

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

Avaliação do estresse oxidativo em coração de ratas ovariectomizadas e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipoico.

PRISCILA MACHADO MARINHO

Porto Alegre, março de 2016

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

Avaliação do estresse oxidativo em coração de ratas ovariectomizadas e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipoico.

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^a Dr^a Mara da Silveira Benfato

“Eu nunca fui uma moça bem comportada. Pudera, nunca tive vocação para alegria tímida [...] Eu quero da vida o que ela tem de cru e de belo. Não estou aqui pra que gostem de mim. Estou aqui pra aprender a gostar de cada detalhe que tenho”. Raquel de Queiroz.

Dedico este trabalho a minha mãe... Exemplo de garra, honestidade e amor à vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida da minha mãe que é o motivo da minha vida. Obrigada por estar em meu coração, me guiando e apoiando nos momentos mais difíceis deste longo trajeto.

Agradeço à minha mãe Marlene, por ter lutado por sua vida. Passamos por maus bocados durante estes últimos anos. Não foi fácil minha jornada hospital, trabalho e mestrado... mas venci. Me sinto vitoriosa principalmente porque hoje você está presente neste momento especial.

Agradeço à minha irmã Claudia e meus sobrinhos Guilherme e Giovana pelo simples fato de existirem e me encherem de amor, um coração por vezes cansado que pensava em desistir.

Agradeço ao William. Esposo, amigo, parceiro, colega... Obrigada por aguentar o mau humor, os muitos choros e lamentos, as noites em claro, as parcerias nas madrugadas em casa e no laboratório, chimarrão quentinho, cafés, lanches e refeições... Entre tantas outras contribuições. Obrigada por não me deixar desistir e acreditar no meu potencial!

Agradeço minha eterna amiga Tais. Minha “guru”, “guia espiritual”. Foi uma peça fundamental para me manter no foco durante estes longos dois anos. A cada dia me ensina algo de bom que a vida proporciona. Meu exemplo de determinação. Minha psicóloga e conselheira de plantão! Minha advogada preferida!

Agradeço ao meu amigo Guilherme. Torno a repetir que fora o título de mestre, a tua amizade foi o melhor presente que a UFRGS me deu!

Agradeço minha madrinha e amiga Marivane, que sempre teve palavras doces de apoio e incentivo. Tu és uma pessoa iluminada por Deus!

Agradeço minhas amigas, colegas e chefes do Exército Brasileiro, que contribuíram de alguma forma para que eu tenha conseguido chegar até aqui, seja com liberações, trocas de turno/plantões ou palavras amigas. Em especial, quero agradecer a você Micheli, que tão nova nos deixou. Não estará em minha defesa, mas sei que enquanto minhas lágrimas rolam, seu sorriso me ilumina... Sempre me apoiou me incentivou e se orgulhou. Obrigada por ter feito parte da minha vida. Dedico este trabalho a você também! E também ao meu eterno chefe Coronel Marco por ter me ajudado em momentos difíceis e ter acreditado em mim.

Agradeço à minha professora orientadora Dra Mara da Silveira Benfato por ter me oportunizado a realização do meu grande sonho. Não fosse a sra, este momento não seria possível. Muito obrigada!

Agradeço aos colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo, onde realizei este trabalho. Em especial, agradeço à Nanda por ter me apresentado ao laboratório e ao Tiago pelo grande força no artigo e finalização deste trabalho.

Agradeço aos professores Dra Marilene Vainstein e Dr Diego Bonatto, integrantes da minha Comissão de Acompanhamento.

Agradeço aos funcionários exemplares Zelma, Luciano e Silvia, sempre dispostos a ajudar com sorriso no rosto e extremo profissionalismo.

Agradeço à minha banca: Carmem Gottfried, Patricia Valente e Jorge Quillfeldt. Pela presença e atenção a mim dispensadas, bem como pelas contribuições neste trabalho.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Ciclos reprodutivos	14
1.2. Hormônios sexuais	17
1.3. Menopausa	18
1.3.1. Menopausa e as consequências	19
1.3.2 Menopausa e terapia de reposição hormonal (TRH)	20
1.4. Estrogênio	21
1.5. Espécies reativas e estresse oxidativo	22
1.6. Estresse oxidativo e coração	25
1.7. Ciclo reprodutivo e estropausa em ratas	26
1.8. Modelo experimental de menopausa	28
1.9. Defesas antioxidantes	28
1.10. Ácidos Graxos (AG)	30
1.10.1. Ômega 3 e 6.....	31
1.11. Ácido Lipoico	32
2. OBJETIVO	34
2.1. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR	72
5. CONCLUSÃO	75
6. PERSPECTIVAS	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	91

LISTA DE ABREVIATURAS

8OHdG – 8-oxo-7,8-dehidro-2'-deoxiguanosina

AA – Ácido araquidônico

AG – Ácidos graxos

AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados

AL/LA– Ácido α - lipoico

AL – Ácido α -linoléico

AAL – Ácido α -linolênico

BSA – Albumina sérica bovina

CAT – Catalase

Cu/ZnSOD – Superóxido dismutase Cobre-Zinco

DHA – Ácido docosahexaenoico

DHLA – Ácido dihidrolipoico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNPH – Dinitrofenilhidrazona

EC-SOD – Superóxido dismutase extracelular

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

EPA – Ácido eicosapentaenoico

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

ERS – Espécies Reativas de Enxofre

FDA (Food and Drug Administration)- “Administração de drogas e alimentos”

FSH – Hormônio folículo estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotropina

GSH – glutathiona reduzida

GSHt – glutathiona total

GSSG – Glutathiona oxidada

GST – Glutathiona S-transferase

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LH – Hormônio luteinizante

LTs – Leucotrienos

MDA – Malondialdeído

MnSOD – Superóxido Dismutase Manganês

n-3 – Ômega-3

n-6 – Ômega-6

NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO – Óxido nítrico

NOX2 – NADPH oxidase

NOX4 – NADPH oxidase

Prx – Peroxirredoxina

PUFAS - Ácidos Graxos Poli-insaturados

SOD – Superóxido dismutase

TRH – Terapia de reposição hormonal

VIT. C – Ácido ascórbico/vitamina C

VIT. E – Alfa-tocoferol/vitamina E

Xs – Tromboxanos

XDH – Xantina desidrogenase

WHI (Women's Health Initiative Study Group)- "Grupo de iniciativa em estudos da saúde da mulher"

RESUMO

A menopausa é identificada como uma fase onde é desencadeada uma série de distúrbios fisiológicos e metabólicos devido à queda brusca dos hormônios sexuais, que desempenham funções importantes como o controle dos ciclos ovulatórios e antioxidantes naturais. Com o hipoestrogenismo ocorre uma variedade de desordens que vão desde aumento de peso e mudanças no humor até doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Muitas destas doenças estão relacionadas com o estresse oxidativo. A reposição hormonal com estrogênio vem sendo repensada devido seus possíveis efeitos colaterais. A suplementação com antioxidantes de fontes variadas é uma alternativa para amenizar os sintomas da menopausa, melhorando assim a qualidade de vida das mulheres que se encontram nesta fase. Este estudo teve por finalidade avaliar a resposta do estresse oxidativo no coração de ratas Wistar ovariectomizadas, após suplementação com ácidos graxos (AG) eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), provenientes do ômega-3 e o ácido lipoico (AL), em um período de 3 meses. Foram realizadas as análises de biomarcadores, quantificando antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, bem como marcadores de danos em lipídeos e proteínas com a quantificação de Malondialdeído (MDA) e identificação de grupos carbonilados, respectivamente. Como resultados deste estudo, a ovariectomia gerou alterações no perfil oxidativo das ratas. A suplementação com EPA, DHA e AL demonstrou a recuperação dos níveis normais de consumo de H_2O_2 (catalase, peroxirredoxinas), da atividade de glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e glutathione total (GSht) nas ratas tratadas. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) retornou aos níveis normais com a suplementação com DHA. Já o tratamento com EPA foi mais efetivo para o aumento da Vit E, quando comparado ao grupo controle. Os danos em proteínas foram menores em todos os grupos suplementados. Os danos em lipídios foram menores no grupo tratado com AL, quando comparados ao grupo SHAM (grupo controle). Os resultados sugerem um efeito protetor do ácido lipoico e do ômega-3 no coração de ratas ovariectomizadas em relação ao dano oxidativo.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo, coração, ovariectomia, ácido lipóico, ácidos graxos, ômega-3.

ABSTRACT

Menopause is identified as a phase where triggers a series of physiological and metabolic disorders due to the sharp drop of sex hormones, which play important functions like controlling the ovulatory cycles and natural antioxidants. With hypoestrogenism occurs a variety of disorders ranging from weight gain and changes in the mood to cardiovascular and neurodegenerative diseases. Many of these diseases are associated with oxidative stress. Hormone replacement with estrogen is being rethought because of their possible side effects. Supplementation with antioxidants from different sources is an alternative to alleviate menopausal symptoms, thus improving the quality of life of women who are at this stage. This study aimed to evaluate the response of oxidative stress in the heart of Wistar ovariectomized rats, after supplementation with fatty acids (FA) eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), derived from omega-3 and lipoic acid (LA), in a 3 month period. The biomarker analyzes were performed by quantifying enzymatic and non-enzymatic antioxidants and damage markers in lipids and proteins with the quantification of Malondialdehyde (MDA) and identifying carbonylated groups, respectively. As a result of this study, ovariectomy generated changes in oxidative profile of rats. The supplementation with EPA, DHA and LA showed recovery of normal levels of H₂O₂ consumption (catalase peroxidase), glutathione activity S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), and total glutathione (GSht) in treated rats. The activity of glutathione peroxidase (GPx) returned to normal levels with supplementation with DHA. Since treatment with EPA was more effective for increasing vitamin E compared to the control group. Protein damage were lower in all supplemented groups. The damage in lipids were lower in the group treated with LA when compared to SHAM group (group control). The results suggest a protective effect of lipoic acid and omega-3 in the heart of ovariectomized rats compared to oxidative damage.

Key-words: Oxidative Stress, heart, ovariectomy, lipoic acid, fatty acids, omega-3.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ciclos Reprodutivos

Os ciclos reprodutivos das mulheres são caracterizados por mudanças mensais na secreção das taxas hormonais e mudanças nos órgãos sexuais. Este padrão rítmico mensal é conhecido como ciclo sexual mensal feminino, que dura em média 28 dias (Figura 1.), podendo variar de 20 a 45 dias, em algumas mulheres. A cada 28 dias ocorre uma sequência de desenvolvimento folicular (fase folicular) nos primeiros 14 dias e formação e degeneração de um corpo lúteo (fase lútea), que ocorre nos 14 dias subsequentes. Entre as duas fases, ocorre a ovulação (Constanzo, 2007).

As mudanças ovarianas dependem de três hierarquias de hormônios gonadotrópicos: hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), cuja secreção é realizada pela hipófise anterior após a liberação do terceiro hormônio, liberador de gonadotropina (GnRH), pelo hipotálamo (Guyton & Hall, 2011). A secreção destes hormônios é controlada por *feedback* positivo (+) ou *feedback* negativo (-), sendo liberados com diferentes intensidades durante as diferentes fases do ciclo menstrual mensal (Figura. 2) (Constanzo, 2007; Guyton & Hall 2011)

As células da granulosa são as únicas células do ovário com receptores para FSH, sendo que a ação deste hormônio estimula as células da granulosa para folículos primários e estimula a síntese de estradiol. A fase folicular ou proliferativa ocorre pelos efeitos de *feedback* negativo do estradiol, uma vez que ele tem sua síntese e secreção estimulada pelo FSH e LH, pelas células foliculares. O estradiol atua inibindo a secreção adicional de FSH e LH (Guyton & Hall 2011).

No meio do ciclo, os níveis de estradiol aumentam e passam a ter efeito de *feedback* positivo, causando secreção adicional de FSH e LH. Este processo é conhecido como surto ovulatório de FSH e LH. A ovulação começa pelo LH,

quando as concentrações sanguíneas do mesmo aumentam e a ruptura do folículo dominante é induzida, liberando assim o oócito. Na fase lútea ou secretora, a principal secreção dos ovários é a progesterona que atua com *feedback* negativo sobre a hipófise anterior, que inibe a secreção de FSH e LH (Constanzo, 2007; Guyton & Hall 2011).

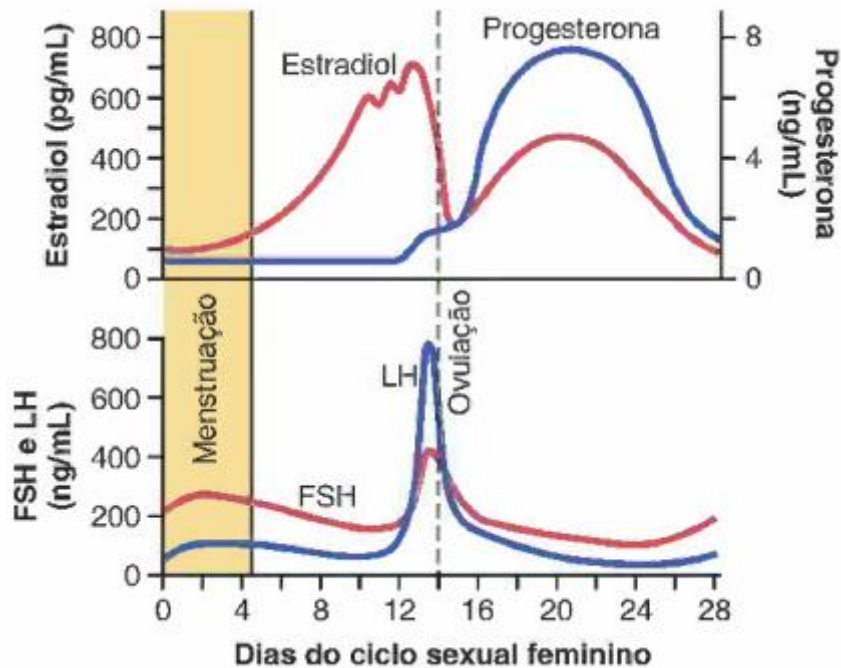


Figura 1: Concentrações plasmáticas aproximadas de gonadotropinas e hormônios ovarianos, durante o ciclo sexual feminino normal (Guyton & Hall, 2011).

