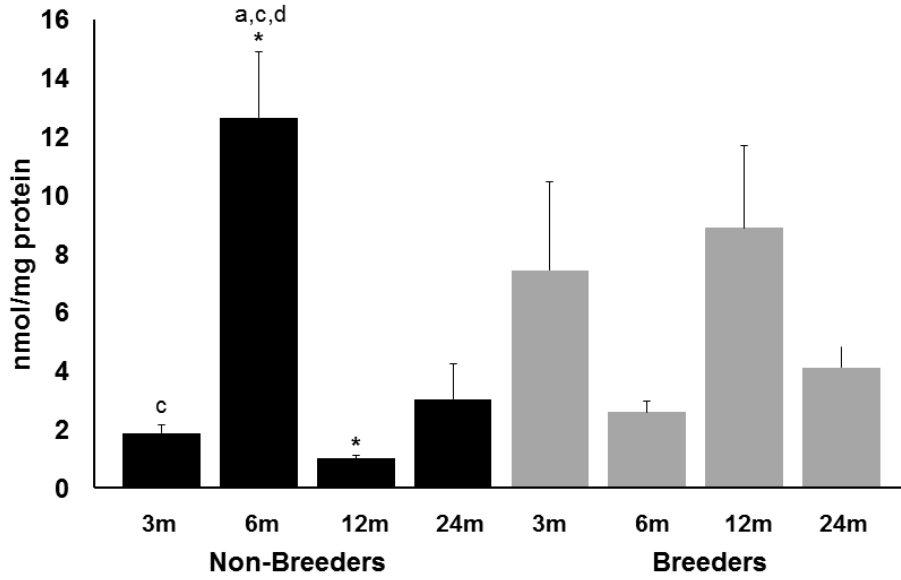


**Fig. 3** Activity of antioxidant enzymes: consumption of hydrogen peroxide (A), glutathione peroxidase (B), superoxide dismutase (C) and glutathione S-transferase (D) in brain of female rats. Activity expressed in U/mg of protein.\* Significant difference between non-breeders and breeders at the same age;  $p \leq 0.05$ . a- significant difference from 3 months; b- significant difference from 6 months; c- significant difference from 12 months; d- significant difference from 24 months.  $p \leq 0.05$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SE.

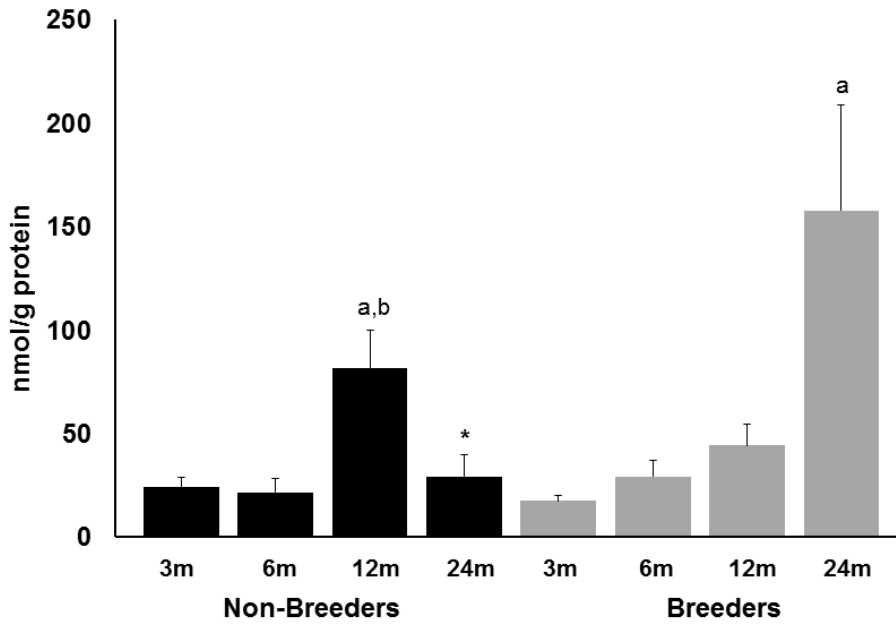
### **Oxidative damage**

We found that MDA levels were higher in non-breeders than breeders at 6 months of age (Fig. 4A). MDA levels were higher in breeders at 12 months than in non-breeders at the same age. In non-breeders, MDA levels were higher at 6 months also among animals of the same group (non-breeders). There were no differences within breeders group. Compared with non-breeders at the same age, carbonyl levels were higher in breeders at 24 months of age (Fig. 4B). During aging, in breeders, carbonyl levels increased in 24 months of age; however, this increase was significant only compared to animals at 3 months of age. We also observed a significant increase in protein carbonylation in non-breeders at 12 months of age in relation to 3 and 6 months. No differences were found for  $\text{NO}_2\&\text{NO}_3$  levels between breeders and non-breeders groups (Fig. 4C).  $\text{NO}_2\&\text{NO}_3$  levels were higher in non-breeders and breeders at 24 months of age than in animals at 3 and 12 months of age.

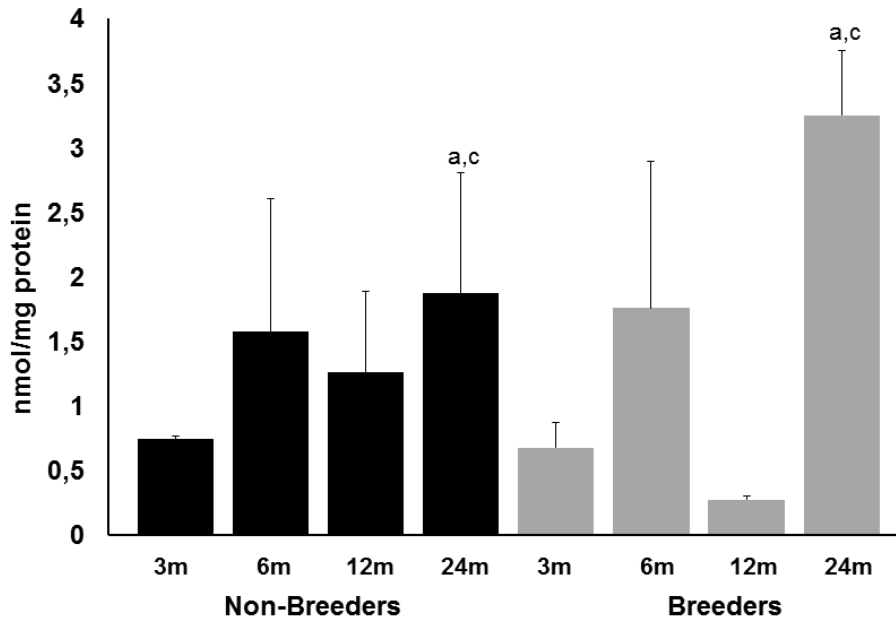
A- Malondialdehyde



B- Carbonyl



C- Nitrites and nitrates levels



**Fig 4** Parameters of oxidative damage in brain of rats non-breeders and breeders over aging. MDA (malondialdehyde levels) expressed as nmol of MDA/mg of protein. Protein carbonylation levels expressed as nmol of carbonyl/g of protein. NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> levels expressed as nmol of NaNO<sub>2</sub>/mg of protein. \* Significant difference between non-breeders and breeders at the same age;  $p \leq 0.05$ . a- significant difference from 3 months; b- significant difference from 6 months; c- significant difference from 12 months; d- significant difference from 24 months.  $p \leq 0.05$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SE.

## Correlation analysis

**Table 2** Pearson Correlation analysis of non-breeders

Pearson correlation- Non-breeders

		Carbonyl	GSH	GST	Consumption of H2O2	GPX	SOD	NO <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	MDA	VitC	Estrogen
Carbonyl	Pearson correlation	-			0.711**	0.511*	0.844**			0.658**	0.518*
	Sig. (2-tailed)	-			.000	.018	.000			.003	.033
GSH	Pearson correlation		-			0.655**					
	Sig. (2-tailed)		-			.001					
GST	Pearson correlation			-						-0.647**	-0.617**
	Sig. (2-tailed)			-						.004	.008
Consumption of H2O2	Pearson correlation				-	0.650**	0.930**			0.606**	
	Sig. (2-tailed)				-	.001	.000			.008	
GPX	Pearson correlation					-	0.742**			0.588*	0.629**
	Sig. (2-tailed)					-	.000			.010	.007
SOD	Pearson correlation						-			0.898**	0.639**
	Sig. (2-tailed)						-			.000	.006
NO <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	Pearson correlation							-			
	Sig. (2-tailed)							-			
MDA	Pearson correlation								-		-0.558*
	Sig. (2-tailed)								-		.030
VitC	Pearson correlation									-	0.682**
	Sig. (2-tailed)									-	.005
Estrogen	Pearson correlation										-
	Sig. (2-tailed)										-

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**Table 3** Pearson Correlation analysis of breeders

Pearson correlation- Breeders

		Carbonyl	GSH	GST	Consumption of H2O2	GPX	SOD	NO <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	MDA	VitC	Estrogen
Carbonyl	Pearson correlation	-	0.679**		0.968**	0.968**	0.935**	0.611**			
	Sig. (2-tailed)	-									
GSH	Pearson correlation		-		0.652**	0.748**	0.791**	0.523**			
	Sig. (2-tailed)		-								
GST	Pearson correlation			-			-0.499*	-0.537*	0.604*		
	Sig. (2-tailed)			-							
Consumption of H2O2	Pearson correlation				-	0.963**	0.938**	0.636**			
	Sig. (2-tailed)				-						
GPX	Pearson correlation					-	0.987**	0.665**			
	Sig. (2-tailed)					-					
SOD	Pearson correlation						-	0.695**			
	Sig. (2-tailed)						-				
NO <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	Pearson correlation							-			
	Sig. (2-tailed)							-			
MDA	Pearson correlation								-		0.711**
	Sig. (2-tailed)								-		
VitC	Pearson correlation									-	
	Sig. (2-tailed)									-	
Estrogen	Pearson correlation										-
	Sig. (2-tailed)										-

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

## DISCUSSION

Investment in reproduction is expected to be costly and can decrease survival or future reproductive success (Stearns, 1992). Reproductive costs may be generated by numerous processes and behaviors related to reproduction, such as the growth of sex organs, the act of copulation and investment in parental care (Rose 2005). The trade-off between reproductive investment and lifespan is the single most important concept in life-history theory. One aspect of physiology that has been implicated in ageing for 50 years is oxidative stress (Harman, 1956; Beckman e Ames, 1998).

A state of oxidative stress can arise if ROS production overwhelms the body's antioxidant defenses or repair mechanisms, resulting in increased levels of oxidative damage, and loss of cell homeostasis and function. Oxidative damage is thought to be an important mechanism underlying the gradual deterioration of bodily function that defines ageing (Halliwell, 2007), and therefore could explain the cost of reproduction (Dowling e Simmons, 2009; Metcalfe e Alonso-Alvarez, 2010; Speakman e Garratt, 2014). Our results demonstrate that there is a significant difference in oxidative profiles between breeders and non-breeders female rats. The observed differences support the idea that reproduction changes the parameters of oxidative stress in brain of female rats, as demonstrated previously in similar studies in kidney of females (Da Silva *et al.*, 2013) and brain of males (Gil Alabarse *et al.*, 2011).

In order to assess whether reproducing and non-reproducing individuals differ in oxidative balance, Yang et al. (2013) compared the oxidative status between lactating and non-reproducing female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). The authors found that some parameters of oxidative protection (serum superoxide dismutase activity and glutathione peroxidase activity) were reduced, and a marker of oxidative damage (protein

carbonyls in serum) was increased, in lactating compared with non-reproductive gerbils. However, other markers of oxidative damage (thiobarbituric acid reactive substances and protein carbonyls in the liver) were actually lower in lactating compared with non-reproductive gerbils, consistent with increased levels of superoxide dismutase activity and non-enzymatic antioxidant capacity in the liver (Yang et al. 2013). These findings showed that the effect of reproductive activity on oxidative balance may be tissue-dependent and biomarker-dependent.

In our study, breeders had a higher oxidative damage at twenty four months of age accompanied by an increase in antioxidants defenses. We found a correlation between carbonyl and the amount of consumption of hydrogen peroxide (93.7 %), GPx activity (92.7 %) and SOD activity (87.4 %). NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> levels correlated with consumption of hydrogen peroxide (40.4 %), GPx activity (44.2 %) and SOD activity (48.3 %). A correlation between carbonyl and NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> levels (37.3 %; beta standardized value of 6.7) was also found. Non-breeders showed a higher level of carbonyl at twelve months of age accompanied by an increase in antioxidant enzymes SOD and GPx and the amount of consumption of hydrogen peroxide. We found a correlation between carbonyl and SOD activity (71.2 %), GPx activity (26.1 %) and consumption of hydrogen peroxide (51.4 %). Our group found higher activities of antioxidant enzymes and more evidences of damage in brain of six-months-old breeders males rats compared to non-breeders rats at same age (Gil Alabarse *et al.*, 2011). Another study with kidney of female rats found increased levels of oxidative damage at twenty four months of non-breeders. The activity of antioxidant enzymes varied according to age and group (Da Silva *et al.*, 2013). This might indicate that the distribution of these antioxidant defense effectors is dependent upon the needs of the tissues, the age and sex of the organism, and environmental conditions.

Reproducing individuals selectively allocate protection to some key tissues, while sacrificing protection of others (Yang *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2014).

The increase in production of reactive species that we believe occurred in older breeders due to higher levels of NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> and carbonyl probably induced protective higher SOD and GPx activities and the amount of consumption of hydrogen peroxide, however, this increase is not sufficient to block oxidative damage. SOD, GPx and CAT are the main endogenous enzymatic defense systems of all aerobic cells (Fisher-Wellman *et al.*, 2009). These enzymes protect from oxidative damage by directly scavenging superoxide radicals and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), converting them into less reactive species (Halliwell, 2007). SOD catalyze the dismutation of the superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) into oxygen (O<sub>2</sub>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The enzymes CAT and GPx work coordinately to eliminate hydrogen peroxide from the body (Halliwell, 2007). We found a strong correlation in breeders between SOD and GPx (97.4 %) and consumption of hydrogen peroxide (87.9 %). Non-breeders also showed a strong correlation between SOD and GPx activity (86.4 %) and consumption of hydrogen peroxide (55 %). These results indicate that the antioxidant enzymes are working together to prevent oxidative damage.

The beneficial effects of estradiol have been widely documented. Some studies on birds or mammals showed that females tend to have lower levels of oxidative damage and higher levels of antioxidants (Casagrande *et al.*, 2011; Vina *et al.*, 2011). Female sex steroids (estrogens) appear to enhance antioxidant defenses (Halifeoglu *et al.*, 2003; Borras *et al.*, 2010) and reduce ROS production in mitochondria (Borras *et al.*, 2010). Estrogens have antioxidant properties which are due to their ability to bind to estrogen receptors and to upregulate the expression of antioxidant enzymes via intracellular signaling pathways (Borras *et al.*, 2010).

Results of studies conducted by (Vina *et al.*, 2011) showed that physiological concentrations of estrogens activate estrogen receptors and the MAPK and NFκB pathways. Activation of NFκB by estrogens subsequently activates the expression of Mn-SOD and GPx (Vina *et al.*, 2011). These antioxidant properties of estrogen would explain the correlation between estrogen with the enzymes SOD (40.8 %; beta standardized value of 1.4) and GPx (39.5 %) found in non-breeders animals, because high levels of estrogen probably induce indirectly the enzymes activity. In our study lower levels of MDA are associated with higher levels of estrogen both in non-breeders (-31.1 %; beta standardized value of -4.9) and breeders (-50.5 %); this hormone acts as radical scavengers and inhibits lipid peroxidation in vivo and in vitro. At 6 months of age, during the period that would represent reproductive activity peak, non-breeders showed higher levels of MDA, as was seen in kidney of female animals. In this same age and group the levels of estradiol are low. Estrogen may be used for the prevention of neurodegenerative diseases because of its antioxidant effects, and the antioxidant actions of estrogen may play a role in these effects (Garcia-Segura *et al.*, 2001; Brann *et al.*, 2007; Henderson, 2010).

Glutathione, an important low-molecular weight non-enzymatic antioxidant, was more concentrated in the livers of females that had been investing in reproduction over four months, suggesting that up-regulation of this antioxidant by reproducing females was one mechanism used to defend against oxidative stress (Garratt *et al.*, 2011). In relation to our study no difference was found during aging for tGSH levels among non-breeders and breeders. Levels of tGSH in non-breeders and breeders were higher at 24 months of age, same age where it was found the highest activity of antioxidant enzymes in breeders. Glutathione is a cofactor of several detoxifying enzymes against oxidative stress, e.g. glutathione peroxidase (GPx), glutathione transferase (GST) and others (Masella *et al.*,



2005). According to this property of glutathione we found correlation between tGSH with GPx activity in breeders (55.9 %; beta standardized value of 1.2) and non-breeders (42.9 %; beta standardized value of 5.5).

Vitamin C, or ascorbic acid, is an important component of neuronal antioxidant network and an enzyme cofactor in the synthesis of catecholamines and certain peptide hormones (Chatterjee *et al.*, 1975; Harrison e May, 2009). Unlike primates, rats synthesize Vit.C, a process that takes place in the liver (Gupta *et al.*, 1973a). The highest level of Vit. C was observed in non-breeders at 12 months of age however these levels declined drastically at 24 months. Elderly breeders also showed a decrease in levels of Vit.C compared to 6 months of age. Siqueira *et al.*, 2011 (Siqueira *et al.*, 2011) demonstrated a significant decrease (about 40%) in the uptake of ascorbate in hippocampal slices from rats aged 11 and 24 months, as compared to young ones, what may be related to decline in ascorbate levels during the brain ageing process. On the other hand we don't know the reason of the increase in the Vit.C levels in non-breeders at 12 months of age.

Nitric oxide (NO) acts as a gaseous signaling molecule and participates in various physiological and pathological processes in the central nervous system (CNS) (Calabrese *et al.*, 2007). The brain has the highest concentration of NO among different tissues, and NO critically manages broad aspects of brain function, including synaptic plasticity, neurodevelopment and neuronal cell death (Centonze *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2005; Contestabile, 2012). In our study no differences were found for NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> levels between breeders and non-breeders groups. NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> levels were higher in non-breeders and breeders at 24 months of age than in animals at 3 and 12 months of age. When the brain is exposed to oxidative stress, NO easily interacts with reactive oxygen species (ROS), thereby forming reactive nitrogen species (RNS) (Beckman, 2002). For

example, peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) generated from the reaction of NO with superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) is capable of initiating further protein oxidation and nitration, which ultimately induces apoptosis in primary neurons (Wang *et al.*, 2003).

GSTs may represent potentially important targets for reactive nitrogen species (RNS), based on emerging evidence indicating compromised GST activity during inflammation and infection (Sirivarasai *et al.*, 2013), conditions associated with increased RNS production. In our study lower levels of GST are associated with higher levels of  $\text{NO}_2$  and  $\text{NO}_3$  in breeders (-28.8 %). Various enzyme activities are modulated by  $\text{ONOO}^-$  through tyrosine nitration or thiol modifications as seen in an inactivation of cytosolic glutathione-S- transferases (GSTs). Thus, irreversible modifications such as tyrosine nitration may have contributed to GST inactivation by RNS (Wong *et al.*, 2001).

There has been substantial recent interest in the possible role of oxidative stress as a mechanism underlying life history trade-offs, particularly with regard to reproductive costs. Several recent papers have found no evidence that reproduction increases oxidative damage and so have questioned the basis of the hypothesis that oxidative damage mediates the reproduction–lifespan trade-off (Isaksson *et al.*, 2011; Selman, Colin *et al.*, 2012; Speakman e Garratt, 2014).

Here we demonstrated that the aging process causes higher oxidative damage and higher antioxidant defenses in brain of breeders at twenty four months. From these results it is possible to conclude that there are metabolic differences in brain of breeders and non-breeders but further investigation is needed in order to establish the exact causes of these differences. It has previously been emphasized that levels of oxidative damage may vary amongst specific markers and tissues, underlining the importance of measuring multiple

markers and (if possible) different tissues when studying oxidative stress (Costantini 2008; Selman et al. 2012). This study shows that there is strong potential for research linking the cost of reproduction and oxidative stress.

## REFERENCES

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105: 121–126.

Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B and Sorci G (2004) Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol Lett* 7:363-368. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00594.x

Aurori CM, Buttstedt A, Dezmirean DS, Marghitas LA, Moritz RFA and Eler S (2014) What Is the Main Driver of Ageing in Long-Lived Winter Honeybees: Antioxidant Enzymes, Innate Immunity, or Vitellogenin? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*: 633-639. doi: 10.1093/gerona/glt134

Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D and Grp IW (2000) Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study - Two-fold higher incidence in men. *Neurology*:1358-1363.

Beckman JS (2002) Nitric oxide, and superoxide versus nitroxyl anion in nitrative and nitrosative stress. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*:U382-U382.

Beckman KB and Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*:547-581.

Bennett NCaF, Chris G (2005) *African Mole-Rats: Ecology and Eusociality*. Cambridge University Press, Cambridge.

Bergeron P, Careau V, Humphries MM, Reale D, Speakman JR and Garant D (2011) The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Funct Ecol* 25:1063–1071. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01868.x

Borras C, Gambini J, Lopez-Gruoso R, Pallardo FV and Vina J (2010) Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *BBA-Mol Basis Dis* 1802: 205-211. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.09.007

Borras C, Gambini J and Vina J (2007) Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci*: 1008-1013. doi: 10.2741/2120

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. doi:10.1006/abio.1976.9999

Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB and Khan MM (2007) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*: 381-405. doi: 10.1016/j.steroids.2007.02.003

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA and Stella AMG (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*: 766-775. doi: 10.1038/nrn2214

Casagrande S, Dell'Omo G, Costantini D, Tagliavini J and Groothuis T (2011) Variation of a carotenoid-based trait in relation to oxidative stress and endocrine status during the breeding

season in the Eurasian kestrel: A multi-factorial study. *Comp Biochem Physiol, Mol integr Physiol*: 16-26. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.04.011

Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G and Calabresi P (2003) Dopamine, acetylcholine and nitric oxide systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity. *Rev Neurosci*: 207-216.

Chatterjee IB, Majumder AK, Nandi BK and Subramanian N (1975) Synthesis and some major functions of vitamin-c in animals. *Ann N. Y. Acad Sci*: 24-47. doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb29266.x

Chung KKK, Dawson TM and Dawson VL (2005) Nitric oxide, S-nitrosylation and neurodegeneration. *Cell Mol Biol*: 247-254. doi: 10.1170/t625

Clutton-Brock TH (1991) *The Evolution of Parental Care*.

Colom B, Oliver J, Roca P and Garcia-Palmer FJ (2007) Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative damage. *Cardiovasc Res*: 456-465. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.001

Contestabile A (2012) Role of Nitric Oxide in Cerebellar Development and Function: Focus on Granule Neurons. *Cerebellum*:50-61. doi: 10.1007/s12311-010-0234-1

Costantini D (2008) Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecol Lett*: 1238-1251. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01246.x

Costantini D (2014) *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Springer. doi: 10.1007/978-3-642-54663-1

Da Silva ACA, Salomon TB, Behling CS, Putti J, Hackenhaar FS, Alabarse PVG, Schueller AK and Benfato MS (2013) Oxidative stress in the kidney of reproductive female rats during aging. *Biogerontology*:411-422. doi: 10.1007/s10522-013-9440-9

Dickinson BC and Chang CJ (2011) Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol*: 504-511. doi: 10.1038/nchembio.607

Dowling DK and Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. R. Soc. B, Biol. Sci*:1737-1745. doi: 10.1098/rspb.2008.1791

Fisher-Wellman K, Bell HK and Bloomer RJ (2009) Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*:43-51.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I and DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*: 29-60. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00025-3

Garratt M, Pichaud N, King EDA and Brooks RC (2013) Physiological adaptations to reproduction. I. Experimentally increasing litter size enhances aspects of antioxidant defence but does not cause oxidative damage in mice. *J Exp Biol*: 2879-2888. doi: 10.1242/jeb.082669

Garratt M, Vasilaki A, Stockley P, McArdle F, Jackson M and Hurst JL (2011) Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proc R Soc B-Biol Sci*: 1098-1106. doi: 10.1098/rspb.2010.1818

Gil Alabarse PV, Hackenhaar FS, Medeiros TM, Almeida Mendes MF, Viacava PR, Schueller AK, Salomon TB, Ehrenbrink G and Benfato MS (2011) Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. *Exp Gerontol*:241-248. doi: 10.1016/j.exger.2010.10.009

Grisham MB, Johnson GG and Lancaster JR (1996) Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase*.

Guevara R, Santandreu FM, Valle A, Gianotti M, Oliver J and Roca P (2009) Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*: 169-175. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.035

Gupta SD, Choudhur.Pk and Chatterj.lb (1973) Synthesis of l-ascorbic-acid from d-glucurono-1,4-lactone conjugates by different species of animals. *Int J Biochem* 4:309–314

Hackenhaar FS, Salomon TB, Gil Alabarse PV, Ehrenbrink G and Benfato MS (2009) Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochem Funct* 27:378–382. doi:10.1002/cbf.1585

Haider S, Saleem S, Perveen T, Tabassum S, Batool Z, Sadir S, Liaquat L and Madiha S (2014) Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age*:1291-1302. doi: 10.1007/s11357-014-9653-0

Halifeoglu I, Karatas F, Canatan H, Colak R and Karadas E (2003) Investigation of antioxidant vitamins (A, E and C) and selenium levels in chickens receiving estrogen or testosterone. *Cell Biochem. Funct*:133-136. doi: 10.1002/cbf.1009

Halliwell B, Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford University Press, Oxford

Harman D (1956) Aging - a theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J Gerontol* 11:298–300

Harrison FE and May JM (2009) Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med*: 719-730. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.018

Henderson VW (2010) Action of estrogens in the aging brain: Dementia and cognitive aging. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*:1077-1083. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.11.005

Isaksson C, Sheldon BC and Uller T (2011) The Challenges of Integrating Oxidative Stress into Life-history Biology. *Bioscience*:194-202. doi: 10.1525/bio.2011.61.3.5

Justo R, Frontera M, Pujol E, Rodriguez-Cuenca S, Llado I, Garcia-Palmer FJ, Roca P and Gianotti M (2005) Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Life Sci*: 1147-1158. doi: 10.1016/j.lfs.2004.08.019

- Karatepe M (2004) Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc N Am* 22:362–365
- Krinke GJ (2000) *The Handbook of Experimental Animals: the laboratory rat*. New York: Academic Press: 756 ISBN 012426400X.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S and Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 186:464–478
- Losdat S, Helfenstein F, Gaude B and Richner H (2011) Reproductive effort transiently reduces antioxidant capacity in a wild bird. *Behav Ecol*: 1218-1226. doi: 10.1093/beheco/arr116
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A and Mecocci P (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*:65-75. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.04.023
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C and Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*: 577-586. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013
- Metcalfe NB and Alonso-Alvarez C (2010) Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Funct Ecol* 24:984–996. doi:10.1111/j.1365-2435.2010. 01750
- Metcalfe NB and Monaghan P (2013) Does reproduction cause oxidative stress? An open question. *Trends in ecology & evolution*:347-350. doi: 10.1016/j.tree.2013.01.015
- Monaghan P, Metcalfe NB and Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett*: 75-92. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A and Van Remmen H (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*: 477-503. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034
- Pichaud N, Garratt M, Ballard JWO and Brooks RC (2013) Physiological adaptations to reproduction. II. Mitochondrial adjustments in livers of lactating mice. *J Exp Biol*: 2889-2895. doi: 10.1242/jeb.082685
- Remolina SC and Hughes KA (2008) Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age*:177-185. doi: 10.1007/s11357-008-9061-4
- Rodriguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, Frontera M, Oliver J, Gianotti M and Roca P (2002) Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *J Biol Chem*: 42958-42963. doi: 10.1074/jbc.M207229200
- Schmidt CM, Blount JD and Bennett NC (2014) Reproduction Is Associated with a Tissue-Dependent Reduction of Oxidative Stress in Eusocial Female Damara land Mole-Rats (*Fukomys damarensis*). *Plos One*:7. doi: 10.1371/journal.pone.0103286

Schmidt CM, Jarvis JUM and Bennett NC (2013) The long-lived queen: reproduction and longevity in female eusocial Damaraland mole-rats (*Fukomys damarensis*). *African Zoology*:193-196.