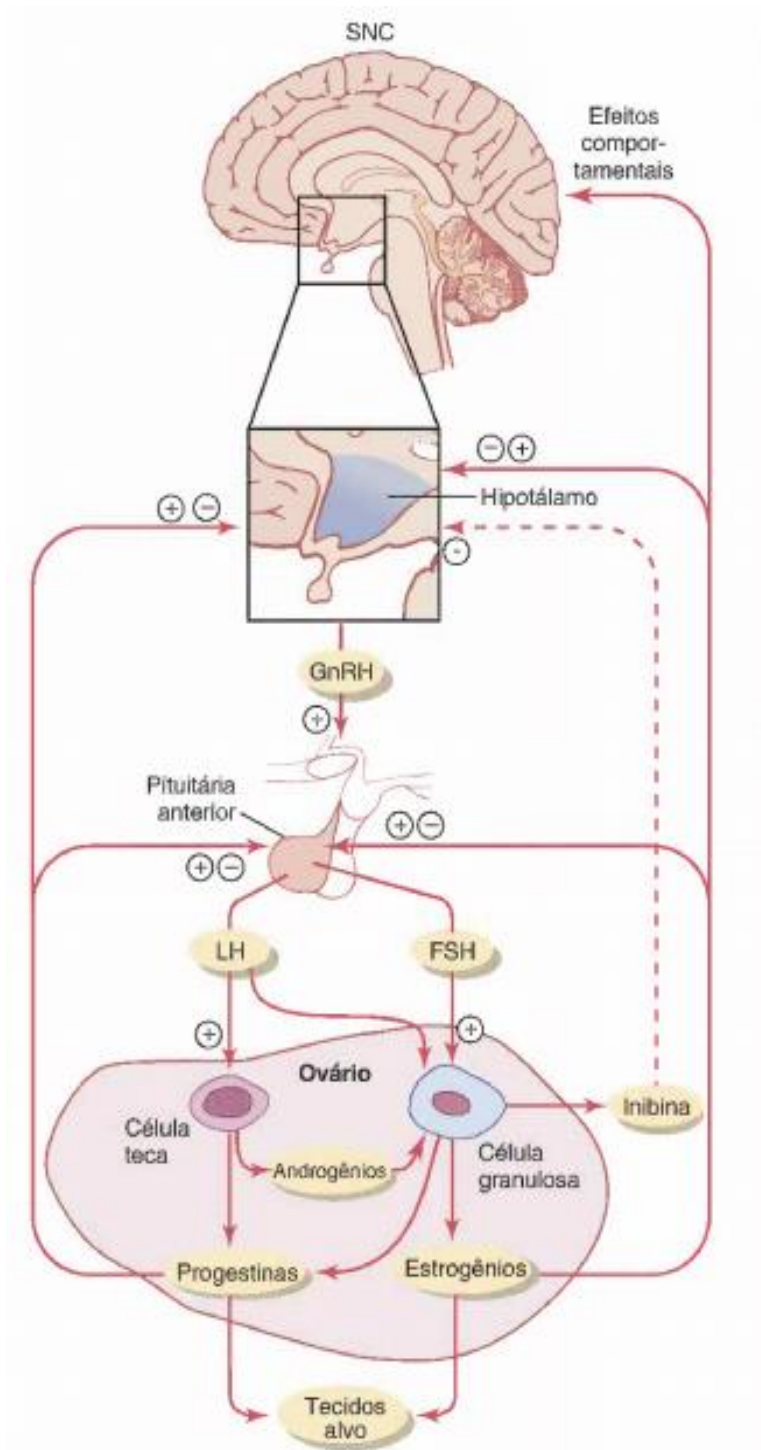


Figura 2: Regulação por *feedback* do eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano em mulheres. Efeitos estimulatórios são indicados por (+) e os efeitos de *feedback* negativo estão demonstrados por (-). Os estrogênios e as progestinas exercem tanto os efeitos de *feedback* positivo quanto do negativo, na hipófise anterior e no hipotálamo, dependendo do estágio do ciclo ovariano (Adaptado de Guyton & Hall, 2011).

1.2 Hormônios Sexuais

Os hormônios esteroides ovarianos, progesterona e 17β -estradiol, são sintetizados nos folículos ovarianos pelas funções combinadas das células da granulosa e células da teca. A aromatase converte a testosterona em 17β -estradiol nas células da granulosa. (Constanzo, 2007).

Em geral, os hormônios esteroides ovarianos coordenam a atividade reprodutiva da mulher com o desenvolvimento do óvulo, desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo para sustentação do óvulo fertilizado e manutenção da gravidez, bem como a preparação das mamas para lactação (Constanzo, 2007; Guyton & Hall 2011).

Os hormônios esteroides: cortisol, aldosterona, estradiol e estriol, progesterona e testosterona, em geral derivados do colesterol (Figura.3), são sintetizados e secretados pelo córtex supra-renal, gônadas, corpo lúteo e placenta (Constanzo, 2007; Guyton & Hall 2011).

A estrutura química dos hormônios esteroides é semelhante à do colesterol: lipossolúveis, caracterizados por 3 anéis ciclo-hexila e 1 anel ciclopentila, combinados a uma única estrutura. Uma vez sintetizados, se difundem através da membrana celular e entram no líquido intersticial e sangue (Guyton & Hall, 2011).

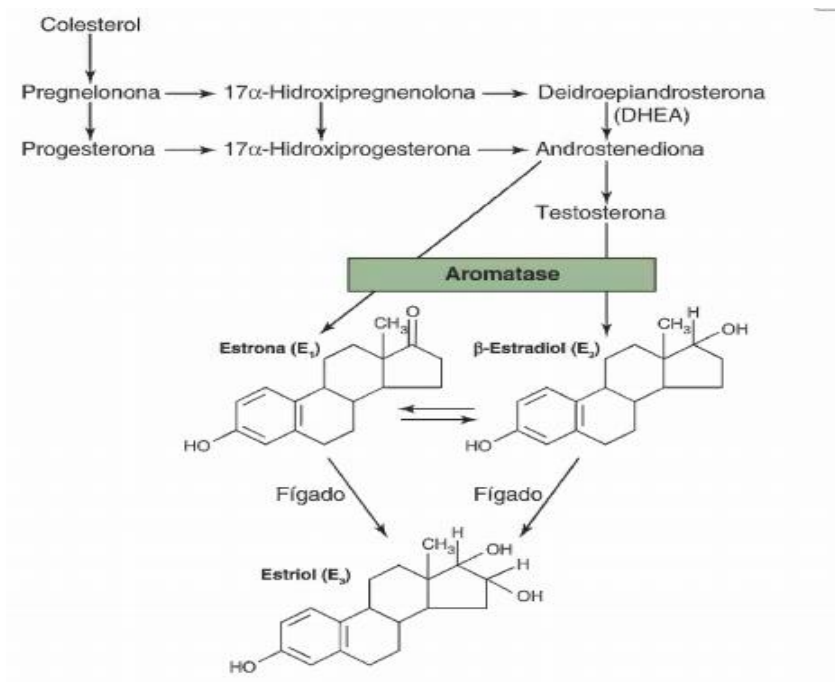


Figura 3: Síntese dos principais hormônios femininos e seus precursores (Adaptado e traduzido de Guyton & Hall, 2011).

1.3 Menopausa

A menopausa caracteriza-se por 12 meses de amenorreia (ausência de menstruação) subsequentes. Esta transição inicia geralmente por volta dos 40 anos, sendo a idade média de 51 anos para a ocorrência da menopausa propriamente dita (Behr *et al.*, 2012).

A menopausa é definida pela cessação permanente da menstruação devido à perda de atividade ovariana. O período pós-menopausa é caracterizado endocrinologicamente por secreção elevada de Hormônio folículo estimulante (FSH) e do Hormônio luteinizante (LH) e a persistência de baixos níveis de esteroides ovarianos (estradiol, progesterona) (Schmidt, Rubinow, 2010). A menopausa pode ocorrer de forma natural ou por meio cirúrgico, com a retirada dos ovários, quimioterapia ou radioterapia (Agarwal *et al.*, 2013).

Em geral, os sintomas relatados por mulheres pós-menopausa variam de sintomas vaginais com dispareunia (dor nas relações sexuais) e disfunções

sexuais, provavelmente pela diminuição da lubrificação vaginal, incontinência e infecções urinárias, insônia, depressão, ansiedade, humor lábil, perda de memória, fadiga, dor de cabeça, dores nas articulações e ganho de peso (Grady, 2006; Victorino *et al.*, 2013). No entanto, sintomas mais graves como perda de massa óssea, sintomas vasomotores, diminuição de lubrificação ocular e de mucosas e déficit cognitivo também são frequentes (Victorino *et al.*, 2013). Há poucos estudos e evidências sobre tratamentos alternativos para alívio dos sintomas devidos à menopausa (Grady, 2006)

1.3.1 Menopausa e as consequências

A menopausa está associada a muitas complicações fisiopatológicas resultantes das inúmeras mudanças que ocorrem devido à cessação da secreção dos hormônios ovarianos (Eysen *et al.*, 2013). Na menopausa, ocorrem desordens neuroendócrinas, devido à perda da função dos ovários, o qual apresent papel biológico importante no controle de funções reprodutoras e não reprodutoras, regulação do humor, a memória, a cognição, comportamento, a função imunológica, do sistema locomotor, cardiovascular, entre tantas outras (Rehman, Masson, 2005).

Estudos epidemiológicos indicam que a incidência de Alzheimer em mulheres após a menopausa é de duas a três vezes maior no sexo masculino, com idades semelhantes (Eysen *et al.*, 2013). Aumento no colesterol plasmático total (dislipidemia), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos, e uma diminuição dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL) (Pereira *et al.*, 2003). Além disso, após a menopausa, as mulheres ganham peso e desenvolvem obesidade abdominal (da Rocha *et al.*, 2011).

Kannel *et al.* (1976), em seu estudo realizado ao longo de 20 anos, que compreendeu 2.873 mulheres em pré-menopausa e pós-menopausa, observou que a incidência de doença cardiovascular foi maior entre as mulheres pós-menopausa, com 70 eventos, contra 20 eventos cardiovasculares na pré-menopausa.

Estudos apontam que o estresse oxidativo aumenta em mulheres após a menopausa (da Rocha *et al.*, 2011; Eysen *et al.*, 2013).

1.3.2 Menopausa e terapia de reposição hormonal (TRH)

Em meados dos anos 90, muitos foram os trabalhos publicados, defendendo a TRH, afirmando que era benéfica por ser capaz de evitar doenças e eventos cardiovasculares, agindo como cardioprotetora (Grady *et al.*, 1992; WHO, 1994; Lennan, LenA, Ryan, 1995; Rodriguez *et al.*, 1995; Colditz *et al.*, 1995).

Porém em 1998, foi publicado no The Journal of the American Medical Association um estudo que mudaria o que se sabia da TRH até o momento e daria início a uma série de novos estudos a cerca deste assunto. Neste estudo participaram com 2.763 mulheres, onde, 1.380 receberam estrogênio equino conjugado 0,625mg/dia, mais acetado de medroxilprogesterona 2,5%. Estas mulheres tiveram acompanhamento por um período médio de 4,1 anos. Os resultados demonstraram que o tratamento com estas drogas aumentou as taxas de eventos tromboembólicos e doenças da vesícula biliar (Hulley *et al.*, 1998).

Em julho de 2002 foram divulgados resultados parciais do estudo Women's Health Initiative Study Group (WHI), patrocinado pelo Instituto Nacional de Saúde norte-americano, realizado com 16.608 mulheres na pós-menopausa com idade entre 50-79 anos. As participantes receberam intervenções com estrogênios equinos conjugados, 0,625 mg/d, mais acetato de medroxiprogesterona 2,5 mg/d, em 1 comprimido (n = 8506) ou placebo (n = 8102). Um dos braços do estudo foi suspenso devido às estimativas que indicavam que o uso dos hormônios aumentava o risco de doenças cardiovasculares e de câncer de mama (290 e 286 casos, respectivamente) (Jacques *et al.*, 2002).

No ano seguinte, em 2003, a Food and Drug Administration (FDA) recomendou que não fossem usados estrogênios para prevenir doenças cardíacas, e sim apenas para o alívio dos sintomas vasomotores, nas menores

doses possíveis, após pesar riscos e benefícios do TRH (Stephenson, 2003). Segundo WHI, as 8.506 mulheres tratadas com estrógenos conjugados tiveram 40 eventos coronarianos, 40 derrames, 80 eventos tromboembólicos e 40 casos de câncer de mama invasivos a mais do que as que receberam placebo (Jacques, Rossouw, *et al.*, 2002).

No início de 2004, foi encerrado o outro braço do estudo do WHI, com 11.000 mulheres em uso de estrógeno isolado, pois as estimativas mostraram que a TRH não previne a doença cardíaca e aumenta o risco de derrame cerebral. Concluiu-se então, que os riscos do TRH ultrapassavam os benefícios.

1.4 Estrogênio

É bem conhecido que os estrógenos atuam como sequestradores de radicais livres, pois quebram a reação em cadeia produzida por estes nas membranas biológicas, portanto, inibem a oxidação de lipídios e proteínas (da Rocha *et al.*, 2011).

As ações de proteção cardiovascular de estrogênio são parcialmente mediadas por um efeito direto sobre a parede do vaso, sendo ativo tanto no músculo liso vascular quanto nas células endoteliais. O estrogênio promove vasodilatação nos seres humanos e em animais experimentais, parte pela estimulação da prostaciclina e a síntese de óxido nítrico, assim como através da diminuição da produção de agentes vasoconstritores, tais como derivados da ciclo-oxigenase, espécies reativas de oxigênio, angiotensina II e endotelina-1. O estrogênio impede, também, a degradação do NO (óxido nítrico) devido às suas propriedades antioxidantes, aumenta sua disponibilidade, tendo papel importante na lesão arterial (Tostes *et al.*, 2003).

Os efeitos vasculoprotetores do estrogênio foram também parcialmente atribuídos a um equilíbrio NO/ânion superóxido (O_2^-) na parede do vaso, aumentando assim a biodisponibilidade do NO (Barbacanne *et al.*, 1999).

Estudos têm demonstrado que o estrogênio inibe a apoptose de células endoteliais induzida por H_2O_2 , que os fitoestrógenos atenuam o dano oxidativo ao DNA induzido por produtos finais de glicação em células do músculo liso vascular. Esta última ação foi associada com um aumento nos níveis totais de glutathione intracelular (Tostes *et al.*, 2003).

Wassmana *et al* (2001) demonstraram que a administração crônica de estrogênio em ratas ovariectomizadas previne a diminuição dos níveis plasmáticos de nitritos / nitratos, bem como o aumento da pressão arterial.

1.5 Espécies reativas e o estresse oxidativo

Os radicais livres ou espécies reativas são íons, moléculas ou átomos cujos elétrons encontram-se desemparelhados, sendo estes derivados principalmente do oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e do enxofre (ERS). Caracterizam-se por sua instabilidade, participando ativamente de reações com outras moléculas. (Carolo & Ferreira; 2013).

Em atividades normais às células, como a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, por exemplo, radicais livres são produzidos em um cenário de óxido-redução, onde oxigênio molecular (O_2) sofre uma redução tetravalente formando H_2O . Neste processo, são gerados intermediários reativos (Figura 4): as ERO, sendo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) os mais comuns (Tabela 1).

Mesmo H_2O_2 não sendo um radical livre, é um metabólito de oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz o OH^{\cdot} (mais reativo em sistemas biológicos) (Wiernsperger, 2003; Halliwell & Gutteridge 2007; Seifried *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2010).

Outra forma de produção de ERO é através de exposições a agentes físicos e químicos (poluentes ambientais, fumaça de cigarro, produtos químicos

industriais, entre outros) ou até mesmo estados patológicos do indivíduo (processos inflamatórios, por exemplo), ilustrados na Figura 5 (Lobo *et al.*; 2010).

As enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e xantina oxidase, citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e angiotensina II também são fontes geradoras de ERO (Ascensão *et al.*,2003; Szczurek & Szyguła-Jurkiewicz , 2015).

Para organismos aeróbicos, a exposição às ERO é constante e inevitável. As ERO podem ser geradas intracelularmente como subprodutos do metabolismo aeróbico normal ou como mensageiros secundários em várias vias de transdução de sinal. Eles podem também ser derivados a partir de fontes exógenas, ou podem ser tomados diretamente pelas células do meio extracelular (Martindale, Holbrook, 2002).

Quando presentes em altas concentrações, as espécies reativas podem ser nocivas às células, gerando danos irreversíveis às estruturas celulares, como DNA, lipídeos e proteínas. O desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção das espécies reativas é o que caracteriza o estresse oxidativo (Wiernsperger, 2003; Halliwell & Gutteridge, 2007; Seifried *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Edwin *et al.*, 2013).

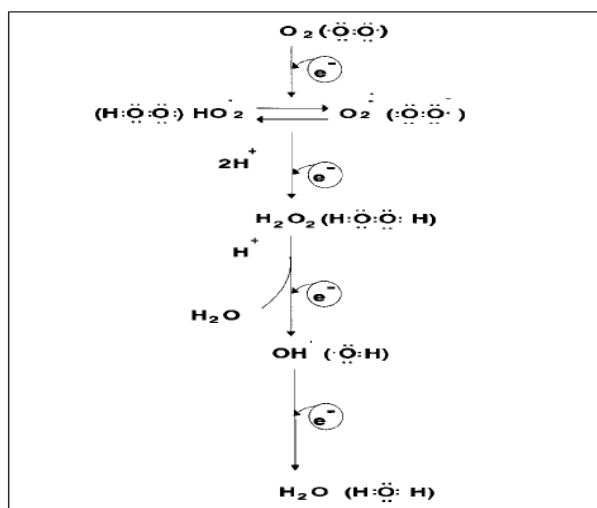


Figura 4: Redução

tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias ERO formadas neste processo (Adaptado de Cohen, 1989).

Tabela 1: Principais oxidantes endógenos (Birben *et al.*, 2012).

Oxidant	Formula	Reaction Equation
Superoxide anion	$O_2^{\cdot-}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot-} + H^+$ $2O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Hydrogen peroxide	H_2O_2	$Hypoxanthine + H_2O + O_2 \rightleftharpoons xanthine + H_2O_2$ $Xanthine + H_2O + O_2 \rightleftharpoons uric\ acid + H_2O_2$
Hydroxyl radical	$\bullet OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$
Hypochlorous acid	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Peroxyl radicals	ROO^{\bullet}	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$
Hydroperoxyl radical	HOO^{\bullet}	$O_2^{\cdot-} + H_2O \rightleftharpoons HOO^{\bullet} + OH^-$

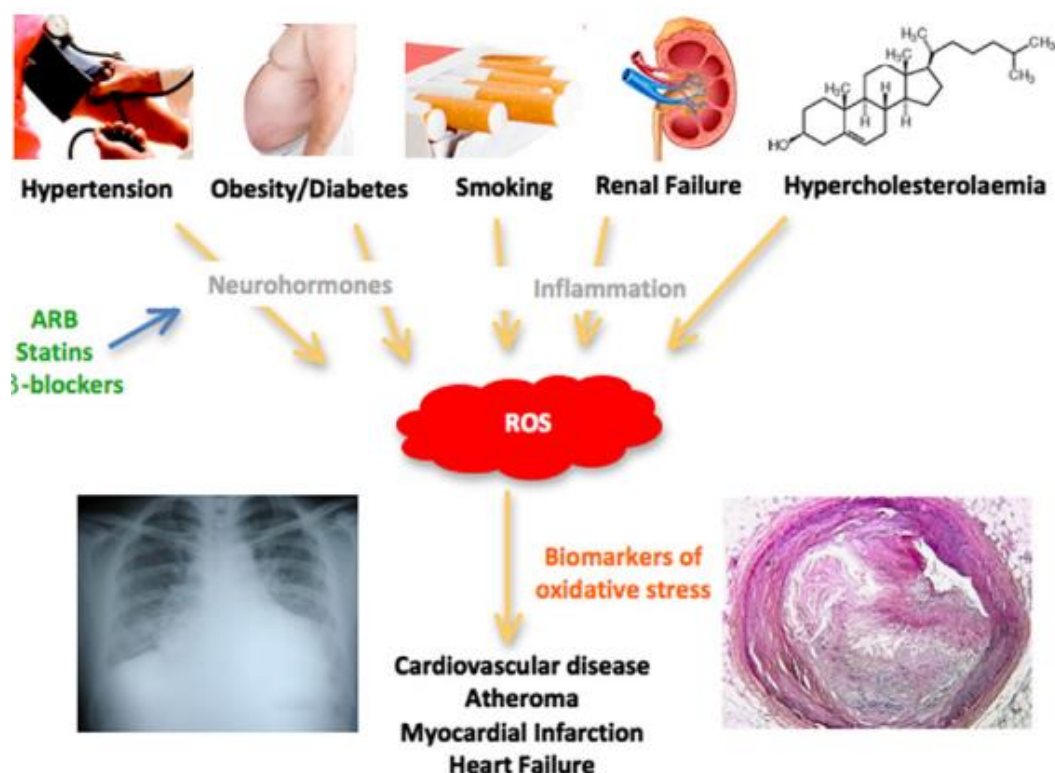


Figura 5: Ilustração sistemática da formação de ERO (Edwin *et al.*, 2013).

1.6. Estresse oxidativo e coração

Segundo Ascensão *et al.* (2003), o tecido muscular cardíaco possui uma alta taxa metabólica oxidativa e as taxas dos principais antioxidantes relativamente baixas, o que o torna suscetível a danos teciduais causados pelo estresse oxidativo.

No músculo cardíaco e esquelético, a formação de ERO pode se dar através da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), xantina oxidase, em forma de xantina desidrogenase (XDH), que presente no endotélio vascular, utiliza NAD como receptor de H^+ , ou em forma oxidase (XO), que utiliza o O_2 como receptor de elétrons, formando $O_2^{\cdot-}$ (Ascensão *et al.*, 2003).

As NADPH oxidases, desempenham um papel crítico na patogênese da insuficiência cardíaca, sendo a NOX2 e NOX4 as mais abundantes nos cardiomiócitos (Yantia, Hans and An L, 2012). Trabalhos apontam que a inibição da NADPH oxidase gera uma melhor resposta da função do miocárdio em modelos com insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio, o que sugere a ligação das NADPH oxidases e o estresse oxidativo com as patologias cardíacas (Colin *et al.*, 2006; Qin, Simeone e Patel 2007; Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

No miocárdio, a ação dos radicais livres altera, também, a atividade enzimática de muitos complexos, podendo inibir o trocador Na^+/Ca^{2+} , bem como as atividades Na^+, K^+ -ATPase e da Ca^{2+} -ATPase (Dixon *et al.*, 1990; Halliwell, 2007)

São muitas as doenças e desordens cardíacas relacionadas com o estresse oxidativo, como: hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, disfunção endotelial, apoptose, fibrose intersticial e remodelação da matriz extracelular (Dhalla *et al.*, 1996, Singal *et al.*, 1999; Heymes *et al.*, 2003; Colin *et al.*, 2006; Tsutsui, Kinugawa e Matsushima, 2011; Szczurek and Szyguła-Jurkiewicz, 2015).

Nos estágios iniciais de insuficiência cardíaca, ocorre um aumento da atividade das enzimas antioxidantes, que acompanha os mecanismos compensatórios primários, com o objetivo primordial de manutenção do fluxo sanguíneo adequado e perfusão tecidual. Com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, ocorre uma depleção de enzimas antioxidantes, além do aumento da produção de radicais livres, o que contribui para uma maior progressão da doença (Dhalla *et al.*, 1996; Heymes *et al.*, 2003).

1.7 Ciclo reprodutivo e estropausa em ratas

A senescência reprodutiva é uma parte natural e inevitável do processo de envelhecimento no ciclo de vida feminino. Nos seres humanos, este processo é denominado menopausa (Chakraborty, 2004), nos roedores, estropausa (Kempen, Milner e Waters, 2011).

O ciclo estral, que corresponde ao ciclo reprodutivo, possui uma duração de 4 a 5 dias, que se repete durante o ano inteiro e é dividido em quatro fases: diestro (55 à 57 h), proestro (12 à 14h), estro (25 à 27h) e metaestro (6 à 8h) (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002).

As fases são caracterizadas por mudanças uterinas e podem ser detectadas pelas características do epitélio vaginal. A fase diestro possui a presença predominante de leucócitos. Já na fase proestro, há presença de células epiteliais nucleadas. Na fase estro, as células facilmente identificadas são as epiteliais cornificadas. A fase metaestro caracteriza-se por uma mistura homogênea de todos os tipos celulares das fases anteriores. Existem estas variações de fases devido às diferentes concentrações de gonadotrofinas durante o ciclo estral (Smith, Freeman e Neil, 1975).

As fêmeas de roedores passam por flutuações hormonais (ciclos irregulares) que ocorrem na meia-idade, dos nove meses a um ano (Figura 6), semelhantes aos das mulheres. Após isso, elas entram em um estado de estro permanente, com paralisação completa dos ciclos reprodutivos (Fady *et al.* 2015; Kempen, Milner, Waters, 2011). Eventualmente, este período pode se estender para 16 a 18 meses (Rousseau, 2006).

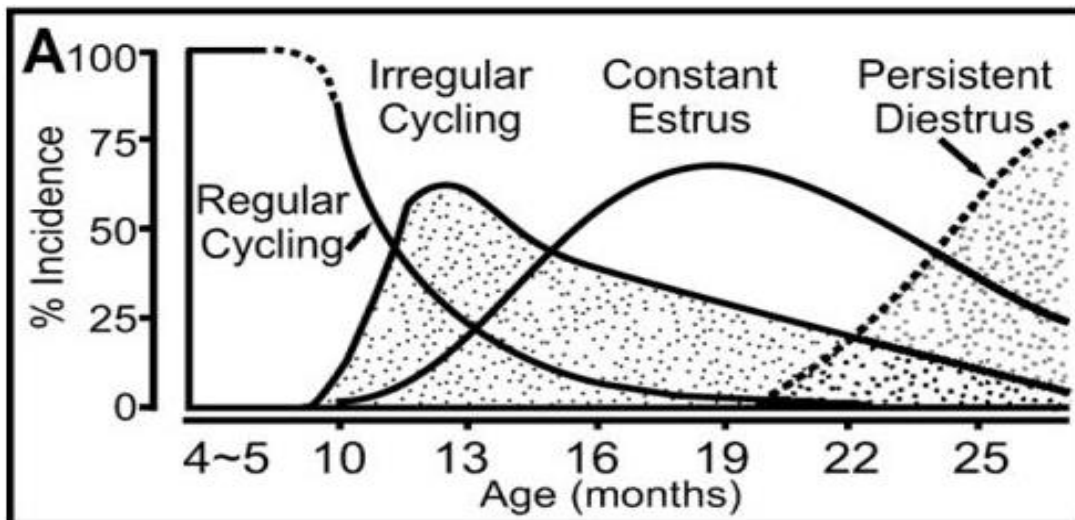


Figura 6 : Incidência de ciclos irregulares ao longo do envelhecimento em ratas (Berkley *et al.*, 2007).

1.8 Modelo experimental de menopausa

O modelo experimental de menopausa com ovariectomia já é bem estabelecido no campo de envelhecimento, simulando a menopausa em mulheres (Maffucci e Gore, 2006).

Devido a estudos com humanos serem inviáveis, o modelo animal experimental pode ser utilizado em testes médicos para se assemelhar a eventos que ocorrem entre humanos, pois suas características genéticas, biológicas e comportamento imitam os mesmos (Fady *et al.*, 2015)

Em um estudo onde foram comparadas diferentes técnicas de indução à menopausa em ratas (ovarectomia unilateral, ovariectomia bilateral e histerectomia), a ovariectomia bilateral utilizada em nosso estudo demonstrou ser eficaz e segura para simulação do processo de senescência reprodutiva em mulheres (Fady *et al.*, 2015).

1.9 Defesas antioxidantes

São substâncias ou moléculas que são capazes de eliminar os radicais livres ou inibir o processo de oxidação nas células (Alzoghaibi, 2013; Halliwell, 2007). Halliwell e Gutteridge (1995) definiram, ainda, antioxidantes como *"qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasam significativamente ou impedem a oxidação do referido substrato"*.

Os níveis de antioxidantes devem ser suficientes para manter o equilíbrio e manter a homeostase celular, evitando o estresse oxidativo (Halliwell, 2007; Alzoghaibi, 2013). Frequentemente, a produção de ERO excede a capacidade antioxidante da célula, o que resulta no estresse oxidativo (Martindale e Holbrook, 2002).

Os antioxidantes podem ser sintetizados *in vivo*, ou terem a dieta como fonte (Halliwell, 2007). Podem ser divididos entre antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Entre as enzimas antioxidantes pode-se citar: catalase, que possui a capacidade de catalisar H_2O_2 em H_2O e O_2 . A catalase (CAT) é encontrada no peroxissomo, onde são encontradas as enzimas que mais produzem H_2O_2 (Youn e Woodside 2001).

As peroxirredoxinas (Prx) possuem o mesmo papel de converter o H_2O_2 em H_2O que a CAT nos peroxissomos. Convertem também, peróxidos orgânicos em álcool e $ONOO^-$ em NO_2^- . Encontram-se predominantemente no citosol e mitocôndrias (Youn e Woodside 2001; Halliwell & Gutteridge, 2007).

A glutathiona peroxidase (GPx) possui o papel de oxidar duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG pode ser reduzida novamente pela enzima glutathiona redutase (GR) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A enzima superóxido dismutase (SOD), catalisa a dismutação de superóxido em peróxido de hidrogênio: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Este peróxido de hidrogênio deve ser removido, em seguida, pela catalase ou peroxidase. Existem três formas de SOD em tecidos de mamíferos, cada uma com um local subcelular específico (Youn e Woodside 2001)

A superóxido dismutase cobre-zinco (CuZnSOD) encontra-se no citoplasma e organelas de praticamente todos os mamíferos e possui duas subunidades proteicas, cada uma contendo um átomo de cobre e zinco cataliticamente ativo. A superóxido dismutase manganês (MnSOD) é encontrada na mitocôndria de quase todas as células e possui quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um único átomo de manganês. A superóxido dismutase extracelular (ECSOD) foi descrita por Marklund em 1982, é sintetizada por apenas alguns tipos de células, incluindo fibroblastos e células endoteliais, e é expressa sobre a superfície celular (Youn e Woodside 2001).

A glutatona-S transferase (GST) é uma enzima com um papel antioxidante importante por estar envolvida na metabolização de uma grande variedade de xenobióticos, sendo considerada uma enzima de detoxificação, formando substâncias de baixa toxicidade (Cataneo, 2003).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos, os mais citados são: vitamina C ou ácido ascórbico, Vitamina E ou α -Tocoferol, β -caroteno, ácido úrico e GSH (Birben *et al.*, 2012).

A vitamina E é lipossolúvel, presente no interior da membrana celular, o que lhe confere importante papel antioxidante contra os danos de peroxidação lipídica causados pelo radical OH^\bullet . A Vitamina C é solúvel em água, fornece capacidade antioxidante intra e extracelular pela eliminação de ERO e regenera a Vitamina E (Birben *et al.*, 2012). O β -caroteno tem características antioxidantes, pois reage com ROO^\bullet , OH^\bullet e O_2^- . O ácido úrico possui características semelhantes, porém não é capaz de eliminar o O_2^- (Sautin Johnson, 2008; Birben *et al.*, 2012).

A GSH é o principal antioxidante hidrossolúvel, abundantemente encontrada em todos os compartimentos celulares. A razão GSH/GSSG é um dos principais determinantes para o estresse oxidativo. Possui importante papel de desintoxicar H_2O_2 e peróxidos lipídicos através da GPx, sendo a GSH o cofator. Converte Vitamina C e E em suas formas ativas. GSH protege as células contra apoptose interagindo com sinalização pró-apoptótica e anti-apoptótica. Regula e ativa vários fatores de transcrição (Birben *et al.*, 2012).