Schrempf A, Cremer S and Heinze J (2011) Social influence on age and reproduction: reduced lifespan and fecundity in multi-queen ant colonies. *J Evol Biol*: 1455-1461. doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02278.x

Selman C, Blount JD, Nussey DH and Speakman JR (2012) Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends in Ecology & Evolution*: 570-577. doi: 10.1016/j.tree.2012.06.006

Siqueira IR, Elsner VR, Leite MC, Vanzella C, Moyses FdS, Spindler C, Godinho G, Battu C, Wofchuk S, Souza DO, Goncalves CA and Netto CA (2011) Ascorbate uptake is decreased in the hippocampus of ageing rats. *Neurochemistry International*: 527-532. doi: 10.1016/j.neuint.2011.01.011

Sirivarasai J, Wananukul W, Kaojarern S, Chanprasertyothin S, Thongmung N, Ratanachaiwong W, Sura T and Sritara P (2013) Association between Inflammatory Marker, Environmental Lead Exposure, and Glutathione S-Transferase Gene. *Biomed Research International*. doi: 10.1155/2013/474963

Solomon NG and French JA (1997) *Cooperative Breeding in mammals*. Cambridge University Press, Cambridge

Speakman JR (2008) The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*:375-398. doi: 10.1098/rstb.2007.2145

Speakman JR and Garratt M (2014) Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *Bioessays*:93-106. doi: 10.1002/bies.201300108

Stearns, S (1992) *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford. ISBN 9780198577416.

Valle A, Guevara R, Garcia-Palmer FJ, Roca P and Oliver J (2007) Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. *Am J Physiol*: C1302-C1308. doi: 10.1152/ajpcell.00203.2007

Vina J, Gambini J, Lopez-Grueso R, Abdelaziz KM, Jove M and Borras C (2011) Females Live Longer than Males: Role of Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*:3959-3965.

Wang JY, Shum AYC and Ho YJ (2003) Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *J Neurosci Res*: 508-519. doi: 10.1002/jnr.10597

WHO (2011) World Health Organization <http://www.who.int/en/>

Wiersma P, Selman C, Speakman JR and Verhulst S (2004) Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proc R Soc B-Biol Sci*: S360-S363. doi: 10.1098/rsbl.2004.0171



Wilson SM, Taylor JJ, Mackie TA, Patterson DA, Cooke SJ and Willmore WG (2014) Oxidative Stress in Pacific Salmon (*Oncorhynchus* spp.) during Spawning Migration. *Physiol Biochem Zool*: 346-352. doi: 10.1086/674798

Wong PSY, Eiserich JP, Reddy S, Lopez CL, Cross CE and van der Vliet A (2001) Inactivation of glutathione S-transferases by nitric oxide-derived oxidants: Exploring a role for tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys*: 216-228. doi: 10.1006/abbi.2001.2532

Yang DB, Xu YC, Wang DH and Speakman JR (2013) Effects of reproduction on immunosuppression and oxidative damage, and hence support or otherwise for their roles as mechanisms underpinning life history trade-offs, are tissue and assay dependent. *J Exp Biol*: 4242-4250. doi: 10.1242/jeb.092049



## 5. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR

O estresse oxidativo desempenha um papel crucial na etiologia de inúmeras doenças degenerativas, que aceleram a senescência e afetam o desempenho do organismo (Kirkwood e Austad, 2000; Halliwell e Gutteridge, 2007). Quando colocado em um quadro evolutivo, este tem sido considerado como um componente chave que participa dos *trade-offs* entre reprodução e manutenção corporal devido a correlação positiva observada entre esforço reprodutivo e estresse oxidativo em mamíferos (Bergeron *et al.*, 2011b; Fletcher *et al.*, 2013), aves (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004; Wiersma *et al.*, 2004) e em espécies de insetos (Archer *et al.*, 2013).

A ideia do estresse oxidativo como um custo fisiológico da reprodução, no entanto, tem sido questionada por alguns estudos que mostram que os danos oxidativos mantêm-se inalterados ou até mesmo reduzidos com o esforço reprodutivo (Garratt *et al.*, 2011; Oldakowski *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2014), e que as defesas antioxidantes aumentam durante este período (Garratt *et al.*, 2013; Michalkova *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). Pichaud *et al.* (2013) verificaram que as mitocôndrias do fígado de fêmeas reprodutoras possuem uma menor atividade do sistema de transporte de elétrons e um aumento na densidade mitocondrial quando em comparação com fêmeas não reprodutoras. Propôs-se que este ajuste mitocondrial poderia ajudar a poupar a energia necessária durante a reprodução, mantendo o equilíbrio entre a produção de energia e a produção de espécies reativas (Pichaud *et al.*, 2013).

Uma possível hipótese para a diminuição dos danos oxidativos durante a reprodução foi proposta por Blount *et al.* (2015). Segundo essa teoria uma redução nos níveis de dano oxidativo em fêmeas reprodutoras serviria para proteger as mães e,

principalmente, os seus gametas e prole em desenvolvimento dos efeitos prejudiciais ocasionados pelo estresse oxidativo (Blount *et al.*, 2015). Por exemplo, a disfunção placentária causada pelo estresse oxidativo tem sido associada à restrição do crescimento fetal e baixo peso ao nascimento nos seres humanos. Além disso, altos níveis de estresse oxidativo placentário e sistêmico em mães têm sido associados com alterações na vasculatura placentária, defeitos durante a embriogênese e aborto espontâneo (Gupta *et al.*, 2007; Al-Gubory *et al.*, 2010). Os mecanismos por trás desta diminuição dos danos oxidativos ainda não são bem claros, sendo assim, estudos adicionais são necessários para avaliar a validade desta hipótese.

Neste trabalho, fêmeas reprodutoras de vinte e quatro meses de idade apresentaram uma elevação nos níveis de carbonilação de proteínas e de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub>. Além disso, percebe-se uma alta correlação entre a atividade das enzimas antioxidantes e os marcadores de dano oxidativo nestes mesmos animais. Neste grupo, encontramos correlação entre grupamentos carbonila e consumo de peróxido de hidrogênio (93,7%), atividade de GPx (92,7%) e atividade de SOD (87,4%). Níveis de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> também estão correlacionados com o consumo de peróxido de hidrogênio (40,4%), atividade da enzima GPx (44,2%) e a atividade de SOD (48,3%). Já as fêmeas não reprodutoras apresentaram níveis mais elevados de grupamentos carbonila aos doze meses de idade, acompanhado por um aumento no consumo de peróxido de hidrogênio e na atividade das enzimas SOD e GPx. Alguns estudos onde o esforço reprodutivo foi manipulado, por exemplo, mostram que as defesas antioxidantes podem ser alteradas, possivelmente sacrificadas em favor do investimento reprodutivo (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004; Wiersma *et al.*, 2004; Losdat *et al.*, 2011) ou reguladas positivamente em resposta a um aumento da produção de espécies reativas (Garratt *et al.*, 2013).

Há conhecidos marcadores de dano oxidativo que auxiliam no estudo do estresse oxidativo. Algumas moléculas formadas pelo ataque direto dos radicais livres são instáveis e reagem até formar moléculas mais estáveis e, estas, podem ser utilizadas como marcadores de dano oxidativo. A carbonilação de proteínas é um biomarcador muito usado para avaliar o dano oxidativo em proteínas, e reflete danos celulares ocasionados por múltiplas formas de espécies reativas. Carbonilação é uma modificação protéica irreversível e não enzimática. Em condições de estresse oxidativo, estes grupamentos são formados diretamente pelo ataque de espécies reativas aos aminoácidos: arginina, lisina, prolina e treonina (Levine e Stadtman, 2001; Dalle-Donne, Rossi, *et al.*, 2003). Estudos demonstram que há um aumento progressivo nas concentrações de proteínas carboniladas com o envelhecimento (Cakatay *et al.*, 2003; Breusing *et al.*, 2009; Dkhar e Sharma, 2011). Os resultados observados aqui estão de acordo com estes estudos, onde fêmeas reprodutoras mais velhas (24 meses) apresentaram os maiores níveis de proteínas carboniladas. Em relação aos animais não reprodutores, a maior concentração de carbonil foi observada aos 12 meses, quando em comparação com os animais de 3 e 6 meses de idade.

O  $\text{NO}^\bullet$  é rapidamente metabolizado a produtos estáveis, ou seja, nitrito e nitrato. O  $\text{NO}^\bullet$  pode reagir com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  produzindo o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), principal espécie reativa de nitrogênio com importância biológica (Halliwell e Gutteridge, 2007). A concentração de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  gerada na mitocôndria também aumenta continuamente ao longo do envelhecimento no cérebro. O complexo I da mitocôndria sofre inativação via  $\text{NO}^\bullet$  sugerindo uma maior produção de radicais livres nos animais reprodutores de 24 meses que apresentam elevados níveis de  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_3$  relacionada a esta inativação (Tsay *et al.*, 2000; Antunes *et al.*, 2002).

Já o MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em lipídios (Kadiiska *et al.*, 2005), ele é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da  $\beta$ -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poli-insaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico. (Kadiiska *et al.*, 2005). Em nosso estudo baixos níveis de MDA estão associados a níveis elevados de estrogênio, tanto em animais reprodutores (-50,5%) quanto em não reprodutores (-31,1%). Este hormônio funcionaria como um sequestrador de radicais livres inibindo a peroxidação lipídica. Ou seja, esta relação negativa entre o MDA e o estrogênio sugere um possível efeito protetor do estradiol ao dano oxidativo.

Na maioria dos mamíferos, incluindo os seres humanos, a expectativa de vida é tendenciosa para o sexo feminino. As fêmeas também apresentam uma menor incidência de determinadas patologias relacionadas à idade e ligadas ao estresse oxidativo quando comparadas com machos. Esta diferença de sexo desaparece após a menopausa, levando a conclusão de que os hormônios sexuais teriam uma ação protetora (Borras *et al.*, 2005). Embora a estrutura química do estrogênio favoreça sua ação antioxidante *in vitro* os efeitos benéficos *in vivo* do mesmo acontecem devido à indução da expressão de genes de enzimas antioxidantes, como SOD e GPx (Vina, Sastre, *et al.*, 2006a; Borras *et al.*, 2010). Estas propriedades antioxidantes do estrogênio poderiam explicar a correlação entre o estrogênio e a enzima SOD (40,8%;) e GPx (39,5%) encontrada em fêmeas não reprodutoras.

A taxa de produção de oxidantes pela mitocôndria é menor em fêmeas de ratos do que em machos. Mitocôndrias de fêmeas produzem a metade de peróxido de hidrogênio quando comparadas aos machos e os níveis de 8-OHdG são quatro vezes menores em fêmeas do que em machos. Ainda, os níveis de GSH em fêmeas são 50% maiores, o que

pressupõe que além da produção de radicais livres ser maior nos machos, estes também estão menos protegidos ao dano oxidativo com relação às fêmeas (Vina, Borras, *et al.*, 2006). Pode-se encontrar glutathione em sua forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado de oxidorredução (referente à toxicidade) dos sistemas biológicos. Em situações normais, a GSSG representa apenas uma pequena fração da glutathione total (tGSH). No entanto, após ser oxidada, a GSSG pode ser reduzida novamente por ação da enzima glutathione redutase (GR) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Neste estudo, apenas a tGSH foi dosada. Quando comparamos os nossos resultados de glutathione total com os resultados encontrados pelo nosso grupo no cérebro de ratos machos, percebemos uma maior concentração desta no cérebro de fêmeas não reprodutoras aos 3 e 12 meses e de fêmeas reprodutoras de 12 e 24 meses de idade (Tabela 2).

**Tabela 2:** Valores de glutathione total de fêmeas e machos não reprodutores e reprodutores nas idades de 3, 6, 12 e 24 meses.

Idade	Não reprodutor		Reprodutor	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
3	6,4 ± 1,6 *	2,5 ± 1,05	18,2 ± 6,7	6,8 ± 0,84
6	12,7 ± 2,1	3,1 ± 0,26	15,1 ± 3,2	4,2 ± 0,41
12	24,1 ± 3,3 *	5,0 ± 0,60	19,0 ± 3,8 *	15,1 ± 1,03
24	32,4 ± 5,7	6,6 ± 0,81	46,5 ± 9,4 *	1,06 ± 0,11

\* Indica diferença significativa entre fêmeas e machos da mesma idade e grupo.  
Foi utilizado o *post hoc* de Bonferroni

Tanto nas mitocôndrias como no citosol, a Vitamina C é utilizada para degradar as EROs. Em pH fisiológico (7,4) a maior parte desta vitamina encontra-se na forma de

ascorbato, forma que atua como antioxidante. Em mamíferos o ascorbato atua como cofator para algumas enzimas, mas também atua como antioxidante de forma direta (Halliwell e Gutteridge, 2007). Ratos, ao contrário de humanos, sintetizam e armazenam Vit. C no fígado (Gupta *et al.*, 1973b). A liberação para a corrente sanguínea ocorre via Transportador de Vitamina C Sódio-dependente (Sodium-dependent Vitamin C Transporter- SVCT1) e a captação pelos órgãos e tecidos periféricos ocorre pelo seu homólogo SVCT2 (Harrison *et al.*, 2010). Lykkesfeldt e Moos (2005) sugeriram que a diminuição dos níveis de Vitamina C pode contribuir ou resultar no processo de envelhecimento (Lykkesfeldt e Moos, 2005). Michels *et al.* (2003) demonstraram uma diminuição drástica nas concentrações de ascorbato e na expressão dos receptores SVCT1 em hepatócitos de ratos velhos (Michels *et al.*, 2003). Ainda, apesar de já ter sido discutido no nosso artigo, um estudo demonstrou uma diminuição na absorção de ascorbato no hipocampo de ratos de onze e vinte e quatro meses quando comparados com ratos de 4 meses de idade (Siqueira *et al.*, 2011). Dessa forma, animais não reprodutores de doze meses apresentaram altos níveis de Vitamina C, com um decréscimo acentuado aos vinte e quatro meses de idade. Pouco se sabe em relação às vias de sinalização que regulam a síntese do ascorbato e do seu transportador, sendo assim, não sabemos a razão deste aumento abrupto aos 12 meses de idade.

O envelhecimento pode ser definido como os efeitos fisiológicos da passagem do tempo, sobre a escala de tempo de vida de um organismo, que termina na morte. Entre os dois pilares da irreversibilidade do tempo e da inevitabilidade da morte, o sistema reprodutivo serve à premissa da propagação da espécie (Handelsman, 2006). De forma geral, nossos resultados demonstram que o investimento reprodutivo é custoso para as fêmeas reprodutoras. Resultados semelhantes foram encontrados por nosso grupo em

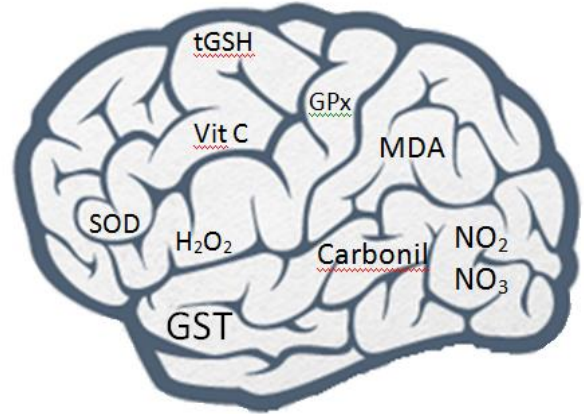
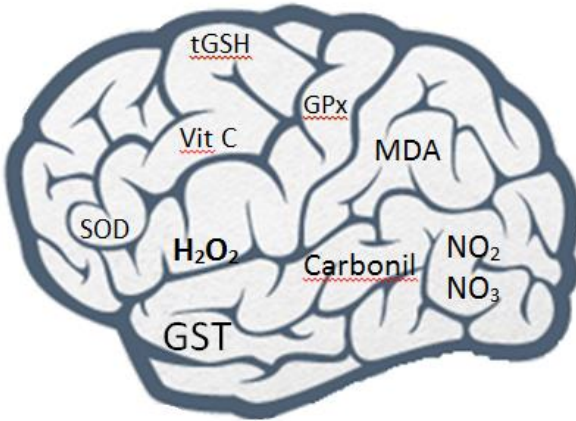


cérebro de ratos machos (Gil Alabarse *et al.*, 2011). Por exemplo, observou-se uma maior atividade das enzimas antioxidantes e um maior dano oxidativo em animais reprodutores de 6 meses, enquanto que em fêmeas este perfil foi observado aos 24 meses de idade. No entanto, em outro trabalho realizado pelo nosso grupo, foi observado um aumento de danos oxidativos em rins de fêmeas não reprodutoras de 6 meses de idade (Da Silva *et al.*, 2013). Estes resultados enfatizam a importância de estudar animais de diferentes idades e sexo, medindo vários marcadores em diferentes tecidos a fim de elucidar os principais efeitos da reprodução nos organismos (Selman, Colin *et al.*, 2012). As figuras 5 e 6 demonstram de forma ilustrativa as alterações que ocorrem no cérebro das fêmeas não reprodutoras e reprodutoras ao longo do envelhecimento.

3 meses

Não Reproutor

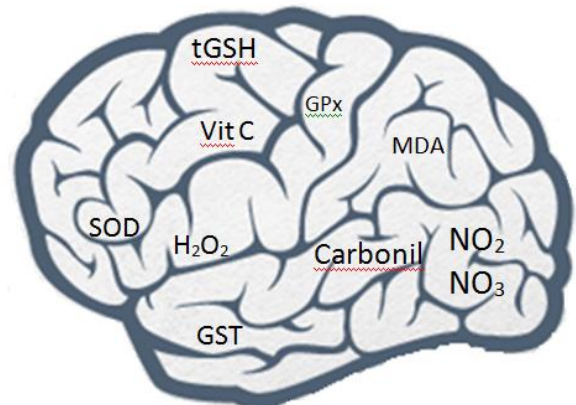
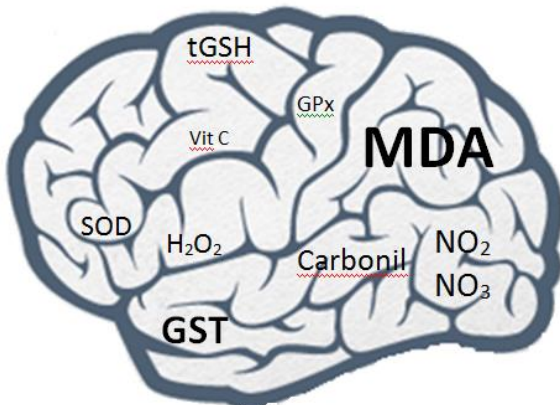
Reprodutor



6 meses

Não Reprodutor

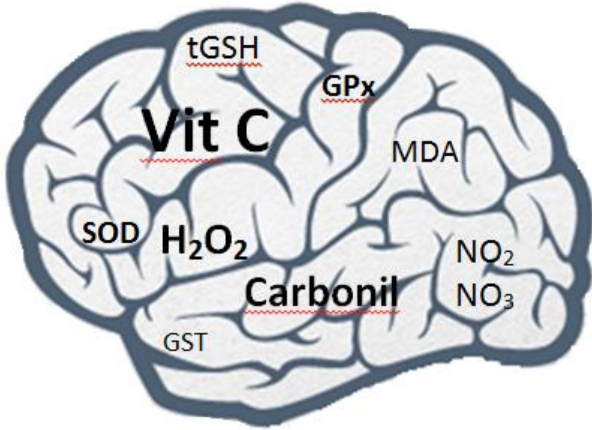
Reprodutor



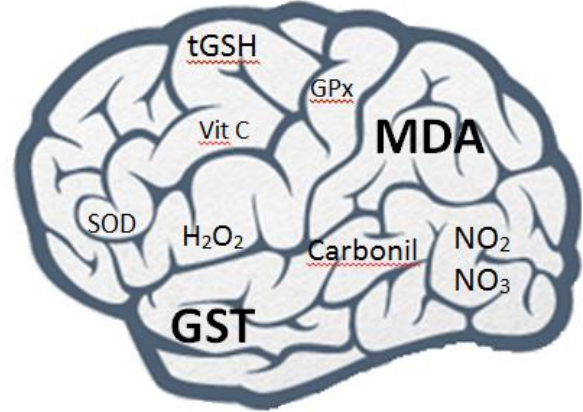
**Fig.5:** Representação esquemática das alterações observadas ao longo do envelhecimento no cérebro de fêmeas não reprodutoras e reprodutoras de 3 e 6 meses respectivamente. Letras maiores indicam aumento de atividade enzimática ou concentração dos marcadores.

12 meses

Não Reprodutor

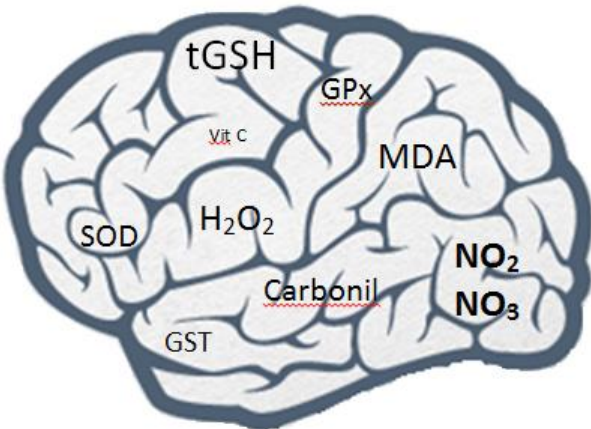


Reprodutor

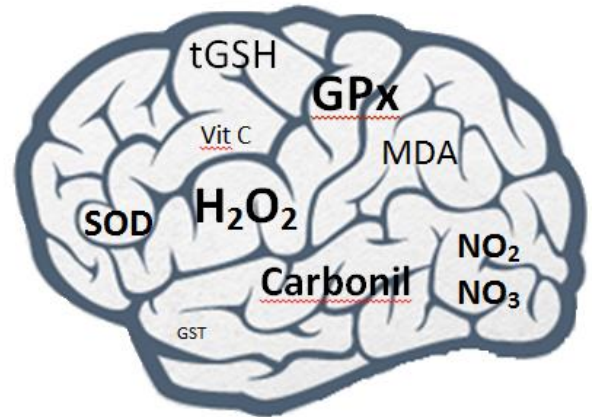


24 meses

Não Reprodutor



Reprodutor



**Fig.6:** Representação esquemática das alterações observadas ao longo do envelhecimento no cérebro de fêmeas não reprodutoras e reprodutoras de 12 e 24 meses respectivamente. Letras maiores indicam aumento de atividade enzimática ou concentração dos marcadores.

## **6. CONCLUSÃO**

Em longo prazo, como pode ser observado nos animais de 24 meses, a atividade reprodutiva causa aumento nos marcadores de dano oxidativo em cérebro de ratas. As alterações nos perfis oxidativos encontradas, apontam o estresse oxidativo como participante tanto do processo de envelhecimento como em relação aos custos da reprodução.

## 7. PERSPECTIVAS

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

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

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. A.; CABELLI, D. E. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 263-274, Feb 2010. ISSN 1570-9639. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274868600003 >.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Method Enzymol** p. 121–126, 1984. ISSN 0076-6879.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, Jul 14 2005. ISSN 1477-7827. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231982800001 >.

AKSAKAL, E. et al. Relationship between Oxidative Stress and Cardiomyopathic Changes in Ovariectomized Rats. **Cardiology**, v. 119, n. 4, p. 235-241, 2011 2011. ISSN 0008-6312. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297407500010 >.

AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, Oct 2010. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282350200013 >.

ALONSO-ALVAREZ, C. et al. An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. **Evolution**, v. 60, n. 9, p. 1913-1924, Sep 2006. ISSN 0014-3820. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241226800016 >.

ALONSO-ALVAREZ, C. et al. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. **Ecology Letters**, v. 7, n. 5, p. 363-368, May 2004. ISSN 1461-023X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221011000001 >.

ALONSO-ALVAREZ, C. et al. Age and Breeding Effort as Sources of Individual Variability in Oxidative Stress Markers in a Bird Species. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 83, n. 1, p. 110-118, Jan-Feb 2010. ISSN 1522-2152. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272845800010 >.

ALONSO-ALVAREZ, C.; VELANDO, A. Benefits and costs of parental care. **The evolution of parental care.**, p. 40-61, 2012 2012. Disponível em: <<Go to ISI>://ZOOPEC:ZOOR14902009281 >.

ALONSO, A. et al. Chronic estradiol treatment improves brain homeostasis during aging in female rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 57-72, Jan 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251797500010 >.

ANTUNES, F.; HAN, D.; CADENAS, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. **Free Radical Biology and**

**Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1260-1267, Nov 1 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178729000011 >.

ARCHER, C. R. et al. OXIDATIVE STRESS AND THE EVOLUTION OF SEX DIFFERENCES IN LIFE SPAN AND AGEING IN THE DECORATED CRICKET, *GRYLLODES SIGILLATUS*. **Evolution**, v. 67, n. 3, p. 620-634, Mar 2013. ISSN 0014-3820. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315894800002 >.

AURORI, C. M. et al. What Is the Main Driver of Ageing in Long-Lived Winter Honeybees: Antioxidant Enzymes, Innate Immunity, or Vitellogenin? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 69, n. 6, p. 633-639, Jun 2014. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000337128500002 >.

BALDERESCHI, M. et al. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study - Two-fold higher incidence in men. **Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1358-1363, Nov 14 2000. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165282000021 >.