1.10 Ácidos Graxos (AG)

Os ácidos graxos desempenham importantes funcionalidades nas estruturas da membrana celular e processos metabólicos, como ácidos alfa - linoléico (18:2-n-6) (AL) e o alfa-linolênico (18:3-n-3) (AAL), que participam de atividades cerebrais, transferência do O_2 para o plasma sanguíneo, síntese da hemoglobina, entre outros. São denominados essenciais, pois não são sintetizados no organismo, sendo provenientes da síntese de *novo* (Martin *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) são assim chamados, os ácidos graxos que possuem duas ou mais insaturações. Quando possuem 18 ou mais átomos de carbono, são chamados de ácido graxo de cadeia longa (AGPI-CL) e, quando acima de 20 carbonos, de ácido graxo de cadeia muito longa (AGPI-CML). O AL e o AAL são denominados como AGPI genericamente (Martin *et al.*, 2006).

1.10.1 Ômega 3 e 6

O AL e AAL dão origem aos ácidos graxos das famílias n-6 (ômega 6) e n-3 (ômega 3) através da ação das enzimas alongasse e dessaturase (Figura 7) ou então são provenientes da dieta (Martin *et al.*, 2006).

O ômega 3 é encontrado principalmente em peixes marinhos de águas frias (salmão, cavala e arenque), algumas sementes, óleos de canola, noz, soja e plantas de folhas verde escuro. O ômega 6 é encontrado em óleo vegetais de soja, girassol, milho e açafrão (Martins *et al.*, 2008).

O ômega 3 dá origem a dois importantes ácidos graxos: ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosa-hexanóico (DHA). O DHA e EPA fazem parte de numerosas funções celulares, como manter a integridade e a fluidez das membranas, síntese de eicosanóides, como as prostaglandinas, leucotrienos (LTs) e tromboxanos (Xs), e interações lipídio-proteína. O DHA está ligado ao desenvolvimento cerebral e retina (Engström *et al.*, 2009) e o EPA está relacionado como cardioprotetor com ação de inibição da agregação plaquetária, vaso dilatação e efeitos anti-inflamatórios (Martins *et al.*, 2008; Simopoulos, 1999).

Os mecanismos de efeito antioxidante do DHA e EPA vêm sendo relacionados com o estímulo de enzimas antioxidantes, efeitos anti-inflamatórios e inibição da fosfolipase A₂. Além disso, os ácidos graxos n-3 e n-6 nos lipídeos da membrana e lipoproteínas fazem ligações duplas menos disponíveis para o ataque dos radicais livres (Soleiman *et al.*, 2013).

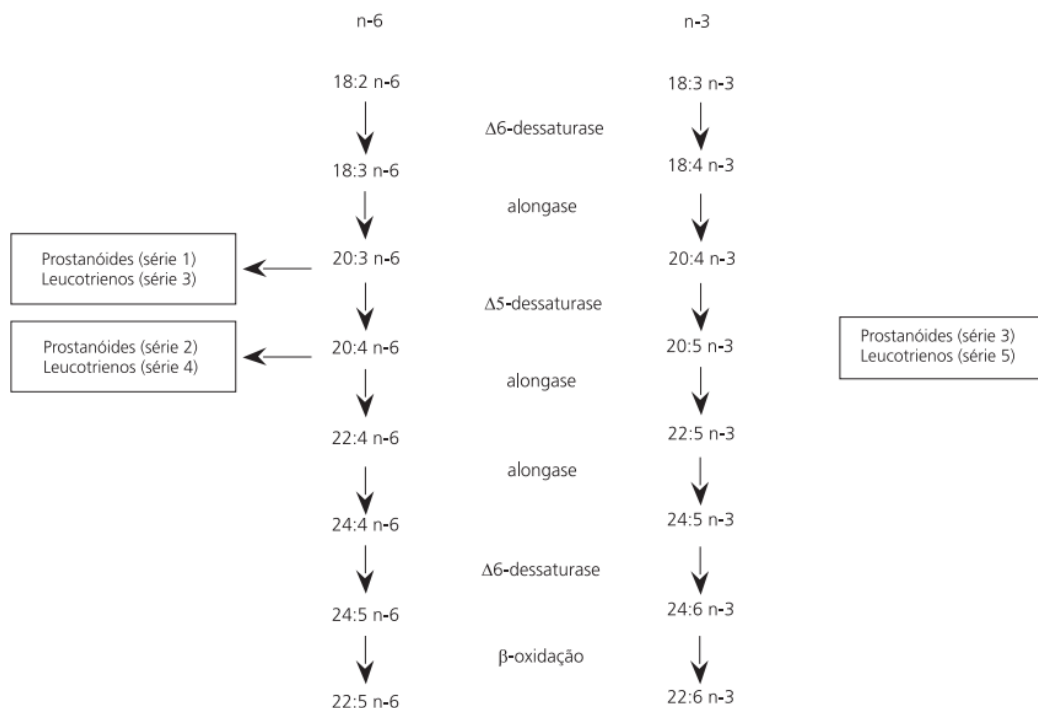


Figura 7: Metabolismo dos ácidos graxos das famílias ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3) (Martin *et al.*, 2006).

1.11 Ácido Lipoico

O ácido lipoico (AL) (1,2-ditiolano-3-pentanóico) está presente em todas as células eucarióticas e procarióticas e faz parte de desidrogenases que participam na formação de energia (Biewenga, Haenen e Bast; 1997; Moini, Packer e Saris, 2002).

O AL é uma substância endógena presente em tecidos de mamíferos, em doses muito pequenas, sendo necessário sua suplementação através da dieta. É capaz de agir intra e extracelularmente por ser anfifílico, o tornando um antioxidante universal (Durand & Mach; 2013).

São encontrados abundantemente na carne vermelha, principalmente naquelas com alta taxa metabólica, como o coração, por exemplo, e em levedura de cerveja, germe de trigo, espinafre, brócolis, ervilhas, couve de Bruxelas

(Durand e Mach; 2013). Pode ser obtido por biossíntese *de novo* de ácidos graxos e de cisteína. (Biewenga, Haenen e Bast; 1997).

O AL pode ser reduzido para ditiol DHLA, sendo esta forma a que contribui fortemente para a atividade antioxidante do mesmo. O DHLA é um redutor forte, capaz de reduzir grupos dissulfureto. O AL e DHLA fornecem ação antioxidante, também por capacidade de quelação de Fe^{2+} e Cu^{2+} e eliminação de ERO (Biewenga, Haenen e Bast; 1997; Durand e Mach, 2013) e prevenção da peroxidação lipídica (Akpinar, 2008).

O DHLA é capaz de regenerar antioxidantes endógenos (GSH, Vit C e Vit E) e reparar dano oxidativo em proteínas (Biewenga, Haenen e Bast; 1997; Durand e Mach, 2013).

O AL vem sendo utilizado como método terapêutico para diversas patologias ligadas fortemente ao estresse oxidativo, como: câncer (Durand e Mach, 2013), síndrome do olho seco (Andrade *et al.*, 2014), isquemia-reperfusão, insuficiência cardíaca e hipertensão (Ghibu *et al.*, 2009), diabetes (Rochette *et al.*, 2013), osteopenia (Fu *et al.*, 2015), entre outros.

2. OBJETIVO

Avaliar a resposta ao estresse oxidativo no coração de ratas Wistar submetidas à ovariectomia como um modelo de indução da estropausa, bem como avaliar a resposta antioxidante enzimática e não enzimática quando os animais receberam suplementação dietética com diferentes antioxidantes. Além disso, determinar os níveis dos hormônios femininos no soro.

2.1. Objetivos específicos

- Em coração de ratas ovariectomizadas dos grupos tratados com DHA, EPA e AL e nos dois grupos controle (OVX e SHAM) quantificar e comparar:
 - 1 - Os parâmetros de dano oxidativo através das análises bioquímicas de MDA e grupamentos carbonilados;
 - 2 - A atividade de antioxidantes enzimáticos através das análises bioquímicas de consumo de H₂O₂, SOD, GPx e GST;
 - 3 - A atividade de antioxidantes não enzimáticos através das análises bioquímicas de α - tocoferol(Vit E), ácido ascórbico (Vit C) e GSht;
 - 4 - A medida indireta de óxido nítrico através da quantificação de nitritos e nitratos;
- Determinar no soro dos animais, os níveis hormonais de progesterona e estradiol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo científico a ser submetido à revista *American Journal of Clinical Nutrition*.

Omega 3 or lipoic acid protect the heart of ovariectomized rats from oxidative damage

Priscila M. Marinho ^{a,b}, Tiago B. Salomon^{a,b}, Alexey S. Andrade ^{a,b}, Camile S. Behling^{a,b}, ,
Jordana S. Putti^{ab} Mara S. Benfato ^{a,b*}

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

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

*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

Key-words: Oxidative stress, heart, ovariectomy, fatty acids, lipoic acid.

ABSTRACT

Background: During menopause, metabolic disorders occur due to decline in sex hormones, which play important functions, as natural antioxidants and control of ovulatory cycles. Hormone replacement with estrogen has been discussed due to the high incidence of cancer and cardiovascular events. In order to study the physiological functions, the female rats model is widely used due to the physiological similarity with women.

Supplementation with antioxidants from different sources is an alternative to reduce menopausal symptoms, thus improving the quality of life of women who are at this stage.

Objective: To evaluate the antioxidant capacity of omega-3 and lipoic acid in the heart of ovariectomized rats.

Design: 50 Wistar female rats were divided into 4 ovariectomized groups and one group that receive anesthesia and surgical incision (SHAM): 2 control groups (SHAM e OVX) received normal diet and 1 group supplemented with fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA), 1 with docosahexaenoic acid (DHA) from the omega-3 and 1 with lipoic acid (LA), for 3 months. The biomarker analyzes were performed by quantifying enzymatic and non-enzymatic antioxidants as well as damage markers in lipids and proteins.

Results: Ovariectomy caused changes in oxidative profile of rats, showing a decreased activity of consumption of hydrogen peroxide (H_2O_2) and glutathione peroxidase enzyme (GPx) in the control group. Moreover, glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) and total glutathione (tGSH) levels were elevated in this group. The supplementation showed recovery of normal levels of consumption of H_2O_2 , GPx activity and GSH in the treated rats. The levels of protein damage were lower in treated groups compared to SHAM, in the group treated with LA. The levels of damage in lipids were lower in the groups treated with DHA, EPA and LA, compared with the control group.

Conclusion: The results suggest a protective effect of lipoic acid and omega-3 in the heart of rats against the oxidative damage. These effects possibly extend to women who can make use of these antioxidants in the form of supplements.

Introduction

Menopause is a consequence of reproductive aging that leads to a drop of estrogen hormone and its protective effect, ceasing the reproductive function of women, occurring on average at 51 years of age (1,2).

It is characterized by the appearance of various disorders that disturb women in this period, including vasomotor symptoms such as hot flushes and night sweats, vaginal symptoms such as loss of lubrication, dyspareunia and urogenital atrophy, urinary incontinence, insomnia, depression, anxiety, mood disorders, memory loss, fatigue, headache, joint pain, and weight gain (2,3).

Estrogen plays an important role as an antioxidant due to the phenolic ring in its structure, which inhibits the 8-hydroxylation of guanine DNA bases (1). Estrogen also acts in cardiovascular protection and metabolism of plasma lipoproteins, preventing the formation of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation and as a modulator of endogenous antioxidant enzymes (4).

The decrease in estrogen levels combined with disabilities in antioxidant defenses generates oxidative stress (1). Studies show that the progressive loss of estrogen, and its antioxidant effects, leads to a redox imbalance that generates vasomotor disorders, cardiovascular diseases (5-7), neurodegenerative diseases (8) and osteoporosis (9-11).

The changes caused by the lack of ovarian hormones are significant decrease in weight gain, uterine atrophy, increased blood peroxidase activity (CAT and GPx), decreased non-enzymatic antioxidants in plasma and an increase in protein carbonization (12).

Experimental animal models have been used in order to substitute studies in humans. To study similar physiological functions, the model of female rats is widely used by presenting standards similar to women with several features and common endocrine disorders, such as decline in the follicles, irregular cycling, steroid hormone fluctuations and irregular fertility. Fady *et. al* (2015) demonstrated that bilateral ovariectomy in rats is a safe and effective technique for menopausal model (13).

Thus, diets and supplements with antioxidants can be an effective strategy to alleviate symptoms and complications associated with oxidative stress affecting menopausal women, significantly decreasing their quality of life (1).

Considering the absence of a specific study using polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and lipoic acid (LA) in an attempt to prevent oxidative damage in the heart of rats in an experimental model of menopause, we tried to assess the parameters of oxidative profile after the use of docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and LA.

2. Material and Methods

2.1. Animals

This study employed 50 Wistar female rats (*Rattus norvegicus*) with three months old. The animal was kept on a 12 h light/dark cycle and at temperature of 24 ± 1 °C, with standard lab chow and drinking water *ad libitum*. The rats were divided into five groups of ten animals each. Four groups were subjected to bilateral ovariectomy and one group was operated, but without removal of the ovaries (SHAM group).

The surgical procedure was performed under general anesthesia with a combination of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg) intraperitoneal. Right after the surgery and still under anesthesia, the rats received a combination of antibiotics (procaine benzilpencilin 10.000.000 UI + benzatine benzilpenicillin G 10.000.000 IU + dihidrostreptomycin 10.500 mg) associated with an anti-inflammatory (piroxican 1.000 mg) intramuscular 0.1 mL/100 g (PPU Pencivet Plus ®, Intervet / Schering -Plough Animal Health). After surgery, the animals received analgesia with acetaminophen (Paracetamol®, MSD) at a dose of 200 mg/kg, diluted in the drinking water of the animals, for 3 days.

After the period of study of 16 weeks, the animals were anesthetized again for removal of the heart and withdrawal of blood for hormonal dosage. Estral cycle phases in rats were determined by examining the vaginal smear, which was made before surgery in all groups and before euthanasia in the SHAM group, in order to perform the study assays at the same hormonal stage (diestrous) (14).

All animal studies were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (project 20137).

2.2. Diets

Animals were acclimated to a nutritionally balanced diet comprising 22% proteins, 5% cellulose, 4% fatty acid, 1.4 % calcium, 0.8 % phosphorus and 60% starch with added vitamins, minerals and antioxidants (Nuvilab®, Brazil), for 1 week prior to ovariectomy according to AIN93 (15). All diets had a total of 4% fat and at least 2% of corn, soybean

and wheat oils, amount slightly above the minimum required to prevent a deficiency of long chain omega-6 polyunsaturated fatty acid (1%). One week after surgery, animals were randomly assigned to five groups: one control group sham-operated (SHAM) and one ovariectomized group (OVX) received standard diet; operated animals that received supplementation were divided in 3 groups according to the diet supplemented, in this case (DHA, EPA and LA).

The DHA group received dietary supplementation with predominance of docosahexaenoic acid ethyl ester (1g/kg body weight/day DHA plus 0.2 g/kg body weight/day EPA), EPA group with predominance of eicosapentaenoic acid ethyl ester (1g/kg body weight/day EPA plus 0.2 g/kg body weight/day DHA) and LA group with supplementation of alpha-lipoic acid (180 mg/kg/day). All five groups received the diets for a period of 16 weeks. The diets were formulated with fish oil and alpha-lipoic acid blended into the experimental diet on a daily basis in order to prevent fatty acid oxidation and loss of antioxidants before their use.

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

2.3. Blood collection

Before perfusion, blood was collected by puncturing the left ventricle of the heart. Fresh blood was centrifuged for 4 min at $320 \times g$, and the serum was separated for subsequent radioimmunoassay.

2.4. Heart dissection and processing

Animals were euthanized according to the experimental protocol (16). All animals were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After perfusion using a saline infusion, the heart was removed, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen for later analysis.

For analysis, the heart of each animal was processed with manual maceration in petri plates, using scalpels. The samples were sonicated 2x (Cole-Parmer® Ultrasonic Homogenizer Series 4710 /USA) in buffer (30 mmol/L phosphate 120 mmol/L KCl, 100 µmol/L PMSF, 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.