BAO, L. et al. Mitochondria Are the Source of Hydrogen Peroxide for Dynamic Brain-Cell Signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 28, p. 9002-9010, Jul 15 2009. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268018000015 >.

BECKMAN, J. S. Nitric oxide, and superoxide versus nitroxyl anion in nitritative and nitrosative stress. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 224, p. U382-U382, Aug 18 2002. ISSN 0065-7727. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177422201877 >.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 2, p. 547-581, Apr 1998. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073078200008 >.

BENNETT, N. C.; FAULKES, C. G.; JARVIS, J. **African Mole-Rats - Ecology and Eusociality**. 1. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 267 ISBN 978-0521018654.

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

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

BLOUNT, J. D.; HOUSTON, D. C.; MOLLER, A. P. Why egg yolk is yellow. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 2, p. 47-49, Feb 2000. ISSN 0169-5347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085525200005 >.

BLOUNT, J. D. et al. Oxidative shielding and the cost of reproduction. **Biological Reviews**, 2015.

BORRAS, C. et al. 17 beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2( MAPK )/NF kappa B cascade. **Ageing Cell**, v. 4, n. 3, p. 113-118, Jun 2005. ISSN 1474-9718. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229368500001 >.

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

BORRAS, C.; GAMBINI, J.; VINA, J. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1008-1013, Jan 2007. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243745000077 >.

BORRAS, C. et al. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 546-552, Mar 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181355400006 >.

BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976a. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

\_\_\_\_\_. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, 1976 1976b. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

BRANN, D. W. et al. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. **Steroids**, v. 72, n. 5, p. 381-405, May 2007. ISSN 0039-128X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246604100001 >.

BREUSING, N. et al. Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 11-12, p. 748-753, Nov-Dec 2009. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273864900005 >.

CAITO, S. et al. SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. **Faseb Journal**, v. 24, n. 9, p. 3145-3159, Sep 2010. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281446400005 >.



CAKATAY, U. et al. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 51-55, Feb 2003. ISSN 0009-9120. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180795300009 > .

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 766-775, Oct 2007. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249583400013 > .

CASAGRANDE, S. et al. Variation of a carotenoid-based trait in relation to oxidative stress and endocrine status during the breeding season in the Eurasian kestrel: A multi-factorial study. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, n. 1, p. 16-26, Sep 2011. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293486200003 > .

CENTONZE, D. et al. Dopamine, acetylcholine and nitric oxide systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity. **Reviews in the Neurosciences**, v. 14, n. 3, p. 207-216, 2003 2003. ISSN 0334-1763. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185375900001 > .

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. HYDROPEROXIDE METABOLISM IN MAMMALIAN ORGANS. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979 1979. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1979HE85200002 > .

CHANDRA, G. et al. Effect of Vitamin E and Zinc Supplementation on Energy Metabolites, Lipid Peroxidation, and Milk Production in Peripartum Sahiwal Cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1569-1576, Nov 2013. ISSN 1011-2367. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000327230300009 > .

CHATTERJEE, I. B. et al. SYNTHESIS AND SOME MAJOR FUNCTIONS OF VITAMIN-C IN ANIMALS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 258, n. SEP30, p. 24-47, 1975 1975. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1975BE34100003 > .

CHUNG, K. K. K.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nitric oxide, S-nitrosylation and neurodegeneration. **Cellular and Molecular Biology**, v. 51, n. 3, p. 247-254, 2005 2005. ISSN 0145-5680. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236938600002 > .

CLUTTON-BROCK, T. H. **The Evolution of Parental Care**. Journal of Evolutionary Biology: Christophe Boesch: 352 p. 1991.

CLUTTON-BROCK, T. H. **The Evolution of Parental Care**. 1991.

COLOM, B. et al. Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative damage. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 3, p. 456-465, Jun 1 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247160200016 > .

CONTESTABILE, A. Role of Nitric Oxide in Cerebellar Development and Function: Focus on Granule Neurons. **Cerebellum**, v. 11, n. 1, p. 50-61, Mar 2012. ISSN 1473-4222. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302087500006 >.

COOPER, C. E. et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 280-285, Apr 2002. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175499900052 >.

COSTANTINI, D. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. **Ecology Letters**, v. 11, n. 11, p. 1238-1251, Nov 2008. ISSN 1461-023X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260466400012 >.

\_\_\_\_\_. **Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology**. 1. Springer: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. 348 ISBN 978-3-642-54663-1.

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

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 169-176, Apr 2003. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182911700007 >.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, Mar 2003. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181662500003 >.

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504-511, Aug 2011. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292825400010 >.

DKHAR, P.; SHARMA, R. Amelioration of age-dependent increase in protein carbonyls of cerebral hemispheres of mice by melatonin and ascorbic acid. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 7, p. 996-1002, Dec 2011. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298462800003 >.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1737-1745, May 22 2009. ISSN 0962-8452. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264936500001 >.

EHRENBRINK, G. et al. Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 4, p. 368-371, Apr 2006. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237889900004 >.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 1, p. 7-15, Jul 11 2011. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292768200003 >.

FISHER-WELLMAN, K.; BELL, H. K.; BLOOMER, R. J. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 1, p. 43-51, Jan-Mar 2009. ISSN 1942-0900. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271898200008 >.

FLETCHER, Q. E. et al. OXIDATIVE DAMAGE INCREASES WITH REPRODUCTIVE ENERGY EXPENDITURE AND IS REDUCED BY FOOD-SUPPLEMENTATION. **Evolution**, v. 67, n. 5, p. 1527-1536, May 2013. ISSN 0014-3820. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000318234900024 >.

GARCIA-SEGURA, L. M.; AZCOITIA, I.; DONCARLOS, L. L. Neuroprotection by estradiol. **Progress in Neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 29-60, Jan 2001. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165319300003 >.

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

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

GERSCHMAN, R. et al. OXYGEN POISONING AND X-IRRADIATION - A MECHANISM IN COMMON. **Science**, v. 119, n. 3097, p. 623-626, 1954 1954. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1954UA93100002 >.

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

GOMBERG, M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 22, p. 757-771, 1900.

GONZALEZ, M. et al. Distribution patterns of estrogen receptor alpha and beta in the human cortex and hippocampus during development and adulthood. **Journal of Comparative Neurology**,

v. 503, n. 6, p. 790-802, Aug 20 2007. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248095000005 >.

GOROSITO, S. V.; LORENZO, A. G.; CAMBIASSO, M. J. Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1173-1177, Jul 17 2008. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257677900002 >.

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

GUEVARA, R. et al. Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 2, p. 169-175, Jan 15 2009. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262491000007 >.

GUPTA, S. et al. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: A systematic review. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 62, n. 5, p. 335-347, May 2007. ISSN 0029-7828. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246116700005 >.

GUPTA, S. D.; CHOUDHUR.PK; CHATTERJ.IB. SYNTHESIS OF L-ASCORBIC-ACID FROM D-GLUCURONO-1,4-LACTONE CONJUGATES BY DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS. **International Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 21, p. 309-314, 1973 1973a. ISSN 0020-711X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1973Q497400012 >.

\_\_\_\_\_. SYNTHESIS OF L-ASCORBIC-ACID FROM D-GLUCURONO-1,4-LACTONE CONJUGATES BY DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS. **International Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 21, 1973 1973b. ISSN 0020-711X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1973Q497400012 >.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. ELSEVIER, 2011. ISBN 978-1416045748

HACKENHAAR, F. S. et al. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 6, p. 378-382, Aug 2009. ISSN 0263-6484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269384800008 >.

HAIDER, S. et al. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. **Age**, v. 36, n. 3, p. 1291-1302, Jun 2014. ISSN 0161-9152. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342142300021 >.

HALIFEOGLU, I. et al. Investigation of antioxidant vitamins (A, E and C) and selenium levels in chickens receiving estrogen or testosterone. **Cell Biochemistry and Function**, v. 21, n. 2, p. 133-136, Jun 2003. ISSN 0263-6484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182951700006 >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. In: OXFORD (Ed.). **Free Radicals in Biology and Medicine**: Oxford University Press, v.4th, 2007. p.888.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**

4th. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HAMMOND, K. A. Adaptation of the Maternal Intestine During Lactation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 2, n. 3, p. 243-252, Jul 1997. ISSN 1083-3021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000208468600004 >.

HANDELSMAN, D. J. **Aging in the Hypothalamic– Pituitary–Testicular Axis**. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. NEILL, J. D. Science direct Elsevier 3: 3296 p. 2006.

HARMAN, D. AGING - A THEORY BASED ON FREE-RADICAL AND RADIATION-CHEMISTRY. **Journals of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956 1956. ISSN 0022-1422. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1956CHD5000009 >.

HAROUTUNIAN, V. et al. Role of the neuropathology of Alzheimer disease in dementia in the oldest-old. **Archives of Neurology**, v. 65, n. 9, p. 1211-1217, Sep 2008. ISSN 0003-9942. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259030700011 >.

HARRISON, F. E. et al. Low vitamin C and increased oxidative stress and cell death in mice that lack the sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 5, p. 821-829, Sep 1 2010. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280745900015 >.

HARRISON, F. E.; MAY, J. M. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 6, p. 719-730, Mar 15 2009. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264061400003 >.

HENDERSON, V. W. Action of estrogens in the aging brain: Dementia and cognitive aging. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1800, n. 10, p. 1077-1083, Oct 2010. ISSN 0304-4165. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281932800006 >.

ISAKSSON, C.; SHELDON, B. C.; ULLER, T. The Challenges of Integrating Oxidative Stress into Life-history Biology. **Bioscience**, v. 61, n. 3, p. 194-202, Mar 2011. ISSN 0006-3568. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288049600005 >.

JOMOVA, K. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 345, n. 1-2, p. 91-104, Dec 2010. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284907100011 > .

JONES, O. R. et al. Diversity of ageing across the tree of life. **Nature**, v. 505, n. 7482, p. 169+, Jan 9 2014. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000329441500029 > .

JUSTO, R. et al. Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. **Life Sciences**, v. 76, n. 10, p. 1147-1158, Jan 21 2005. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226228200007 > .

KADIISKA, M. B. et al. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl4 poisoning. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 6, p. 711-718, Mar 15 2005. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227502500003 > .

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

KIRREEV, R. A. et al. Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens, and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. **Biogerontology**, v. 8, n. 5, p. 469-482, Oct 2007. ISSN 1389-5729. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249208100002 > .

KIRKWOOD, T. B. L.; AUSTAD, S. N. Why do we age? **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 233-238, Nov 9 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165180400053 > .

KIRKWOOD, T. B. L. et al. What accounts for the wide variation in life span of genetically identical organisms reared in a constant environment? **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 3, p. 439-443, Mar 2005. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226945100010 > .

KIRKWOOD, T. B. L.; KOWALD, A. The free-radical theory of ageing - older, wiser and still alive Modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. **Bioessays**, v. 34, n. 8, p. 692-700, Aug 2012. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306313000016 > .

KOBAYASHI, J. et al. Current topics in DNA double-strand break repair. **Journal of Radiation Research**, v. 49, n. 2, p. 93-103, Mar 2008. ISSN 0449-3060. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255849900001 > .

KRINKE, G. J. **The Handbook of Experimental Animals: the laboratory rat**. New York: Academic Press: 2000. 756 ISBN 012426400X.

KUMAR, P. et al. Protective effects of 17 beta estradiol on altered age related neuronal parameters in female rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 502, n. 1, p. 56-60, Sep 2011. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295345800013 >.

LEVINE, R. L. et al. DETERMINATION OF CARBONYL CONTENT IN OXIDATIVELY MODIFIED PROTEINS. **Methods in Enzymology**, v. 186, 1990 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990MC42000049 >.

LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1495-1502, Sep 2001. ISSN 0531-5565. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000171580700006 >.

LEWIS, R. S.; DEEN, W. M. KINETICS OF THE REACTION OF NITRIC-OXIDE WITH OXYGEN IN AQUEOUS-SOLUTIONS. **Chemical Research in Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 568-574, Jul-Aug 1994. ISSN 0893-228X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994NX67300013 >.

LOSDAT, S. et al. Reproductive effort transiently reduces antioxidant capacity in a wild bird. **Behavioral Ecology**, v. 22, n. 6, p. 1218-1226, Nov-Dec 2011. ISSN 1045-2249. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296295000019 >.

LYUESFELDT, J.; MOOS, T. Age-dependent change in Vitamin C status: A phenomenon of maturation rather than of ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 8, p. 892-898, Aug 2005. ISSN 0047-6374. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230683300008 >.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, November 2002. ISSN 1519-6984. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD200300084430 >.

MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 827, n. 1, p. 65-75, Nov 15 2005. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233327100010 >.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577-586, Oct 2005. ISSN 0955-2863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232620400001 >.

MATSUMOTO, M.; IMAGAWA, M.; AOKI, Y. Epidermal growth factor regulation of glutathione S-transferase gene expression in the rat is mediated by class Pi glutathione S-transferase enhancer I. **Biochemical Journal**, v. 349, p. 225-230, Jul 1 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088147100029 >.

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

MCEWEN, B. Estrogen actions throughout the brain. **Recent Progress in Hormone Research, Vol 57**, v. 57, p. 357-384, 2002 2002. ISSN 0079-9963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179991300017 >.

MCLEAN, A. C. et al. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. **Jove-Journal of Visualized Experiments**, n. 67, Sep 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000209225500045 >.

MERMELSTEIN, P. G.; MICEVYCH, P. E. Nervous System Physiology Regulated by Membrane Estrogen Receptors. **Reviews in the Neurosciences**, v. 19, n. 6, p. 413-424, 2008 2008. ISSN 0334-1763. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263587400003 >.