2.5. Hormonal level measurements

The levels of progesterone and 17β-estradiol in serum were estimated by RIA solid phase using Coat-A-Count DPC kits (Diagnostic Products Corp. / USA), direct method whose principle is based on the competition between the standard antigen and samples with a constant amount of marked antigen as the tracer (¹²⁵I) for specific antibody-binding sites. The amount of non-radioactive antigen in the sample to be measured is inversely proportional to the amount of labeled antigen. The complex antigen antibody is precipitated to separate the bound form freely, then proceed to count on gamma counter (17). The results were expressed in pg/ml of blood serum curve. All assays were done independently in triplicate.

2.6. Assays for enzyme activities in heart tissue

The consumption of H_2O_2 was mensurated via absorbance at 240 nm (18). The activity was expressed as U/mg of protein; 1 U was defined as the capacity to consume 1 μmol of H_2O_2 /min. We used the term “consumption of H_2O_2 ” due the fact that there are 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 peroxidase (GPx) activity was evaluated by measuring the oxidation of NADPH (using absorbance at 340 nm) in the presence of reduced glutathione, glutathione reductase, and tert-butyl hydroperoxide (19). GPx activity was expressed as U/mg of protein, where 1 U was defined as the capacity of the enzyme to oxidize 1 μmol NADPH/min.

Glutathione S-transferase (GST) activity was measured by the GST - catalyzed reaction of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with reduced GSH using absorbance at 340 nm (20). GST activity was expressed as U/mg of protein; 1 U was defined as the capacity of the enzyme to produce 1 μmol of GS-DNB per minute.

The total superoxide dismutase (tSOD) activity was measured using the RanSOD® kit (Randox, UK), with absorbance measured at 505 nm. The assay principle is based on the reaction of xanthine-xanthine oxidase, to form superoxide radical, which reacts with 2-(4-odophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) to form a red formazan dye. tSOD activity was expressed as U/mg of protein and 1 U was defined as the capacity of the enzyme to inhibit 50% of I.N.T. oxidation.

2.7. Assays for antioxidant molecules in heart tissue

Vitamin C (Vit C) levels were assayed by HPLC employing a reverse-phase SUPERCOSIL™ LC-18-DB HPLC Column (15 cm × 4.6 mm, 5 μm), using a mobile phase (30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol in a ratio of 9:1, v/v)) flow rate of 1 mL/min, and a sample size of 25 μL. The absorbance of the column effluent was monitored at 250 nm (21). Under these conditions, the retention time of Vit C was 2.1 min. The Vit C level was expressed as μmol of Vitamin C/mg of protein.

Vitamin E (Vit E) levels were assayed by HPLC employing a reverse-phase SUPERCOSIL™ LC-18-DB HPLC, using a mobile phase methanol and water (in a ratio of 96,5/3,5), flow rate of 2 mL/min, and a sample size of 25 μL. The absorbance of the column effluent was monitored at 295 nm. Under these conditions, the retention time of Vit E was 5 min. The Vit C level was expressed as μmol of Vitamin E/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 (22). Briefly, we used 20 μL of potassium phosphate 0.1 mol/L to calibration curve and 20 μL of tissue extract sample. Was added 120 μL of DNTB plus GR and after 30s added 60 μL of NADPH. Color development was read at 412 nm and the level was expressed as μmol of glutathione/mg of protein.

2.8. Assays for oxidative damage in heart tissue

As an index of protein damage, carbonyl levels were measured using absorbance at 370 nm (23). Briefly, tissue extract aliquots (50 μ L) were added with either 2 mol/L HCl or 10 mmol/L 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/L HCl and incubated at 37°C for 90 min. Samples were centrifuged (8000 \times g, 10 min) and 75 μ L of 28% trichloroacetic acid was added. Samples were centrifuged again (8000 \times g, 10 min), and the excess DNPH was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1 (v/v). The samples were centrifuged again (8000 \times 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 M⁻¹ 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 employing a reverse-phase SUPERCOSIL™ LC-18-DB (Column; 15 cm \times 4.6 mm, 5 μ m), using a mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v). Samples were injected in a volume of 25 μ L. The absorbance of the column effluent was monitored at 250 nm during 10 minutes. 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.

2.9. Assays for indirect nitric oxide levels

As an index of indirect nitric oxide levels, a variation of the Griess test was used to determine total nitrate and nitrite levels (24). Briefly, we used 50 μ L of sample and 50 μ L for standard curve added with 50 μ L of Griess reagent. Color development was read at 543

nm and the level was standardized by sodium nitrite and expressed as nmol of NO₂/mg of proteins.

All results were normalized to protein concentration using BSA (bovine serum albumin) as a standard in the Bradford assay (23). All assays of this study were independently performed in triplicate.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA and multiple comparisons for the variables that showed significant differences were performed using the *post hoc* Bonferroni. Analysis of the weight of the animals was performed with factorial ANOVA of repeated measures. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. Data was expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was accomplished with the support of the Statistical Nucleus of the Federal University of Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS).

3. Results

3.1 Animal weight

The initial and final body weights of the rats during the study are shown in Table 1. The average food intake was 17.4 g of feed per day, and the ovariectomized groups DHA (20.5 g) and EPA (19.7 g) presented a significant increase in the food intake compared to the SHAM (15.9 g), LA (16.0 g) and OVX (16.6 g) groups. At the end of the study, weight gain was significant in all groups when compared to the initial body weight of the same group.

Table 1. Initial and final weight of the animals.

	SHAM	DHA	EPA	LA	OVX
Initial weight (g)	211.8±19.2	223.8±19.6	190.2±12.1	217.2±19.7	224.5±15.3
Final weight (g)	262.8±22.3#	311±44.7#*	299.4±21.1#*	284.9±19.3#	297.2±28.4#

Results are expressed as mean ± S.E.M. *Significant difference from SHAM group final weight. #Significant difference between the final weight and the initial weight in the same group. $p \leq 0.05$.

3.2 Hormonal level measurements

The estrogen hormone levels were decreased in the OVX group compared to the SHAM group, thus confirming the induction of surgical estropause (Figure 1).

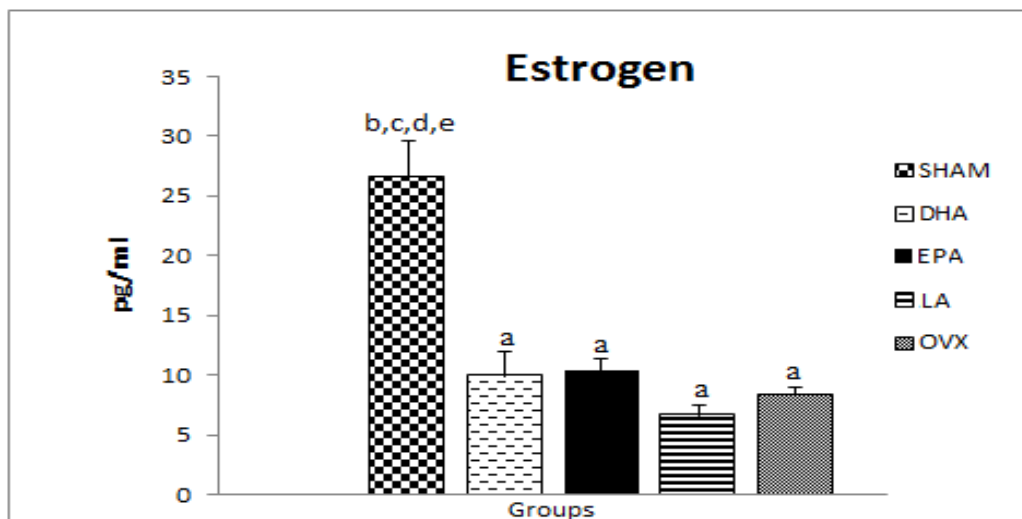


Figure 1: Hormone levels of estrogen in serum. Results are expressed as mean ± S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; b- significant difference from the DHA

group; c- significant difference from the EPA group; d- significant difference from the LA group; e- significant difference from the OVX group. $p \leq 0.05$.

3.3 Assays for enzyme activities in heart tissue

The OVX group showed a significant increase in the consumption of H_2O_2 compared to the SHAM group and in relation to the treated groups. The treatment groups were not significantly different when compared to SHAM group. The groups treated with DHA, EPA and AL showed no significant differences from one another. The results suggest that the consumption of H_2O_2 returned to normal levels when compared to the SHAM group after fatty acid supplementation (Fig. 2A).

The glutathione S-transferase activity in the OVX group showed a significant increase when compared to the SHAM group and in relation to the treated groups. The treatment groups were not significantly different when compared to SHAM group. The groups treated with DHA, EPA and LA showed no significant differences among each other. The results suggest that supplementation was able to effectively restore the activity of GST returning it to the same level as the SHAM group (Fig. 2B).

The OVX group showed a significant increase in SOD activity when compared to the SHAM group and in relation to the treated groups. The treatment groups were not significantly different when compared to SHAM group. The groups treated with DHA, EPA and AL showed no significant differences among each other. The results suggest that supplementation were actually capable of restoring the activity of superoxide dismutase, returning it to normal levels (SHAM group) (Figure 2C).

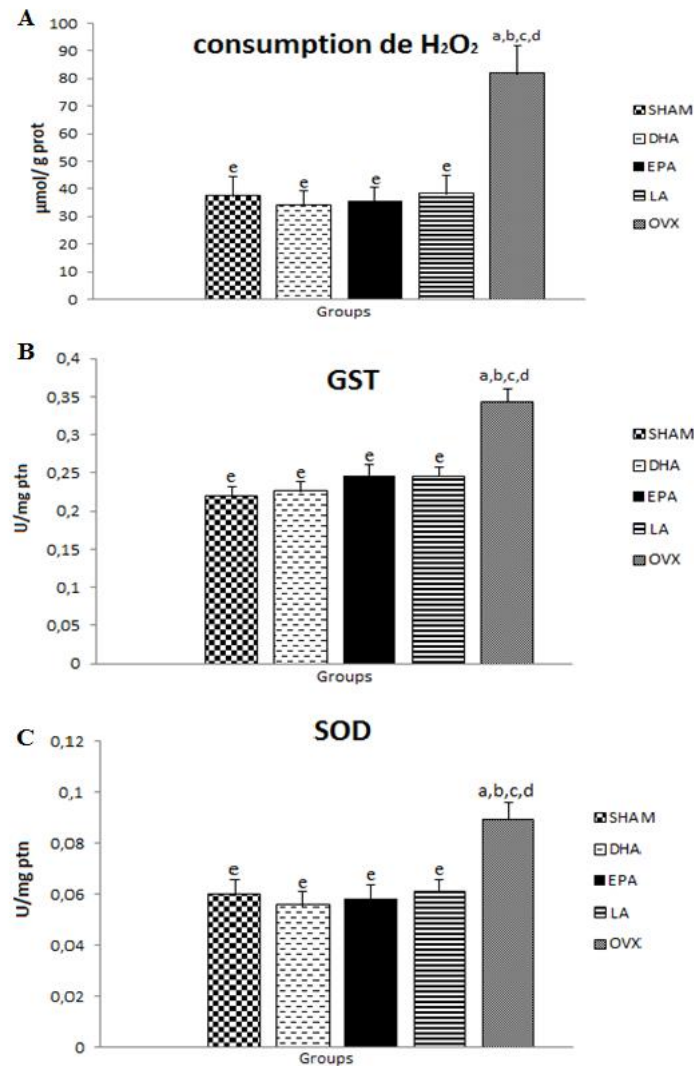


Figure 2: Antioxidants enzymes activities (consumption H₂O₂, GST and SOD). Results are expressed as mean \pm S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; b- significant difference from the DHA group; c- significant difference from the EPA group; d- significant difference from the LA group; e- significant difference from the OVX group. $p \leq 0.05$.

The GPx activity of the OVX group was significantly lower than the SHAM group. The DHA supplemented group was significantly higher than the OVX group and SHAM group, thus indicating that treatment with DHA was able to increase the concentration of the

antioxidant enzyme. The groups treated with EPA and LA showed no significant difference when compared with the other groups (Figure 3).

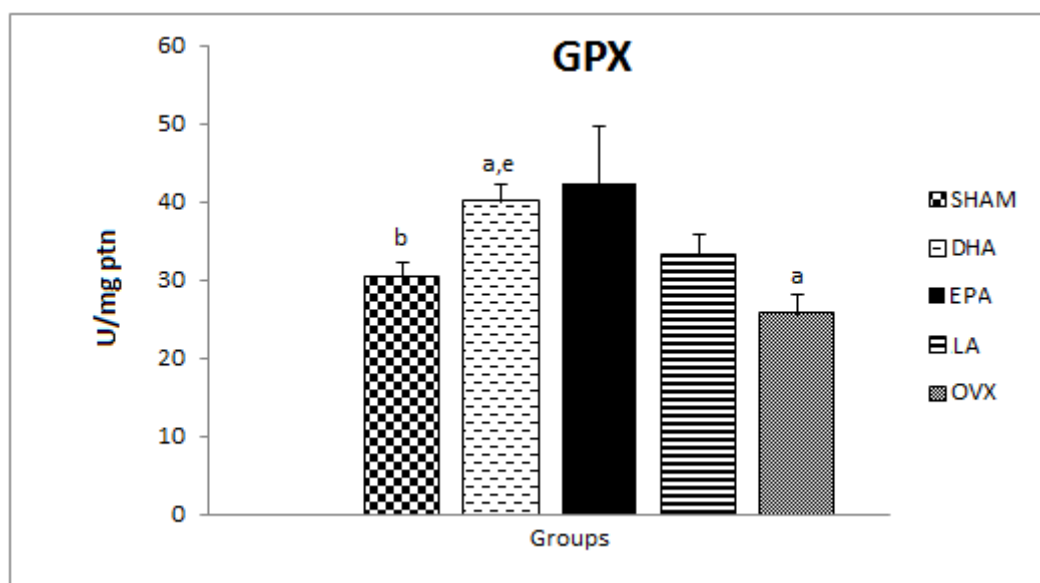


Figure 3: Glutathione peroxidase activity in the heart. Results are expressed as mean \pm S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; b- significant difference from the DHA group;

3.4 Assays for antioxidant molecules in heart tissue

Regarding Vit C levels, the OVX group had no significant difference when compared to the SHAM group and groups treated with DHA, EPA and LA. The SHAM group showed no significant difference when compared to the treated groups. When the comparison was between the treated groups, there were no statistical differences (data not shown).

Vit E levels in OVX group showed no significant differences when compared to the SHAM group. Between the treated groups when compared to SHAM group, only treatment with EPA showed a significant difference. Among the supplemented groups, Vit E was

higher in the EPA group in relation to the LA group. A supplementation with EPA led to an increase of Vitamin E (Figure 4).

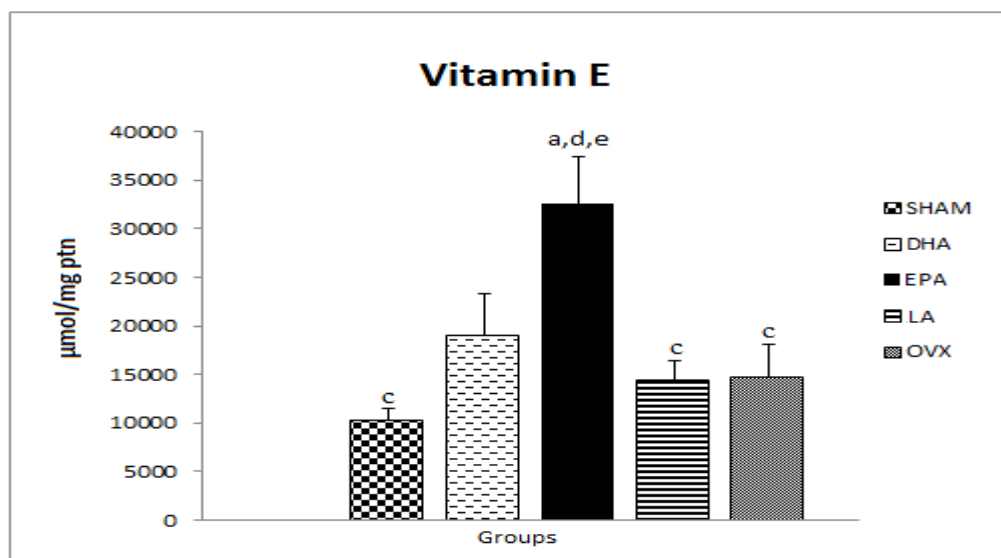


Figure 4: Vit E levels in the heart. Results are expressed as mean \pm S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; c- significant difference from the EPA group; d- significant difference from the LA group; e- significant difference from the OVX group. $p \leq 0.05$.

GSHt in the OVX group showed a significant increase when compared to the SHAM group and in relation to the treated groups. The treatment groups were not significantly different when compared to SHAM group. The groups treated with DHA, EPA and LA showed no significant differences. The results suggest that the supplementations were actually able to restore the total glutathione levels and brought them back to normal levels when compared to SHAM group (Figure 5).

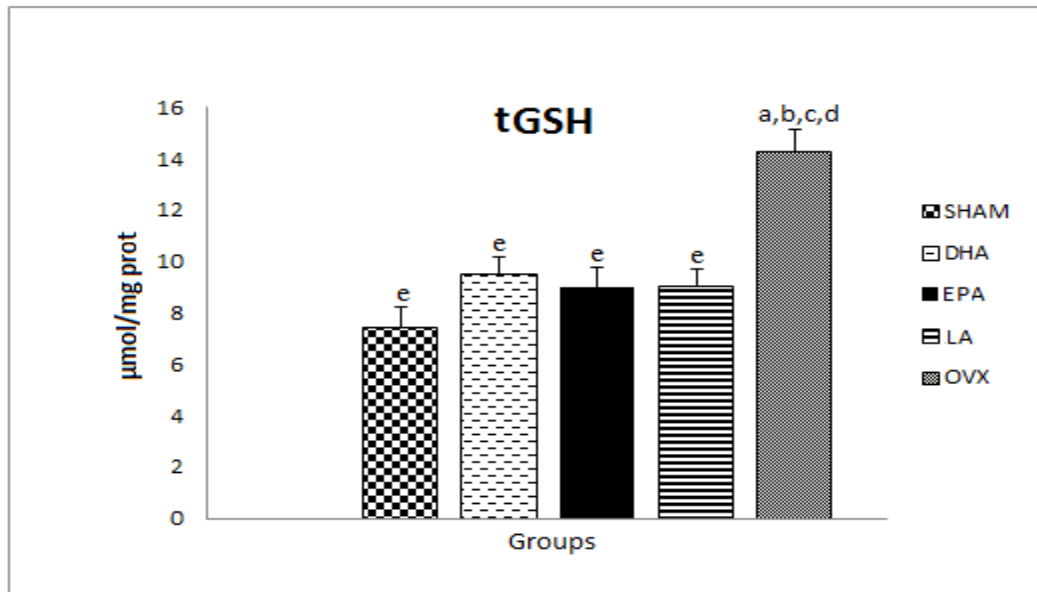


Figure 5: Total glutathione levels in the heart. Results are expressed as mean \pm S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; b- significant difference from the DHA group; c- significant difference from the EPA group; d- significant difference from the LA group; e- significant difference from the OVX group. $p \leq 0.05$.

3.5 Assays for oxidative damage in heart tissue

Regarding the oxidative damage, the OVX group had less carbonylated proteins than the SHAM group. The levels in the DHA group, EPA and LA were significantly lower when compared to SHAM group. When the comparison was between the supplemented groups, DHA was similar to the other treated groups and EPA showed a higher level of carbonylation when compared to the group treated with LA, thus suggesting the ovariectomy apparently led to a reduction in the levels of carbonylated proteins (Figure 6).

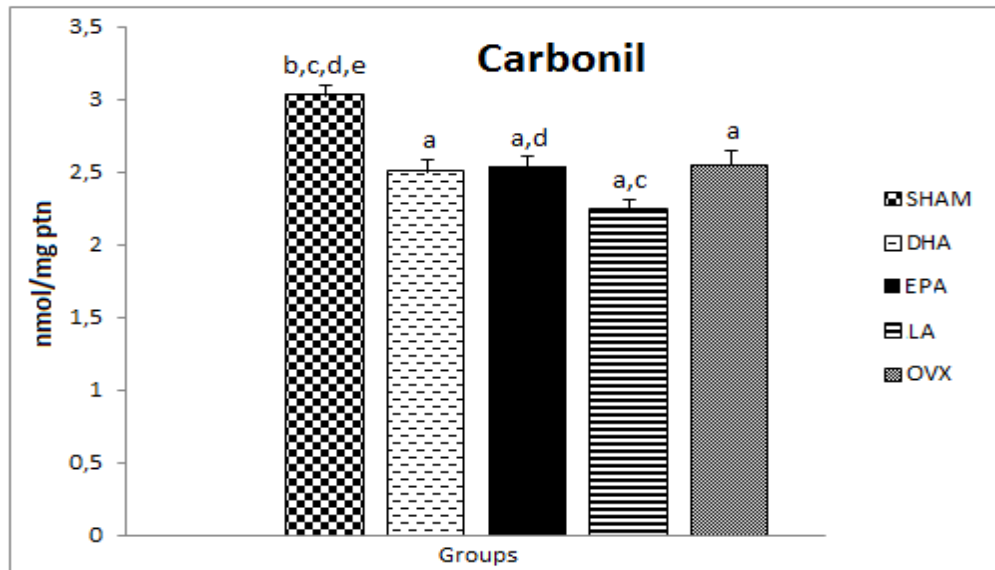


Figure 6: Protein carbonylation in the heart. Results are expressed as mean \pm S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; b- significant difference from the DHA group; c- significant difference from the EPA group; d- significant difference from the LA group; e- significant difference from the OVX group. $p \leq 0.05$.

MDA levels in the OVX group showed a significant increase compared to the SHAM group. The groups treated with DHA, EPA and LA showed no significant difference from the SHAM group. When the comparison was between the groups with treatment, there were no significant differences between them. When compared with OVX treated groups, the LA group had lower levels of MDA, thus suggesting that supplementation with AL was able to effectively protect the treated group against damage to lipids caused by ovariectomy (Figure 7).

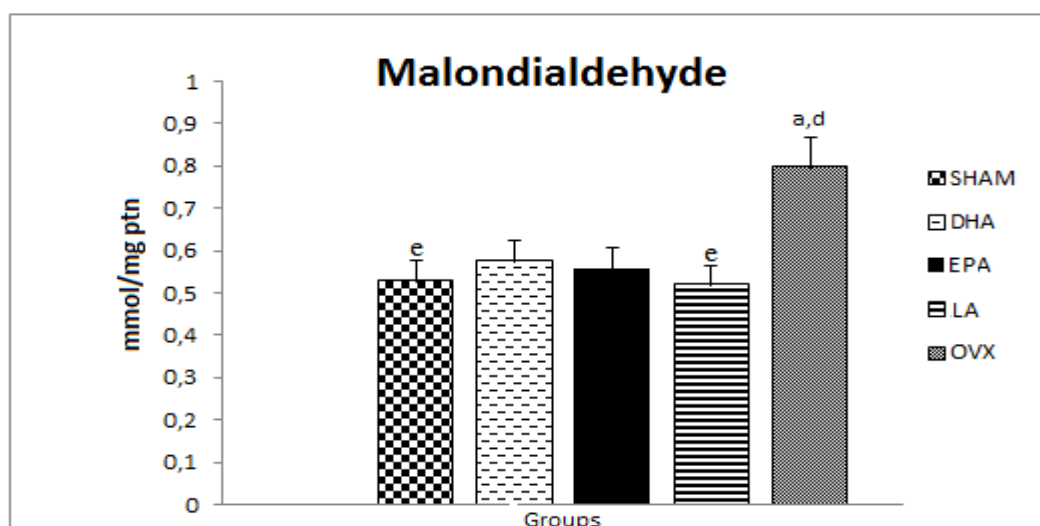


Figure 7: Malondialdehyde levels in the heart. Results are expressed as mean \pm S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; d- significant difference from the LA group; e- significant difference from the OVX group. $p \leq 0.05$.

3.5 Assays for indirect measurement of nitric oxide in heart tissue

The levels of nitrites and nitrates in the OVX group had no significant difference compared to the SHAM group and groups treated with DHA, EPA and LA. The SHAM group showed no significant difference when compared to the treated groups (data not shown). No statistical difference was found in the comparison between the treated groups, which suggests that ovariectomy and treatment with the fatty acids did not correlate with the NO levels in the heart.

4. Discussion

According to Žitňanová *et al.* (2011), oxidative stress manifests itself increasingly, starting from the perimenopause, with a significant increase in damage markers (24). Menopause is

associated with oxidative stress and cardiovascular diseases (27-29), and the oxidative damage that occur during menopause, is often related to the lack of estrogen that exerts an antioxidant function (4, 30).

The cardiovascular protective action associated with the estrogen is through direct effect on vessel walls where there are receptors on smooth muscle and endothelial cells. Estrogen promotes vasodilation in humans and experimental animals by stimulating the synthesis of prostacyclin and NO (31). It is known that estrogens also act as free radical scavengers and stop the chain reaction caused by oxidative damage in the membrane, therefore inhibiting the oxidation of lipids and proteins (32).

Thus, in the present study, we used an experimental menopausal model with bilaterally ovariectomized rats, a widely used model for this purpose, being able to reproduce the physiological and redox imbalance that occur in menopausal women (12, 28, 33). The success in surgical induction can be confirmed by observing the levels of estrogen in the rats that have undergone such a procedure (Figure 2). The experimental model of ovariectomized female rats can accurately simulate menopause in women (13).

Regarding the weight of the animals, it was observed that the animals that received the dietary supplementation with omega-3 (DHA and EPA) had a greater weight gain. By comparing the initial and final masses of animals of the same group, it was observed that all had a significant weight gain over time, as expected (Table 1).

Supplementation is a great alternative to alleviate the symptoms and damage caused by menopause. Studies have shown that supplementation with polyunsaturated fatty acids

(omega-3) (29,34) and lipoic acid (35) have antioxidant properties being effective against oxidative damage.

Studies show that diets with low levels of DHA and EPA are associated with increased risk of coronary heart disease (36,37). Some authors suggest that n-3 polyunsaturated fatty acids may reduce the risk of coronary heart disease by acting in cardiac arrhythmias (38,39), anti-inflammatory process (40-43) and being anti-apoptotic (41). In a study with dogs submitted to myocardial infarction, supplementation with n-3 fatty acids had protective effects against ventricular arrhythmia, even with the presence of arterial occlusion (44).

According to Fang *et al.* (2011), a diet rich in n-3 PUFA has an antioxidant effect capable of preventing arterial dysfunction, blood pressure and improve cardiac output by stimulating the antioxidant system (45), which agrees with findings Gorton *et al.* (2013), who studied 30 ovariectomized rats supplemented with n-3 PUFA (0.8 g / kg) which showed restoration of endothelial function and reduced oxidative stress. In both studies, one can see a resemblance to our findings in decreased oxidative stress after supplementation with n-3 PUFA (28).

In the present study, we measured parameters of enzymatic and non-enzymatic antioxidants and also the damage to proteins and lipids, in order to evaluate the possible protective potential of supplementation. Among the enzymatic antioxidants: GPx, GST, SOD and indirect measurement of CAT / Prx by measuring H₂O₂ consumption. The non-enzymatic antioxidants measured in this study were: Vit C, Vit E and GSHt. For damage to

proteins we measured the amount of protein carbonyls and damage to lipids (MDA levels). We measured also nitrites and nitrates as an indirect measure of NO.

In this study there was a change in oxidative profile in the group of ovariectomized rats (estrogen withdrawal), with increased consumption of H₂O₂, GST and SOD (Figure 2) activities, tGSH levels (Figure 3) and the increase in MDA levels (Figure 7). This increase of antioxidants is similar to other studies which suggest that loss of estrogen leads to increased levels of the antioxidant defenses in an attempt to mitigate the oxidative damage (12, 28).

In this study the GPx, enzymatic antioxidant that acts in the degradation of peroxides and uses GSH as a cofactor in the oxidation of GSSG (4), was significantly increased in the group supplemented with DHA, unlike that in other work group that evaluated the antioxidant role in an experimental model dry eye (46). The ovariectomized and supplemented rats with DHA, EPA and LA achieved a significant improvement in tear production in all supplemented groups, however, supplementation with LA was able to alter the metabolism of reactive nitrogen species in the lachrymal gland, causing increased peroxidases and full restoration of tear production. Dietary supplementation with DHA showed no effect on the lacrimal gland, however, supplementation with EPA increased lipid peroxidation and GPx activity (46).

The GST, involved in detoxification of xenobiotics, and SOD, which catalyzes the dismutation of superoxide into H₂O₂ (4), in this study had their activities restored through supplementation, compared to the control group. The increase in SOD corroborates the findings from Avramovic *et al.* (2012) who demonstrated that supplementation with DHA

and EPA is also capable of reducing oxidative damage in the brain of Wistar rats, decreasing lipid peroxidation and increasing antioxidants levels such, as SOD (47). The H₂O₂ consumption was also restored with supplementation in this study. In rat erythrocytes, supplementation with n-3 PUFA resulted in an increase of H₂O₂ consumption and decreased lipid peroxidation with a significant reduction of MDA (48).

In a recent study conducted by our group, the levels of oxidative damage in the brains of the same rats in this study were evaluated. The results showed that supplementation with DHA resulted in an increase in all tested antioxidant (GPx, GST, SOD, CAT / Prx, Vit C and GSht) (49). In contrast DHA showed pro-oxidant properties, corroborating other works, (50,51), with increased levels in MDA and carbonylated proteins. Dietary supplementation with LA showed a protective effect with increased H₂O₂ consumption, suggesting an increase of CAT and Prxs and decreased protein carbonylation and MDA.

When quantified, GSht levels in all supplemental groups were able to recover this antioxidant causing them to return to normal (SHAM group). GSH is the most abundant intracellular antioxidant; it serves as a substrate for other enzymes, GPx for example, and is oxidized (GSSG) by react with free radicals. GSH acts as a scavenger of free radicals (4) and quantified in this study because of its importance in controlling the redox state of organisms. Kim and Chung (52) obtained increased GSH levels in rat kidney cells and macrophages when used in vitro DHA and EPA. In the same study, the authors demonstrated levels of reactive species, diminished levels of inflammatory mediators and nitrate were regulated by EPA and DHA, strongly suggesting the antioxidant and anti-inflammatory properties.

Balkis *et al.* (53) demonstrated the antioxidant role of LA when diabetic rats were supplemented for 8 weeks, and showed an increase of SOD, Vit C, decrease MDA and DNA damage. Furthermore, LA reduced glucose levels and dyslipidemia in supplemented rats (53). According Parcker, Tritschler and Wessel (54), the LA has the capacity to act amid hydro and lipid soluble, is an important antioxidant able to regenerate Vit C, Vit E and GSH (35,54, 55) and still operates in ischemia-reperfusion, injury brain, mitochondrial dysfunction, diabetes and diabetic neuropathy, inborn errors of metabolism, and other brain damage caused by free radicals (54,55).