METCALFE, N. B.; ALONSO-ALVAREZ, C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 984-996, Oct 2010. ISSN 0269-8463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281895800005 >.

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

MICHALKOVA, V. et al. Amelioration of Reproduction-Associated Oxidative Stress in a Viviparous Insect Is Critical to Prevent Reproductive Senescence. **Plos One**, v. 9, n. 4, Apr 24 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000335505000002 >.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochemical Journal**, v. 404, p. 1-13, May 15 2007. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246547300001 >.

MICHELS, A. J.; JOISHER, N.; HAGEN, T. M. Age-related decline of sodium-dependent ascorbic acid transport in isolated rat hepatocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 1, p. 112-120, Feb 1 2003. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180783600013 >.



MILES, D. B. et al. Relating endocrinology, physiology and behaviour using species with alternative mating strategies. **Functional Ecology**, v. 21, n. 4, p. 653-665, Aug 2007. ISSN 0269-8463. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247905700005 >.

MONAGHAN, P.; METCALFE, N. B.; TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecology Letters**, v. 12, n. 1, p. 75-92, Jan 2009. ISSN 1461-023X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261625500010 >.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. NITRIC-OXIDE - PHYSIOLOGY, PATHOPHYSIOLOGY, AND PHARMACOLOGY. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, Jun 1991. ISSN 0031-6997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991FU76700001 >.

MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 28, p. 3331-3346, Oct 15 2009. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270483800008 >.

MORAN, J. et al. 17 beta-Estradiol and genistein acute treatments improve some cerebral cortex homeostasis aspects deteriorated by aging in female rats. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 4, p. 414-421, Apr 2013. ISSN 0531-5565. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316669600007 >.

MORRIS, B. J. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 56, p. 133-171, Mar 2013. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000319647700013 >.

MOURIEC, K. et al. Early Regulation of Brain Aromatase (cyp19a1b) by Estrogen Receptors During Zebrafish Development. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 10, p. 2641-2651, Oct 2009. ISSN 1058-8388. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270769300018 >.

MULLER, F. L. et al. Trends in oxidative aging theories. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 4, p. 477-503, Aug 15 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248404200001 >.

MURPHY, M. P. et al. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 361-366, Apr 6 2011. ISSN 1550-4131. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000289381300007 >.

MUSCI, G. et al. Nitrosative/oxidative modifications and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 6, p. 544-551, Jun 2006. ISSN 0047-6374. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237915900008 >.

NEELEY, W. L.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 491-505, Apr 2006. ISSN 0893-228X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237001300001 >.

NEUMANN, C. A.; CAO, J.; MANEVICH, Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. **Cell Cycle**, v. 8, n. 24, p. 4072-4078, Dec 15 2009. ISSN 1538-4101. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273232300024 >.

OLDAKOWSKI, L. et al. Is reproduction costly? No increase of oxidative damage in breeding bank voles. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 11, p. 1799-1805, Jun 2012. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303831800010 >.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 2-12, Jan-Feb 2010. ISSN 1942-0900. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274978900002 >.

PELLEGRINI, M. et al. Naringenin modulates skeletal muscle differentiation via estrogen receptor alpha and beta signal pathway regulation. **Genes and Nutrition**, v. 9, n. 5, Sep 2014. ISSN 1555-8932. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342221100010 >.

PENG, C. et al. Biology of Ageing and Role of Dietary Antioxidants. **Biomed Research International**, 2014 2014. ISSN 2314-6133. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334215100001 >.

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

PESKIN, A. V. et al. Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. **Biochemical Journal**, v. 432, p. 313-321, Dec 1 2010. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284813800010 >.

PFUFF, D. W. et al. Estrogens, brain and behavior: studies in fundamental neurobiology and observations related to women's health. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 5, p. 365-373, Nov 30 2000. ISSN 0960-0760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166120300017 >.

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

PIKE, T. W. et al. Dietary carotenoid availability, sexual signalling and functional fertility in sticklebacks. **Biology Letters**, v. 6, n. 2, p. 191-193, Apr 23 2010. ISSN 1744-9561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275432900013 >.

POYNTON, R. A.; HAMPTON, M. B. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 906-912, Feb 2014. ISSN 0304-4165. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330818700020 >.

RASGON, N.; JARVIK, L. Insulin resistance, affective disorders, and Alzheimer's disease: Review and hypothesis. **Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59, n. 2, p. 178-183, Feb 2004. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000189331200014 >.

REMOLINA, S. C.; HUGHES, K. A. Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. **Age**, v. 30, n. 2-3, p. 177-185, Sep 2008. ISSN 0161-9152. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258881300011 >.

REZNICK, D. MEASURING REPRODUCTIVE COSTS - RESPONSE TO PARTRIDGE. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 7, n. 4, p. 134-134, Apr 1992. ISSN 0169-5347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HL42900011 >.

RHEE, S. G. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1882-1883, Jun 30 2006. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238848100033 >.

RHEE, S. G.; WOO, H. A. Multiple Functions of Peroxiredoxins: Peroxidases, Sensors and Regulators of the Intracellular Messenger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and Protein Chaperones. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 781-794, Aug 2011. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292446300012 >.

RIZZO, A. et al. Evaluation of blood and milk oxidative status during early postpartum of dairy cows. **Animal**, v. 7, n. 1, p. 118-123, Jan 2013. ISSN 1751-7311. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313218200013 >.

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

RODRIGUEZ-CUENCA, S. et al. Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 42958-42963, Nov 8 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179081200070 >.

RYTER, S. W.; PACIFICI, R. E.; DAVIES, K. J. A. **Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress.** *Biological Oxidation Systems*: Academic Press. 2: 929-952 p. 1990.

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

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 172-188, Jan 2008. ISSN 0893-228X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252585200016 >.

SCHAEFF, C. et al. Increased Anaplerosis, TCA Cycling, and Oxidative Phosphorylation in the Liver of Dairy Cows with Intensive Body Fat Mobilization during Early Lactation. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 11, p. 5503-5514, Nov 2012. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000311190600033 >.

SCHAUB, C. E. et al. Development of ER-alpha and ER-beta expression in the developing ovine brain and pituitary. **Gene Expression Patterns**, v. 8, n. 6, p. 457-463, Jul 2008. ISSN 1567-133X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258313600014 >.

SCHMIDT, C. M.; BLOUNT, J. D.; BENNETT, N. C. Reproduction Is Associated with a Tissue-Dependent Reduction of Oxidative Stress in Eusocial Female Damaraland Mole-Rats (*Fukomys damarensis*). **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 7, Jul 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000339993700055 >.

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

SCHREMPF, A.; CREMER, S.; HEINZE, J. Social influence on age and reproduction: reduced lifespan and fecundity in multi-queen ant colonies. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, n. 7, p. 1455-1461, Jul 2011. ISSN 1010-061X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292698700007 >.

SELMAN, C. et al. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? **Trends Ecol Evol**, v. 27, n. 10, p. 570-7, Oct 2012. ISSN 1872-8383 (Electronic)

0169-5347 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789512> >.

SELMAN, C. et al. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 10, p. 570-577, Oct 2012. ISSN 0169-5347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312055500006 >.

SHARMA, P. K.; THAKUR, M. K. Expression of estrogen receptor (ER) alpha and beta in mouse cerebral cortex: Effect of age, sex and gonadal steroids. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 6, p. 880-887, Jun 2006. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237774400012 >.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, p. 1-16, Nov 15 2001. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172466900001 >.

SHERWIN, B. B. Estrogen and cognitive functioning in women. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 2, p. 133-151, Apr 2003. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182279300001 >.

SHULMAN, R. G. et al. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 8, p. 489-495, Aug 2004. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223360800011 >.

SIMPSON, J. E. et al. A neuronal DNA damage response is detected at the earliest stages of Alzheimer's neuropathology and correlates with cognitive impairment in the Medical Research Council's Cognitive Function and Ageing Study ageing brain cohort. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 41, n. 4, p. 483-496, Jun 2015. ISSN 0305-1846. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000354465900009 >.

SIQUEIRA, I. R. et al. Ascorbate uptake is decreased in the hippocampus of ageing rats. **Neurochemistry International**, v. 58, n. 4, p. 527-532, Mar 2011. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288774800012 >.

SIRIVARASAI, J. et al. Association between Inflammatory Marker, Environmental Lead Exposure, and Glutathione S-Transferase Gene. **Biomed Research International**, 2013 2013. ISSN 2314-6133. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314943800001 >.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. CONTROL OF PROGESTERONE SECRETION DURING ESTROUS-CYCLE AND EARLY PSEUDOPREGNANCY IN RAT - PROLACTIN, GONADOTROPIN AND STEROID LEVELS ASSOCIATED WITH RESCUE OF CORPUS-LUTEUM OF PSEUDOPREGNANCY. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, 1975 1975. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1975V132300030 >.

SOLOMON, N. G.; FRENCH, J. A. **Cooperative Breeding in mammals**. Cambridge University Press, 1997.

SPEAKMAN, J. R. The physiological costs of reproduction in small mammals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 363, n. 1490, p. 375-398, Jan 27 2008. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252317600011 >.

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

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **Anatomical Record**, v. 254, n. 1, p. 116-126, Jan 1 1999. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077961600015 >.

STEARNS, S. **The Evolution of Life Histories**. Oxford University Press, Oxford. : 1992. ISBN 9780198577416.

STEARNS, S. C. **Does impressive progress on understanding mechanisms advance life history theory?** Mechanisms of Life History Evolution: The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-Offs. FLATT, T. e HEYLAND, A. Oxford Scholarship Online: Oxford 2011.

STIRONE, C. et al. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, Akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: Rapid and long-term effects. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 105-113, Jan 2005. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225865200013 >.

SURIYASATHAPORN, W. et al. The Indicative Influence of Oxidative Stress on Low Milk Yields in Dairy Cattle. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 3, p. 237-243, Sep 2009. ISSN 0125-6491. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271541400006 >.

THOMAS, F. H. et al. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 487-495, Sep 2001. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170834700016 >.

TSAY, H. J. et al. Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 6, p. 466-474, Nov-Dec 2000. ISSN 1021-7770. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165276200004 >.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241963000007 >.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235988200001 >.

VALLE, A. et al. Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 4, p. C1302-C1308, Oct 2007. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250052400012 >.

VAN RAAMSDONK, J. M.; HEKIMI, S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 15, p. 5785-5790, Apr 10 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302533500049 >.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO, ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANOS

OXIDATIVO EM SANGUE HUMANO: PRINCIPAIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SUA DETERMINAÇÃO. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELANDO, A.; TORRES, R.; ALONSO-ALVAREZ, C. Avoiding bad genes: oxidatively damaged DNA in germ line and mate choice. **Bioessays**, v. 30, n. 11-12, p. 1212-1219, Nov-Dec 2008. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260912800020 >.

VINA, J. et al. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. **Febs Letters**, v. 579, n. 12, May 9 2005. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229051600001 >.

VINA, J. et al. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression - Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, Feb 2006. ISSN 1071-5762. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234385600001 >.

VINA, J. et al. Females Live Longer than Males: Role of Oxidative Stress. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 36, p. 3959-3965, Dec 2011. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000299640300003 >.

VINA, J. et al. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. **Free Radical Research**, v. 40, n. 12, p. 1359-1365, Dec 2006a. ISSN 1071-5762. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241848100016 >.

\_\_\_\_\_. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. **Free Radical Research**, v. 40, n. 12, Dec 2006b. ISSN 1071-5762. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241848100016 >.

VOET, D., VOET, G, PRATT, C.W. **Fundamentals of Biochemistry** WILKINS, W. A. 2001.

WANG, J. Y.; SHUM, A. Y. C.; HO, Y. J. Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. **Journal of Neuroscience Research**, v. 72, n. 4, p. 508-519, May 15 2003. ISSN 0360-4012. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182631000009 >.

WEINERT, B. T.; TIMIRAS, P. S. Theories of aging. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 4, p. 1706-1716, Oct 2003. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185386800047 >.

WHO. World Health Organization

<http://www.who.int/en/>, 2011.

WIERSMA, P. et al. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 271, p. S360-S363, Aug 7 2004. ISSN 0962-8452. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223099800032 >.

WILSON, S. M. et al. Oxidative Stress in Pacific Salmon (*Oncorhynchus* spp.) during Spawning Migration. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 87, n. 2, p. 346-352, Mar 1 2014. ISSN 1522-2152. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000332923400015 >.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 278 - 286, 2008.

WONG, P. S. Y. et al. Inactivation of glutathione S-transferases by nitric oxide-derived oxidants: Exploring a role for tyrosine nitration. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 394, n. 2, p. 216-228, Oct 15 2001. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000171820900012 >.

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

YAGUE, J. G. et al. Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. **Brain Research**, v. 1209, p. 115-127, May 13 2008. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256144800013 >.

YAMADA, S. et al. Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor alpha-immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain. **Neuroscience Letters**, v. 463, n. 2, p. 135-139, Oct 2 2009. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269808700007 >.



YANG, D. B. et al. Effects of reproduction on immuno-suppression and oxidative damage, and hence support or otherwise for their roles as mechanisms underpinning life history trade-offs, are tissue and assay dependent. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 22, p. 4242-4250, Nov 2013. ISSN 0022-0949. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000326499900018 >.

ZHANG, Q.-G. et al. Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1-2, p. 84-91, May 25 2014. ISSN 0303-7207. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337881700012 >.

ABREU, I. A.; CABELLI, D. E. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 263-274, Feb 2010. ISSN 1570-9639. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274868600003 >.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Method Enzymol** p. 121–126, 1984. ISSN 0076-6879.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, Jul 14 2005. ISSN 1477-7827. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231982800001 >.

AKSAKAL, E. et al. Relationship between Oxidative Stress and Cardiomyopathic Changes in Ovariectomized Rats. **Cardiology**, v. 119, n. 4, p. 235-241, 2011 2011. ISSN 0008-6312. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297407500010 >.

AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, Oct 2010. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282350200013 >.

ALONSO-ALVAREZ, C. et al. An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. **Evolution**, v. 60, n. 9, p. 1913-1924, Sep 2006. ISSN 0014-3820. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241226800016 >.

ALONSO-ALVAREZ, C. et al. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. **Ecology Letters**, v. 7, n. 5, p. 363-368, May 2004. ISSN 1461-023X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221011000001 >.

ALONSO-ALVAREZ, C. et al. Age and Breeding Effort as Sources of Individual Variability in Oxidative Stress Markers in a Bird Species. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 83, n. 1, p. 110-118, Jan-Feb 2010. ISSN 1522-2152. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272845800010 >.

ALONSO-ALVAREZ, C.; VELANDO, A. Benefits and costs of parental care. **The evolution of parental care.**, p. 40-61, 2012 2012. Disponível em: <<Go to ISI>://ZOOREC:ZOOR14902009281 >.

ALONSO, A. et al. Chronic estradiol treatment improves brain homeostasis during aging in female rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 57-72, Jan 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251797500010 >.

ANTUNES, F.; HAN, D.; CADENAS, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1260-1267, Nov 1 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000178729000011 >.

ARCHER, C. R. et al. OXIDATIVE STRESS AND THE EVOLUTION OF SEX DIFFERENCES IN LIFE SPAN AND AGEING IN THE DECORATED CRICKET, GRYLLODES SIGILLATUS. **Evolution**, v. 67, n. 3, p. 620-634, Mar 2013. ISSN 0014-3820. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315894800002 >.

AURORI, C. M. et al. What Is the Main Driver of Ageing in Long-Lived Winter Honeybees: Antioxidant Enzymes, Innate Immunity, or Vitellogenin? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 69, n. 6, p. 633-639, Jun 2014. ISSN 1079-5006. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337128500002 >.

BALDERESCHI, M. et al. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study - Two-fold higher incidence in men. **Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1358-1363, Nov 14 2000. ISSN 0028-3878. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165282000021 >.

BAO, L. et al. Mitochondria Are the Source of Hydrogen Peroxide for Dynamic Brain-Cell Signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 28, p. 9002-9010, Jul 15 2009. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268018000015 >.

BENNETT, N. C.; FAULKES, C. G.; JARVIS, J. **African Mole-Rats - Ecology and Eusociality**. 1. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 267 ISBN 978-0521018654.

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

BLOUNT, J. D.; HOUSTON, D. C.; MOLLER, A. P. Why egg yolk is yellow. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 2, p. 47-49, Feb 2000. ISSN 0169-5347. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000085525200005 >.

BLOUNT, J. D. et al. Oxidative shielding and the cost of reproduction. **Biological Reviews**, 2015.

BORRAS, C. et al. 17 beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2( MAPK )/NF kappa B cascade. **Ageing Cell**, v. 4, n. 3, p. 113-118, Jun 2005. ISSN 1474-9718. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229368500001 >.

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

BORRAS, C.; GAMBINI, J.; VINA, J. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1008-1013, Jan 2007. ISSN 1093-9946. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243745000077 >.

BORRAS, C. et al. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 546-552, Mar 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181355400006 >.

BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, 1976 1976a. ISSN 0003-2697. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

BREUSING, N. et al. Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 11-12, p. 748-753, Nov-Dec 2009. ISSN 0047-6374. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273864900005 >.

CAITO, S. et al. SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. **Faseb Journal**, v. 24, n. 9, p. 3145-3159, Sep 2010. ISSN 0892-6638. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000281446400005 >.

CAKATAY, U. et al. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 51-55, Feb 2003. ISSN 0009-9120. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180795300009 >.

CASAGRANDE, S. et al. Variation of a carotenoid-based trait in relation to oxidative stress and endocrine status during the breeding season in the Eurasian kestrel: A multi-factorial study. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, n. 1, p. 16-26, Sep 2011. ISSN 1095-6433. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293486200003 >.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. HYDROPEROXIDE METABOLISM IN MAMMALIAN ORGANS. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979 1979. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1979HE85200002 >.

CHANDRA, G. et al. Effect of Vitamin E and Zinc Supplementation on Energy Metabolites, Lipid Peroxidation, and Milk Production in Peripartum Sahiwal Cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1569-1576, Nov 2013. ISSN 1011-2367. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327230300009 >.

CLUTTON-BROCK, T. H. **The Evolution of Parental Care**. Journal of Evolutionary Biology: Christophe Boesch: 352 p. 1991.

CLUTTON-BROCK, T. H. **The Evolution of Parental Care**. 1991.

COLOM, B. et al. Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative damage. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 3, p. 456-465, Jun 1 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247160200016 >.

COOPER, C. E. et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 280-285, Apr 2002. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175499900052 >.

COSTANTINI, D. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. **Ecology Letters**, v. 11, n. 11, p. 1238-1251, Nov 2008. ISSN 1461-023X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260466400012 >.

\_\_\_\_\_. **Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology**. 1. Springer: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. 348 ISBN 978-3-642-54663-1.

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

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 169-176, Apr 2003. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182911700007 >.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, Mar 2003. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181662500003 >.

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504-511, Aug 2011. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292825400010 >.

DKHAR, P.; SHARMA, R. Amelioration of age-dependent increase in protein carbonyls of cerebral hemispheres of mice by melatonin and ascorbic acid. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 7, p. 996-1002, Dec 2011. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298462800003 >.

EHRENBRINK, G. et al. Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 4, p. 368-371, Apr 2006. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237889900004 >.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 1, p. 7-15, Jul 11 2011. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292768200003 >.

FLETCHER, Q. E. et al. OXIDATIVE DAMAGE INCREASES WITH REPRODUCTIVE ENERGY EXPENDITURE AND IS REDUCED BY FOOD-SUPPLEMENTATION. **Evolution**, v. 67, n. 5, p. 1527-1536, May 2013. ISSN 0014-3820. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000318234900024 >.

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

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

GERSCHMAN, R. et al. OXYGEN POISONING AND X-IRRADIATION - A MECHANISM IN COMMON. **Science**, v. 119, n. 3097, p. 623-626, 1954 1954. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1954UA93100002 >.

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

GOMBERG, M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 22, p. 757-771, 1900.

GONZALEZ, M. et al. Distribution patterns of estrogen receptor alpha and beta in the human cortex and hippocampus during development and adulthood. **Journal of Comparative Neurology**, v. 503, n. 6, p. 790-802, Aug 20 2007. ISSN 0021-9967. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248095000005 >.

GOROSITO, S. V.; LORENZO, A. G.; CAMBIASSO, M. J. Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1173-1177, Jul 17 2008. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257677900002 >.

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

GUEVARA, R. et al. Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 2, p. 169-175, Jan 15 2009. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262491000007 >.

GUPTA, S. et al. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: A systematic review. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 62, n. 5, p. 335-347, May 2007. ISSN 0029-7828. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246116700005 >.

GUPTA, S. D.; CHOUDHUR.PK; CHATTERJ.IB. SYNTHESIS OF L-ASCORBIC-ACID FROM D-GLUCURONO-1,4-LACTONE CONJUGATES BY DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS. **International Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 21, 1973 1973. ISSN 0020-711X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1973Q497400012 >.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. ELSEVIER, 2011. ISBN 978-1416045748

HACKENHAAR, F. S. et al. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 6, p. 378-382, Aug 2009. ISSN 0263-6484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269384800008 >.

HAIDER, S. et al. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. **Age**, v. 36, n. 3, p. 1291-1302, Jun 2014. ISSN 0161-9152. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342142300021 >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. In: OXFORD (Ed.). **Free Radicals in Biology and Medicine**: Oxford University Press, v.4th, 2007. p.888.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**

4th. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HAMMOND, K. A. Adaptation of the Maternal Intestine During Lactation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 2, n. 3, p. 243-252, Jul 1997. ISSN 1083-3021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000208468600004 >.

HANDELSMAN, D. J. **Aging in the Hypothalamic– Pituitary–Testicular Axis**. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. NEILL, J. D. Science direct Elsevier 3: 3296 p. 2006.

HARMAN, D. AGING - A THEORY BASED ON FREE-RADICAL AND RADIATION-CHEMISTRY. **Journals of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956 1956. ISSN 0022-1422. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1956CHD5000009 >.

HAROUTUNIAN, V. et al. Role of the neuropathology of Alzheimer disease in dementia in the oldest-old. **Archives of Neurology**, v. 65, n. 9, p. 1211-1217, Sep 2008. ISSN 0003-9942. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259030700011 >.

HARRISON, F. E. et al. Low vitamin C and increased oxidative stress and cell death in mice that lack the sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 5, p. 821-829, Sep 1 2010. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280745900015 >.

JOMOVA, K. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 345, n. 1-2, p. 91-104, Dec 2010. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284907100011 >.

JONES, O. R. et al. Diversity of ageing across the tree of life. **Nature**, v. 505, n. 7482, p. 169+, Jan 9 2014. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000329441500029 >.

JUSTO, R. et al. Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. **Life Sciences**, v. 76, n. 10, p. 1147-1158, Jan 21 2005. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226228200007 >.

KADIISKA, M. B. et al. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl4 poisoning. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 6, p. 711-718, Mar 15 2005. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227502500003 >.

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

KIREEV, R. A. et al. Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens, and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. **Biogerontology**, v. 8, n. 5, p. 469-482, Oct 2007. ISSN 1389-5729. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249208100002 >.

KIRKWOOD, T. B. L.; AUSTAD, S. N. Why do we age? **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 233-238, Nov 9 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165180400053 >.

KIRKWOOD, T. B. L. et al. What accounts for the wide variation in life span of genetically identical organisms reared in a constant environment? **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 3, p. 439-443, Mar 2005. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226945100010 >.

KIRKWOOD, T. B. L.; KOWALD, A. The free-radical theory of ageing - older, wiser and still alive Modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. **Bioessays**, v. 34, n. 8, p. 692-700, Aug 2012. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306313000016 >.



KOBAYASHI, J. et al. Current topics in DNA double-strand break repair. **Journal of Radiation Research**, v. 49, n. 2, p. 93-103, Mar 2008. ISSN 0449-3060. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255849900001 >.

KUMAR, P. et al. Protective effects of 17 beta estradiol on altered age related neuronal parameters in female rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 502, n. 1, p. 56-60, Sep 2011. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295345800013 >.

LEVINE, R. L. et al. DETERMINATION OF CARBONYL CONTENT IN OXIDATIVELY MODIFIED PROTEINS. **Methods in Enzymology**, v. 186, 1990 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990MC42000049 >.

LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1495-1502, Sep 2001. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171580700006 >.

LEWIS, R. S.; DEEN, W. M. KINETICS OF THE REACTION OF NITRIC-OXIDE WITH OXYGEN IN AQUEOUS-SOLUTIONS. **Chemical Research in Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 568-574, Jul-Aug 1994. ISSN 0893-228X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NX67300013 >.

LOSDAT, S. et al. Reproductive effort transiently reduces antioxidant capacity in a wild bird. **Behavioral Ecology**, v. 22, n. 6, p. 1218-1226, Nov-Dec 2011. ISSN 1045-2249. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000296295000019 >.

LYUESFELDT, J.; MOOS, T. Age-dependent change in Vitamin C status: A phenomenon of maturation rather than of ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 8, p. 892-898, Aug 2005. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230683300008 >.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, November 2002. ISSN 1519-6984. Disponível em: < <Go to ISI>://BIOABS:BACD200300084430 >.

MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 827, n. 1, p. 65-75, Nov 15 2005. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233327100010 >.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577-586, Oct 2005. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232620400001 >.

MATSUMOTO, M.; IMAGAWA, M.; AOKI, Y. Epidermal growth factor regulation of glutathione S-transferase gene expression in the rat is mediated by class Pi glutathione S-transferase enhancer I. **Biochemical Journal**, v. 349, p. 225-230, Jul 1 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088147100029 >.

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

MCEWEN, B. Estrogen actions throughout the brain. **Recent Progress in Hormone Research, Vol 57**, v. 57, p. 357-384, 2002 2002. ISSN 0079-9963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179991300017 >.

MCLEAN, A. C. et al. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. **Jove-Journal of Visualized Experiments**, n. 67, Sep 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000209225500045 >.

MERMELSTEIN, P. G.; MICEVYCH, P. E. Nervous System Physiology Regulated by Membrane Estrogen Receptors. **Reviews in the Neurosciences**, v. 19, n. 6, p. 413-424, 2008 2008. ISSN 0334-1763. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263587400003 >.

METCALFE, N. B.; ALONSO-ALVAREZ, C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 984-996, Oct 2010. ISSN 0269-8463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281895800005 >.

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

MICHALKOVA, V. et al. Amelioration of Reproduction-Associated Oxidative Stress in a Viviparous Insect Is Critical to Prevent Reproductive Senescence. **Plos One**, v. 9, n. 4, Apr 24 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000335505000002 >.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochemical Journal**, v. 404, p. 1-13, May 15 2007. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246547300001 >.

MICHELS, A. J.; JOISHER, N.; HAGEN, T. M. Age-related decline of sodium-dependent ascorbic acid transport in isolated rat hepatocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 1, p. 112-120, Feb 1 2003. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180783600013 >.