In this study, supplementation with LA resulted in no change in the profile of Vit C and Vit E, but was able to restore the levels of GST, SOD, CAT/Prx and tGSH. Moreover, the rats supplemented with LA showed a lower MDA levels (lipid peroxidation), and like other supplementation, reduced the protein carbonylation.

Hadi, Lester and Nils showed the antioxidant properties of LA through its ability to eliminate free radicals and restore reduced levels of other antioxidants. However, there is evidence that LA can exert a pro-oxidant capability as seen in isolated mitochondria of rat liver hepatocytes, promoting permeability changes (56).

Martins *et al.* (57) demonstrated that ovariectomy increases lipid peroxidation , corroborating to our results, demonstrated by the significant increase in MDA in OVX group (Figure 10). As mentioned above, supplementation with LA was able to protect against lipid peroxidation and significantly lower than the OVX group (without supplementation).

Lipid peroxidation are chain reactions that affect the structure of cell membrane initiated by the attack by reactive species, resulting in extensive damage. MDA is a byproduct of lipid peroxidation, widely used as a marker for such damage (4), being formed by decomposition of primary and secondary lipid (58).

According to Mendez *et al.* (59), supplementation with DHA and EPA decrease the carbonylation of proteins, which was also observed in our results (Figure 9), however, the carbonylation levels in OVX group was also minor, without statistical differences between groups.

Protein damage can arise directly by free radical attack or indirectly involving attack of by-products of lipid peroxidation. These damages are harmful to cells as it can alter the function of the receptors, signal transduction and transport proteins and enzymes, one being considered as a marker of oxidative damage (4).

In the present study, the levels of Vit C across the supplemented groups showed no significant differences. This result can be explained by the fact that rats synthesize Vit C in the liver, a process which does not occur in primates, requiring intake to obtain Vit C (60). Vit C is an important antioxidant, since it acts as electron donor preventing the oxidation of other compounds, in addition to prevent the principle of lipid peroxidation (4).

When quantified, Vit E (Figure 7) in the group supplemented with EPA had a significant increase. The vitamin E plays an important role for non-enzymatic antioxidant and has the ability to block the propagation of lipid peroxidation step (4).

The levels of nitrite and nitrates (indirect measure of NO), showed no significant differences between the groups. The NO under physiological conditions, in small amounts, has biological effects such as vasodilation, cell signaling, prevent platelet aggregation, suppression of inflammatory processes, among others. In large quantities, the NO can react with ROS to form peroxynitrite and radicals harmful to the cell (4, 61).

According to Ho *et al.* (62), the more promising biomarkers of oxidative stress, in heart, are those that are closely related to the pathophysiology of the organ. The authors report that one of the difficulties of quantifying biomarkers would be their very short half-life.

Increased ROS in the heart can generate catastrophic events in mitochondrial DNA (mtDNA) generating functional decline and cell damage and could affect directly the contractile function of the organ, causing heart disease. GPx is an important antioxidant enzyme, found in relatively high quantities in the heart especially in mitochondrial and cytosolic compartments, which together with other antioxidants, maintains the redox balance of cardiac cells (63, 64).

To date, there is no research involving assessment of oxidative stress in the heart of rats after supplementation with lipoic acid, and few involving this organ assessing oxidative stress after the use of omega-3.

It can be observed in this study that supplementation with DHA, EPA and LA can restore normal levels of the antioxidant enzymes, GST, SOD and H₂O₂ consumption (indirect measurement of catalase and peroxiredoxins), as well as the levels of the non-enzymatic antioxidant GSht. It was also seen that the DHA was able to increase the levels of GPx and

EPA was more efficient to induce an increase in levels of Vit E. When we evaluated the quantification of MDA, the group supplemented with AL showed a significant drop.

This study suggests the possible protective effect of omega-3 and LA, reducing oxidative damage by stimulating the generation of antioxidants, with a highlight for LA, which was more effective in protecting lipid peroxidation.

5. References

1. Agarwal A, Selkhon LH. Studies on Women's Health. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, Chapter 11: The Menopause and Oxidative Stress. Springer Science+Business Media New York. 2013: 181-203
2. Grady D. Management of Menopausal Symptoms. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2338-47.
3. Victorino VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR, Herrera AC, Cecchini AL, Cecchini R.. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *Age.* 2013; 35: 1411-21.
4. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th ed. Oxford: Oxford University Press. 2007
5. Becker BN, Himmelfarb J, Henrich WL, Hakim RM. Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8: 475–86.
6. Bittner V. Menopause, age, and cardiovascular risk: a complex relationship. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54: 2374–75
7. Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. Relationship between serum sex hormones and coronary artery disease in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 695-701.

8. Thakur Mk, Sharma PK. Aging of brain: Role of estrogen. *Neurochem Res.* 2006; 31: 1389-98.
9. Khan A, Fortier M, Menopause and Osteoporosis Working Group, Reid R, Abramson BL, Blake J, Desindes S, Graves L, Guthrie B et al. Osteoporosis in Menopause. *J Obstet Gynaecol Can* 2014; 36: 839-43
10. Hernandez CJ, Beaupré GS, Carter DR. A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003; 14: 843-47.
11. Management of postmenopausal osteoporosis: position statement of The North American Menopause Society: Retracted. The North American Menopause Society. 2006; 9: 84-101
12. Behr GA, Schnorr CE, Simoes-Pires A, da Motta LL, Frey BN, Moreira JC. Increased cerebral oxidative damage and decreased antioxidant defenses in ovariectomized and sham-operated rats supplemented with vitamin A. *Cell Biol Toxicol.* 2012; 28: 317-30.
13. Fady MS, Hesham AS, Radwa AM, Bedor SA. Comparative study on induction and effects of surgical menopause in a female rat model: a prospective case control study. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 9403-11.
14. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neil JD, editors. *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press. 1994: 613-58.
15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents – final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123: 1939-51.

16. Hackenhaar FS, Salomon TB, Alabarse PV, Ehrenbrink G, Benfato MS. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochem Funct.* 2009; 27: 378-82.
17. Paz RC, Adania CH, Oliveira CA, Barnabe RC. Validação de conjuntos diagnósticos comerciais para dosagem sérica de progesterona e estradiol em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-matopequeno (*Leopardus tigrinus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2009; 46: 237-44.
18. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-26
19. Pinto RE, Bartley W. Effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J.* 1969; 112: 109-15
20. Tsuchida S. Glutathione transferase. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species.* Oxford University Press. 2000: 83-5
21. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC Asia Pacific.* 2004; 7: 36-9
22. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006; 1: 3159-65.
23. Levine RL, Garland D, Oliver Cn, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymol.* 1990; 186: 464-78.

24. Grisham M, Johnson G, Lancaster JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 237-46.
25. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
26. Žitňanová I, Rakovan M, Paduchová Z, Dvořáková M, Andrežalová L, Muchová J, Šimko M, Waczulíková I, Ďuračková Z. Oxidative stress in women with perimenopausal symptoms. *Menopause.* 2011; 18: 1249-55
27. Sánchez RMA, Zacarías MF, Arronte RA, Correa EM; Mendoza NVMI. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause.* 2012; 19: 361-67
28. Gortan CG, Losurdo P, Mazzucco S, Panizon E, Jevnicar M, Macaluso L, Fabris B, Barazzoni R, Biolo G, Carretta R, et al. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *J Nutr Biochem.* 2013; 24: 371-79.
29. Mendoza C, Zamarripa C. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases – A Role for Antioxidants. *Chapters 12: Menopause Induces Oxidative Stress* 1th ed. 2013: 289-316
30. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 1-28
31. Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MHC. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36: 1143-58

32. da Rocha JT, Pinton S, Mazzanti A, Mazzanti CM, Beckemann DV, Nogueira CW, Zeni G. Effects of diphenyl diselenide on lipid profile and hepatic oxidative stress parameters in ovariectomized female rats. *J Pharm Pharmacol.* 2011; 63: 663-69.
33. Huang Y, Zhang Q. Genistein reduced the neural apoptosis in the brain of ovariectomised rats by modulating mitochondrial oxidative stress. *Br J Nutr.* 2010; 104: 1297-303.
34. Garrel C, Alessandri JM, Guesnet P, Al-Gubory KH. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44: 123-31.
35. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. *Gen. Pharmacol.* 1997; 3: 315-17.
36. Harris WS, Von SC. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med.* 2004; 39: 212-20.
37. Mozaffarian D. Fish and n-3 fatty acids for the prevention of fatal coronary heart disease and sudden cardiac death. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87:199
38. Zock PL, Kromhout D. Nutrition and health--fish fatty acids against fatal coronary heart disease. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2003; 147: 2229-33.
39. Brouwer IA, Geelen A, Katan MB. n-3 Fatty acids, cardiac arrhythmia and fatal coronary heart disease. *Prog Lipid Res.* 2006; 45: 357-67.

40. Kromhout D, Yasuda S, Geleijnse JM, Shimokawa H. Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? *Eur Heart J.* 2012; 33: 436-43
41. Crupi R, Marino A, Cuzzocrea S. n-3 Fatty Acids: Role in Neurogenesis and Neuroplasticity. *Curr Med Chem.* 2013; 24: 2953-63.
42. Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharm.* 2002; 56: 388-96.
43. Calder P. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83:150.
44. Billman GE, Kang JX, Leaf A, George E. Prevention of Sudden Cardiac Death by Dietary Pure ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Dogs. *American Heart Association.* 1999; 99: 2452-57
45. Fang Y, Favre J, Vercauteren M, Laillet B, Remy-Jouet I, Skiba M, Lallemand F, Dehaut Cathy, Monteil C, Thuillez C, et al. Reduced cardiac remodeling and prevention of glutathione deficiency after omega-3 supplementation in chronic heart failure. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011; 25: 323-32.
46. Andrade AS, Salomon TB, Behling CS, Mahl CD, Hackenhaar FS, Putti J, Benfato MS. Alpha-lipoic acid restores tear production in an animal model of dry eye. *Exp Eye Res.* 2014; 120: 1-9.

47. Avramovic N, Dragutinovic V, Krstic D, Colovic M, Trbovic A, de Luka S, Milovanovic I, Popovic T. The effects of omega 3 fatty acid supplementation on brain tissue oxidative status in aged wistar rats. *Hippokratia*. 2012; 16: 241-45.
48. Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, Ozugurlu F, Ozgocmen S, Fadillioglu E. Omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. *Ann Clin Lab Sci*. 2005; 35: 169-73.
49. Behling CS, Andrade AS, Putti JS, Mahl CD, Hackenhaar FS, da Silva AC, E Silva MN, Salomon TB, Dos Santos CE, Dias JF, Benfato MS. Treatment of oxidative stress in brain of ovariectomized rats with ômega-3 and lipoic acid. *Mol Nutr Food Res*. 2015; 59: 2547-55.
50. Song J, Fujimoto K, Miyazawa T. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J Nutr*. 2000; 130: 3028-33.
51. Vericel E, Polette A, Bacot S, Calzada C, Lagarde M. Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J Thromb Haemost*. 2003; 1:566-72.
52. Kim YJ, Chung HY. Antioxidative and anti-inflammatory actions of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in renal epithelial cells and macrophages. *J Med Food*. 2007; 10: 225-31.
53. Balkis BS, Othman F, Louis SR, Abu BM, Radzi M, Osman KS, Mohamed J. Effect of alpha lipoic acid on oxidative stress and vascular wall of diabetic rats. *Rom J Morphol Embryol*. 2009; 50: 23-30.
54. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the Metabolic Antioxidant α -Lipoic Acid. *Free Radic Biol Med*. 1997; 1: 359–78
55. Shay KP, Moreau RF, Eric J, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 10: 1149–60

56. Hadi M, Lester P, Nils EL. Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002; 1: 84-90.
57. Martins D, Mazzanti C, Franca R, Pagnoncelli M, Costa M, de Souza E, *et al.* 17-beta estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats. *Life Sciences*. 2012; 90: 351-9.
58. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9: 515-40.
59. Mendez L, Pazos M, Gallardo J, Torres J, Perez J, Nogues R, *et al.* Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine omega 3 PUFAs. *Free Radic Biol Med*. 2013; 55: 8-20.
60. Gupta S, Choudhur PK, Chatterj IB. Synthesis of l-ascorbic-acid from d-glucurono-1,4-lactone conjugates by different species of animals. *Int J Biochem*. 1973; 4: 309-14.
61. Chio. G C Y. Review: effects of nitric oxide on eye diseases ant their treatment. *J. Ocul. Pharmacol*. 2001; 17: 189-98.
62. Ho E, Karimi GK, Liu CC, Bhindi R, Bhindi R, Figtree. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*. 2013; 1: 483–91.
63. Hiroyuki T, Shintaro K, Shouji M. Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2011; 301: 1522-39
64. Hiroyuki T, Shintaro K, Shouji M. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res*. 2009; 81: 449-56.

4. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR

Segundo Žitňanová *et al.* (2011), o estresse oxidativo manifesta-se de forma crescente desde a perimenopausa com um significativo aumento dos marcadores de danos (Žitňanová *et al.*, 2011). A ação protetora cardiovascular associada ao estrogênio se dá pelo efeito direto nas paredes dos vasos, onde são encontrados receptores no tecido muscular liso e células endoteliais. O estrogênio promove vasodilatação em humanos e animais experimentais, através do estímulo de prostaciclina e síntese de NO (Tostes *et al.*, 2003). É bem conhecido que os estrógenos também atuam como sequestrantes de radicais livres, quebram a formação da cadeia de radical livre produzido a partir de processos de oxidação de membranas, portanto, inibem a oxidação de lipídios e proteínas (da Rocha *et al.*, 2011).

A suplementação é uma ótima alternativa para amenizar os sintomas e danos causados pela menopausa. Estudos demonstram que a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3) (Garrel *et al.*, 2012; Mendoza e Zamarripa, 2013) e ácido lipóico (Biewenga, Haenen e Bast, 1997) possuem características antioxidantes, sendo eficientes contra danos oxidativos.

Estudos demonstram que dieta com baixos níveis de DHA e EPA está relacionada com aumento do risco de doenças coronarianas (Harris e Von, 2004; Mozaffarian, 2008). Alguns autores sugerem que os ácidos graxos poli-insaturados n-3 podem diminuir o risco de doença cardíaca coronariana por atuarem nas arritmias cardíacas (Brouwer, Geelen e ; Zock e Kromhout 2003), processo anti-inflamatório (Calder 2006; Kromhout *et al* 2012; Crupi, Marino e Cuzzocrea 2013) e anti-apoptótico (Crupi, Marino e Cuzzocrea 2013).

Em um estudo realizado com cães submetidos a infarto do miocárdio, a suplementação com ácidos graxos n-3 apresentou efeitos protetores contra arritmia ventricular dos mesmos, mesmo com a presença de oclusão arterial (Billman, Kang e Leaf 1999).

Segundo Fang *et al.* (2011), a dieta rica em AGPI n-3 possui ação antioxidante, capaz de prevenir disfunção arterial, hipertensão e melhorar o débito cardíaco, estimulando o sistema antioxidante. Gorton *et al.* (2013) através de seu estudo com 30 ratas ovariectomizadas e suplementadas com AGPI n-3 (0,8 g / kg), mostravam recuperação da função endotelial e redução do estresse oxidativo.

Neste trabalho observou-se uma mudança no perfil oxidativo no grupo das ratas ovariectomizadas (supressão estrogênica), com o aumento do consumo de H₂O₂, GST, SOD (Fig 2), GSht (Fig 5) e o aumento de MDA (Fig 7). Este aumento dos antioxidantes corrobora com outros estudos que sugerem que a queda do estrogênio gera um aumento dos níveis de defesas antioxidantes na tentativa de amenizar o dano oxidativo (Behr 2012; Evsen *et al* 2013).