MILES, D. B. et al. Relating endocrinology, physiology and behaviour using species with alternative mating strategies. **Functional Ecology**, v. 21, n. 4, p. 653-665, Aug 2007. ISSN 0269-8463. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247905700005 >.

MONAGHAN, P.; METCALFE, N. B.; TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecology Letters**, v. 12, n. 1, p. 75-92, Jan 2009. ISSN 1461-023X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261625500010 >.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. NITRIC-OXIDE - PHYSIOLOGY, PATHOPHYSIOLOGY, AND PHARMACOLOGY. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, Jun 1991. ISSN 0031-6997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991FU76700001 >.

MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 28, p. 3331-3346, Oct 15 2009. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270483800008 >.

MORAN, J. et al. 17 beta-Estradiol and genistein acute treatments improve some cerebral cortex homeostasis aspects deteriorated by aging in female rats. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 4, p. 414-421, Apr 2013. ISSN 0531-5565. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316669600007 >.

MORRIS, B. J. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 56, p. 133-171, Mar 2013. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000319647700013 >.

MOURIEC, K. et al. Early Regulation of Brain Aromatase (cyp19a1b) by Estrogen Receptors During Zebrafish Development. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 10, p. 2641-2651, Oct 2009. ISSN 1058-8388. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270769300018 >.

MULLER, F. L. et al. Trends in oxidative aging theories. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 4, p. 477-503, Aug 15 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248404200001 >.

MURPHY, M. P. et al. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 361-366, Apr 6 2011. ISSN 1550-4131. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000289381300007 >.

MUSCI, G. et al. Nitrosative/oxidative modifications and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 6, p. 544-551, Jun 2006. ISSN 0047-6374. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237915900008 >.

NEELEY, W. L.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 491-505, Apr 2006. ISSN 0893-228X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237001300001 >.

NEUMANN, C. A.; CAO, J.; MANEVICH, Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. **Cell Cycle**, v. 8, n. 24, p. 4072-4078, Dec 15 2009. ISSN 1538-4101. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273232300024 >.

OLDAKOWSKI, L. et al. Is reproduction costly? No increase of oxidative damage in breeding bank voles. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 11, p. 1799-1805, Jun 2012. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303831800010 >.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 2-12, Jan-Feb 2010. ISSN 1942-0900. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274978900002 >.

PELLEGRINI, M. et al. Naringenin modulates skeletal muscle differentiation via estrogen receptor alpha and beta signal pathway regulation. **Genes and Nutrition**, v. 9, n. 5, Sep 2014. ISSN 1555-8932. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342221100010 >.

PENG, C. et al. Biology of Ageing and Role of Dietary Antioxidants. **Biomed Research International**, 2014 2014. ISSN 2314-6133. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334215100001 >.

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

PESKIN, A. V. et al. Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. **Biochemical Journal**, v. 432, p. 313-321, Dec 1 2010. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284813800010 >.

PFUFF, D. W. et al. Estrogens, brain and behavior: studies in fundamental neurobiology and observations related to women's health. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 5, p. 365-373, Nov 30 2000. ISSN 0960-0760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166120300017 >.

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

PIKE, T. W. et al. Dietary carotenoid availability, sexual signalling and functional fertility in sticklebacks. **Biology Letters**, v. 6, n. 2, p. 191-193, Apr 23 2010. ISSN 1744-9561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275432900013 >.

POYNTON, R. A.; HAMPTON, M. B. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 906-912, Feb 2014. ISSN 0304-4165. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330818700020 >.

RASGON, N.; JARVIK, L. Insulin resistance, affective disorders, and Alzheimer's disease: Review and hypothesis. **Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59, n. 2, p. 178-183, Feb 2004. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000189331200014 >.

REMOLINA, S. C.; HUGHES, K. A. Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. **Age**, v. 30, n. 2-3, p. 177-185, Sep 2008. ISSN 0161-9152. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258881300011 >.

REZNICK, D. MEASURING REPRODUCTIVE COSTS - RESPONSE TO PARTRIDGE. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 7, n. 4, p. 134-134, Apr 1992. ISSN 0169-5347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HL42900011 >.

RHEE, S. G. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1882-1883, Jun 30 2006. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238848100033 >.

RHEE, S. G.; WOO, H. A. Multiple Functions of Peroxiredoxins: Peroxidases, Sensors and Regulators of the Intracellular Messenger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and Protein Chaperones. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 781-794, Aug 2011. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292446300012 >.

RIZZO, A. et al. Evaluation of blood and milk oxidative status during early postpartum of dairy cows. **Animal**, v. 7, n. 1, p. 118-123, Jan 2013. ISSN 1751-7311. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313218200013 >.

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

RODRIGUEZ-CUENCA, S. et al. Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 42958-42963, Nov 8 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179081200070 >.

RYTER, S. W.; PACIFICI, R. E.; DAVIES, K. J. A. **Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress.** *Biological Oxidation Systems*: Academic Press. 2: 929-952 p. 1990.

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

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 172-188, Jan 2008. ISSN 0893-228X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252585200016 >.

SCHAEFF, C. et al. Increased Anaplerosis, TCA Cycling, and Oxidative Phosphorylation in the Liver of Dairy Cows with Intensive Body Fat Mobilization during Early Lactation. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 11, p. 5503-5514, Nov 2012. ISSN 1535-3893. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000311190600033 >.

SCHAUB, C. E. et al. Development of ER-alpha and ER-beta expression in the developing ovine brain and pituitary. **Gene Expression Patterns**, v. 8, n. 6, p. 457-463, Jul 2008. ISSN 1567-133X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258313600014 >.

SCHMIDT, C. M.; BLOUNT, J. D.; BENNETT, N. C. Reproduction Is Associated with a Tissue-Dependent Reduction of Oxidative Stress in Eusocial Female Damaraland Mole-Rats (*Fukomys damarensis*). **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 7, Jul 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000339993700055 >.

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

SCHREMPF, A.; CREMER, S.; HEINZE, J. Social influence on age and reproduction: reduced lifespan and fecundity in multi-queen ant colonies. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, n. 7, p. 1455-1461, Jul 2011. ISSN 1010-061X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292698700007 >.

SELMAN, C. et al. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? **Trends Ecol Evol**, v. 27, n. 10, p. 570-7, Oct 2012. ISSN 1872-8383 (Electronic)0169-5347 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789512>>.

SELMAN, C. et al. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 10, p. 570-577, Oct 2012. ISSN 0169-5347. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000312055500006 >.

SHARMA, P. K.; THAKUR, M. K. Expression of estrogen receptor (ER) alpha and beta in mouse cerebral cortex: Effect of age, sex and gonadal steroids. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 6, p. 880-887, Jun 2006. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237774400012 >.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, p. 1-16, Nov 15 2001. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172466900001 >.

SHERWIN, B. B. Estrogen and cognitive functioning in women. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 2, p. 133-151, Apr 2003. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182279300001 >.

SHULMAN, R. G. et al. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 8, p. 489-495, Aug 2004. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223360800011 >.

SIMPSON, J. E. et al. A neuronal DNA damage response is detected at the earliest stages of Alzheimer's neuropathology and correlates with cognitive impairment in the Medical Research Council's Cognitive Function and Ageing Study ageing brain cohort. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 41, n. 4, p. 483-496, Jun 2015. ISSN 0305-1846. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000354465900009 >.

SIQUEIRA, I. R. et al. Ascorbate uptake is decreased in the hippocampus of ageing rats. **Neurochemistry International**, v. 58, n. 4, p. 527-532, Mar 2011. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288774800012 >.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. CONTROL OF PROGESTERONE SECRETION DURING ESTROUS-CYCLE AND EARLY PSEUDOPREGNANCY IN RAT - PROLACTIN, GONADOTROPIN AND STEROID LEVELS ASSOCIATED WITH RESCUE OF CORPUS-LUTEUM OF PSEUDOPREGNANCY. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, 1975 1975. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1975V132300030 >.

SOLOMON, N. G.; FRENCH, J. A. **Cooperative Breeding in mammals**. Cambridge University Press, 1997.

SPEAKMAN, J. R. The physiological costs of reproduction in small mammals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 363, n. 1490, p. 375-398, Jan 27 2008. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252317600011 >.

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **Anatomical Record**, v. 254, n. 1, p. 116-126, Jan 1 1999. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077961600015 >.

STEARNS, S. C. **Does impressive progress on understanding mechanisms advance life history theory?** Mechanisms of Life History Evolution: The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-Offs. FLATT, T. e HEYLAND, A. Oxford Scholarship Online: Oxford 2011.

STIRONE, C. et al. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, Akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: Rapid and long-term effects. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 105-113, Jan 2005. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225865200013 >.

SURIYASATHAPORN, W. et al. The Indicative Influence of Oxidative Stress on Low Milk Yields in Dairy Cattle. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 3, p. 237-243, Sep 2009. ISSN 0125-6491. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271541400006 >.

THOMAS, F. H. et al. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 487-495, Sep 2001. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170834700016 >.

TSAY, H. J. et al. Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 6, p. 466-474, Nov-Dec 2000. ISSN 1021-7770. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165276200004 >.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241963000007 >.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235988200001 >.

VALLE, A. et al. Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 4, p. C1302-C1308, Oct 2007. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250052400012 >.

VAN RAAMSDONK, J. M.; HEKIMI, S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 15, p. 5785-5790, Apr 10 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302533500049 >.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO, ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANO



OXIDATIVO EM SANGUE HUMANO: PRINCIPAIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SUA DETERMINAÇÃO. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELANDO, A.; TORRES, R.; ALONSO-ALVAREZ, C. Avoiding bad genes: oxidatively damaged DNA in germ line and mate choice. **Bioessays**, v. 30, n. 11-12, p. 1212-1219, Nov-Dec 2008. ISSN 0265-9247. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260912800020 >.

VINA, J. et al. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. **Febs Letters**, v. 579, n. 12, May 9 2005. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229051600001 >.

VINA, J. et al. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression - Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, Feb 2006. ISSN 1071-5762. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234385600001 >.

VINA, J. et al. Females Live Longer than Males: Role of Oxidative Stress. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 36, p. 3959-3965, Dec 2011. ISSN 1381-6128. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000299640300003 >.

VINA, J. et al. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. **Free Radical Research**, v. 40, n. 12, p. 1359-1365, Dec 2006. ISSN 1071-5762. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241848100016 >.

VOET, D., VOET, G, PRATT, C.W. **Fundamentals of Biochemistry** WILKINS, W. A. 2001.

WEINERT, B. T.; TIMIRAS, P. S. Theories of aging. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 4, p. 1706-1716, Oct 2003. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185386800047 >.

WHO. World Health Organization. <http://www.who.int/en/>, 2011.

WIERSMA, P. et al. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 271, p. S360-S363, Aug 7 2004. ISSN 0962-8452. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223099800032 >.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 278 - 286, 2008.

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

YAGUE, J. G. et al. Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. **Brain Research**, v. 1209, p. 115-127, May 13 2008. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256144800013 >.

YAMADA, S. et al. Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor alpha-immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain. **Neuroscience Letters**, v. 463, n. 2, p. 135-139, Oct 2 2009. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269808700007 >.

ZHANG, Q.-G. et al. Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1-2, p. 84-91, May 25 2014. ISSN 0303-7207. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337881700012 >.

## 9. ANEXOS

Parecer do Comitê de ética da UFRGS

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

Número : 2007831

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

Pesquisador (es) :

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

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

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

  
ALMA SIMONI BRUM DA SILVA  
Coordenador do CEP-UFRGS

## **Fernanda Maciel Heemann**

### **Curriculum Vitae**

#### Dados pessoais

**Nome** Fernanda Maciel Heemann

**Filiação** Fernando Heemann e Maristela Maciel

**Nascimento** 21/12/1990 - Porto Alegre/RS - Brasil

**Carteira de Identidade** 4096241833 sjs - RS - 18/05/2009

**CPF** 025.403.280-08

**Endereço residencial** Engenheiro Teixeira Soares, 335. ap 301

Bela Vista- Porto Alegre

90440-140, RS - Brasil

Telefone: 051 2103 2935

Celular: 051 93042411

**Endereço profissional** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de  
Biotecnologia

Av. Bento Gonçalves, 9500

Agronomia - Porto Alegre

91501-970 RS - Brasil

Telefone: 51 33087372

#### **Endereço eletrônico**

E-mail para contato : fernanda\_heemann@hotmail.com

#### **Formação acadêmica/titulação**

**2015** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,  
Brasil

Título: Avaliação do Estresse oxidativo em cérebro de ratas reprodutoras  
e não reprodutoras ao longo do envelhecimento

Orientador: Mara Benfato

**2009 - 2013**

Graduação em Biomedicina.

Centro Universitário Metodista, Do IPA

Título: Efeito do tratamento subcrônico com extrato de folha de videira  
da variedade Bordô sobre o metabolismo energético cerebral de ratos.

Orientador: Cláudia Funchal

### **Formação complementar**

**2004 - 2009**

Inglês- ATTITUDE IDIOMAS

### **Estágios**

**2011- 2012**

Hospital de Clínicas: Unidade de Microbiologia e Biologia molecular.

**2012- 2013**

Iniciação científica: Instituto de Biociências, laboratório de Estresse Oxidativo.

### **Eventos**

1. XXIV Salão de Iniciação Científica UFRGS. 2012

2. VII Salão de Iniciação Científica IPA. 2012

3. Encontro Internacional em Terapia celular e Engenharia de Tecidos, UFRGS..Encontro Internacional em Terapia celular e Engenharia de Tecidos, UFRGS. 2011. (Encontro).

4. V Semana acadêmica do curso de Biomedicina. 2011