Em um trabalho recente, realizado pelo nosso grupo, os parâmetros de danos oxidativos nas mesmas ratas do presente estudo, foram avaliados no cérebro das ratas. Os resultados apontaram que a suplementação com DHA gerou um aumento em todos os antioxidantes testados (GPx, GST, SOD, CAT/Prx, Vit C e GSht) Behling *et al.* (2015).

Em contraste, o DHA mostrou-se pró-oxidante, corroborando com outros autores (Song, Fujimoto e Miyazawa; 2000, Vericel *et al.*, 2003), tendo um aumento nas proteínas carboniladas e MDA. A suplementação dietética com AL demonstrou um efeito protetor, obtendo aumento do consumo de H₂O₂, o que sugere aumento de CAT e Prx e diminuição da carbonilação de proteínas e MDA.

Kim e Chung (2007) obtiveram os níveis de GSH aumentados em células renais e macrófagos de ratos, quando utilizaram DHA e EPA *in vitro*. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram os níveis de espécies reativas diminuídas, os níveis de mediadores inflamatórios e nitratos foram regulados pelo DHA e EPA, sugerindo fortemente a ação antioxidante e anti-inflamatória dos mesmos.

Balkis *et al* (2009) demonstraram o papel antioxidante do AL quando ratas diabéticas foram suplementadas por 8 semanas, obtendo o aumento de SOD, Vit C, queda em MDA e dano em DNA. Além disso, o AL reduziu as taxas de glicose e a dislipidemia nas ratas suplementadas.

Segundo Parcker, Tritschler e Wessel (1997), o AL possui capacidade de atuar em meio hidro e lipossolúvel, é um importante antioxidante capaz de regenerar Vit C, Vit E e GSH (Parcker, Tritschler e Wessel; 1997; Hadi, Lester, Nils; 2002; Shay *et al.*, 2009) e ainda atua na isquemia-reperfusão, lesão cerebral, disfunção mitocondrial, diabetes e neuropatia diabética, erros inatos do metabolismo, e em outros danos no cérebro causados por radicais livres (Parcker, Tritschler e Wessel; 1997; Shay *et al.*, 2009)

Em nosso trabalho, a suplementação com AL não gerou alteração no perfil da Vit C e Vit E, porém foi capaz de restaurar os níveis de GST, SOD, GSht e CAT/Prx. Além disto, as ratas suplementadas com AL apresentaram uma menor taxa de MDA (peroxidação lipídica) e assim como as demais suplementações, reduziram a carbonilação em proteínas.

Moini, Packer e Saris (2002) citam as propriedades antioxidantes através da capacidade de eliminar radicais livres e a capacidade de restaurar os níveis reduzidos de outros antioxidantes. No entanto, há evidências que o AL pode exercer capacidade pró-oxidante, como vista em mitocôndrias de hepatócitos de isolados de fígado de ratos, promovendo a transição de permeabilidade das mesmas (Hiroyuki, Shintaro e Shouji; 2011)

5. CONCLUSÃO

Pode-se observar no presente estudo que a suplementação com DHA, EPA e AL pode restaurar os níveis normais das enzimas antioxidantes GST, SOD e o consumo de H_2O_2 (medida indireta de catalase e peroxirredoxinas), bem como os níveis da GSht, antioxidante não enzimático. Foi visto também, que o DHA conseguiu aumentar os níveis de GPx e EPA foi mais eficiente para induzir um aumento dos níveis de Vit E. Quando foi avaliada a quantificação de MDA, o grupo suplementado com AL apresentou uma queda significativa.

Este estudo sugere o possível efeito protetor do ômega-3 e do AL, reduzindo os danos oxidativos através de um estímulo na geração de antioxidantes, com um destaque para o AL, que demonstrou ser mais eficaz na proteção da peroxidação lipídica.

Levando em consideração que no modelo experimental ocorre uma queda abrupta nos níveis hormonais, enquanto nas mulheres esta perda é gradual durante os períodos de pré e perimenopausa, nos leva a crer que o benefício pode se estender a uma ação preventiva no período que antecede a menopausa.

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliação dos danos oxidativos e capacidade antioxidante após suplementação com ômega-3 e ácido lipoico em diferentes órgãos;
- ✓ Aplicação de diferentes métodos para avaliação de dano oxidativo;
- ✓ Suplementação com doses altas e baixas de DHA, EPA e AL para fins de comparação;
- ✓ Avaliar dano oxidativo após diferentes tempos de suplementação;
- ✓ Medir marcador de dano oxidativo em DNA 8-oxo-7,8-dehidro-2'-deoxiguanosina (8OHdG) em nova amostragem;
- ✓ Realização da ovariectomia em diferentes idades para ver se existe uma capacidade de adaptação (hipoestrogenia) em diferentes idades;

7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; AZIZ, N .; RIZK, B. *Studies on Women's Health, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*, Springer Science+Business Media, New York, 2013.

AKPINAR, D.; YARGICOGLU, P.; DERIN, N.; ALICIGUZEL, Y. & AGAR, A. The Effect of Lipoic Acid on Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Rats Exposed to Chronic Restraint Stress. *Physiological Research*, 57(6):893-901, 2008.

ALZOGHAIBI, M.A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease *World Journal Gastroenterol.* 19(39): 6540–6547, 2013.

ANDRADE, A.S.; SALOMON, T.B.; BEHLING, C.S.; MAHL, C.D.; HACKENHAAR, F.S.; PUTTI, J. & BENFATO, M.S. Alpha-lipoic acid restores tear production in an animal model of dry eye. *Experimental Eye Research*, 120:1-9, 2013.

ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; SOARES, J.; OLIVEIRA, J. & DUARTE, J.A. Exercise and cardiac oxidative stress. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 22(5):651-678, 2003.

AZIZI-SOLEIMAN, F.; JAZAYERI, S.; EGHTESEADI, S.; RAJAB, A.; HEIDARI, I.; VAFA, M.R. & GOHARI, M.R. Effects of pure Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Oxidative Stress, Inflammation and Body Fat Mass in Patients With Type 2 Diabetes. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(8): 922-928, 2013.

BALKIS, B.S., OTHMAN, F.; LOUIS, S.R.; ABU BAKAR, M.; OSMAN, K.; DAS, S. & MOHAMED, J. Effect of alpha lipoic acid on oxidative stress and vascular wall of diabetic rats. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 50(1):23-30, 2009.

BARBACANNE, M.A.; RAMI, J.; MICHEL, J.B.; SOUCHARD, J.P.; PHILLIPPE, M.; BESOMBES, J.P.; BAYARD, F. & ARNAL, J.F. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovascular Research*, 41(3):672-681, 1999.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V. P.R. & BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulation *Molecular Nutrition & Food Research*, factors. *Revista de Nutrição*, 23(4): 629-643, 2010.

BEHLING, C.S.; ANDRADE, A.S.; PUTTI, J.S.; MAHL, C.D.; HACKENHAAR, F.S.; DA SILVA, A.C.A.; E SILVA, M.N.; SALOMON, T.B.; DOS SANTOS, C.E.; DIAS, J.F. & BENFATO, M.S. Treatment of oxidative stress in brain of ovariectomized rats with omega-3 and lipoic acid. 59(12):2547-2555, 2015.

BEHR, G.A.; SCHNORR, C.E.; SIMÕES-PIRES, A.; DA MOTTA, L.L.; FREY, B.N. & MOREIRA, J.C. Increased cerebral oxidative damage and decreased antioxidant defenses in ovariectomized and sham-operated rats supplemented with vitamin A. *Cell Biology and Toxicology*, 28(5):317-330, 2012.

BIEWENGA, G.P.; HAENEN, G.R. & BAST, A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. *General Pharmacology*, 29(3) :315-331, 1997.

BIEWENGA, G.P; HAENEN, G.R; BAST, A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. *General Pharmacology*, 29(3):315-17, 1997.

BILLMAN, G.E.; KANG, J.X. & LEAF, A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure omega-3 Polyunsaturated fatty acids in dogs. *American Heart Association*, 99(18): 2452-2457, 1999.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S. & KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1):9-19, 2012.

BROUWER, I.A.; GEELEN, A.; & KATAN, M.B. n-3 Fatty acids, cardiac arrhythmia and fatal coronary heart disease. *Progress in Lipid Research*, 45(4):357-367, 2006.

CALDER P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Society for Clinical Nutrition*, 83(6):1505-1519, 2006.

CAROCHO, M. & FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51: 15–25, 2013.

CATANEO, A.C.; DÉSTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHAMMA, K.L. & SOUZA, D.C.F. Atividade de glutationa S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*zea mays*). *Planta daninha*, 21(2): 307-312, 2003.

CHAKRABORTY, T.R & GORE, A.C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Experimental Biology and Medicine* (maywood, N.J.), 229(10):977-987, 2004.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Annals of Internal Medicine*, 111(11): 918-931, 1989.

COLDITZ, G.A.; HANKINSON, S.E.; HUNTER, D.J.; WILLETT, W.C.; MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.; ROSNER, B. & SPEIZER, F.E. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine*, 332(24):1589–93, 1995.

CRUPI, R.; MARINO, A.; CUZZOCREA, S. n-3 Fatty Acids: Role in Neurogenesis and Neuroplasticity. *Current Medicinal Chemistry*, 20(24):2953-2963, 2013.

DA ROCHA, J.T.; PINTON, S.; MAZZANTI, A.; MAZZANTI, C.M.; BECKEMANN, D.V.; NOGUEIRA, C.W. & ZENI, G. Effects of diphenyl diselenide on lipid profile and hepatic oxidative stress parameters in ovariectomized female rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(5):663-669, 2011.

DHALLA, A.K.; HILL, M.F. & SINGAL, P.K. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 28(2):506-514, 1996.

DIXON, I.M.; KANEKO, M.; HATA, T.; PANAGIA, V. & DHALLA, N.S. Alterations in cardiac membrane Ca^{2+} transport during oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 99(2):125-133, 1990.

DURAND, M. & MACH, N. El ácido alfa lipoico y su poder antioxidante frente al cáncer y las patologías de sensibilización central. *Nutición Hospitalaria*, 28(4) :1031-1038, 2013.

ENGSTRÖM, K.; SALDEEN, A.S.; YANG, B.; MEHTA, J.L. & SALDEEN, T. Effect of fish oils containing different amounts of EPA, DHA, and antioxidants on plasma and brain fatty acids and brain nitric oxide synthase activity in rats. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 114(4): 206–213, 2009.

EVSEN, M.S.; OLZER, A.; GOCMEZ, C.; VAROL, S.; TUNC, S.Y.; AKIL, E.; UZAR, E. & KAPLAN, I. Effects of estrogen, estrogen/progesteron combination and genistein treatments on oxidant/antioxidant status in the brain of ovariectomized rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(14):1869-1873, 2013.

FADY M.S.; SALEM, H.A.; MEHANNA, R.A. & ABDEL-GHANY, B.S. Comparative study on induction and effects of surgical menopause in a female rat model: a

prospective case control. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(6):9403-9411, 2015.

FANG, Y.; FAVRE, J.; VERCAUTEREN, M.; LAILLET, B.; REMY-JOUET, I.; SKIBA, M.; LALLEMAND, F.; DEHAUDT, C.; MONTEIL, C.; THUILLEZ, C. & MULDER, P. Reduced cardiac remodelling and prevention of glutathione deficiency after omega-3 supplementation in chronic heart failure. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25(3): 323-332, 2011.

FU, C.; XU, D.; WANG, C.Y.; JIN, Y.; LIU, Q.; MENG, Q.; LIU, K.X.; SUN, H.J. & LIU, M.Z. Alpha-Lipoic Acid Promotes Osteoblastic Formation in H₂O₂-Treated MC3T3-E1 Cells and Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Journal of Cellular Physiology*, 230(9):2184-2201, 2015.

GARREL, C.; ALESSANDRI, J.M.; GUESNET, P. & AL-GUBORY, K.H. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(1):123-131, 2012.

GHIBU, S.; RICHARD, C.; VERGELY, C.; ZELLER, M.; COTTIN, Y. & ROCHETTE, L. Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(5):391-8, 2009.

GIL, A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8):388-96, 2002.

GORTON, CAPPELLARI, G.; LOSURDO, P.; MAZZUCCO, S.; PANIZON, E.; JEVNICAR, M.; MACALUSO, L.; FABRIS, B.; BARAZZONI, R.; BIOLO, G.; CARRETTA, R. & ZANETTI, M. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1):371-379, 2013.

GRADY, D.; RUBIN, S.M.; PETITTI, D.B.; FOX, C.S.; BLACK, D.; ETTINGER, B.; ERNSTER, V.L. & CUMMINGS, S.R. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Annals of Internal Medicine*, 117(12):1016-1037, 1992.

GUYTON, B; HALL, E. Text Book of Medical Physiology. 12. Mississippi: University Of Mississippi Medical Center, 2011.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. Free radicals in biology and medicine. 4. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(1) :125-126, 1995.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5):1147-1150, 2007.

HARRIS, W.S. & VON, S.C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Preventive medicine*, 39(1):212-220, 2004.

HEMMINKI, E. & MCPHERSON, K. Impact of postmenopausal hormone therapy on cardiovascular events and cancer: pooled data from clinical trials. *The British Medical Journal*, 315(7101):149-53, 1997.

HEYMES C.; BENDALL, J.K.; RATAJCZAK, P.; CAVE, A.C.; SAMUEL, J.L.; HASENFUSS, G. & SHAH, A.M. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *Journal of the American college of Cardiology*, 41(12):2164-2171, 2003.

HEYMES, C; BENDALL, J.K; RATAJCZAK, P; CAVE, A.C; SAMUEL, J.L; HASENFUSS, G & SHAH, A.M. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(12):2164-2171, 2003.

HIROYUKI, T.; SHINTARO, K. & SHOUJI, M. Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301:1522-39, 2011.

HO, E.; KARIMI GALOUGAHI, K.; LIU, C.C.; BHINDI, R. & FIGTREE, G.A. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 8(1):483-491, 2013.

HULLEY, S; GRADY, D; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B. & VITTINGHOFF, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Journal of American Medical Association*, 280(7):605–613, 1998.

KANNEL, W.B.; HJORTLAND, M.C.; MCNAMARA, P.M. & GORDON, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Annals of Internal Medicine*, 85(4):447-52, 1976.

KEMPEN T.A.; MILNER, T.A. & WATERS, E.M. Accelerated Ovarian Failure: a novel, chemically-induced animal model of menopause. *Brain Research*, 1379(16):176–187, 2010.

KIM, Y.J. & CHUNG, H.Y. Antioxidative and anti-inflammatory actions of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in renal epithelial cells and macrophages. *Journal of medicinal food*, 10(2):225-231, 2007.

KROMHOUT, D.; YASUDA, S.; GELEIJNSE, J.M. & SHIMOKAWA, H. Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? *European Heart Journal*, 33(4):436-443, 2012.

LENNAN, S.; LENNAN, A. & RYAN, P. Colorectal cancer and estrogen replacement therapy. A meta-analysis of Epidemiological studies. *Medical Journal of Australia*, 162:491–493, 1995.

LIU, Y.; HUANG, H.; XIA, W.; TANG, Y.; LI, H. & HUANG, C. NADPH oxidase inhibition ameliorates cardiac dysfunction in rabbits with heart failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 343 (1-2): 143-153, 2010.

LIU, Y.; HUANG, H.; TANG, Y.H.; LI, H.T.; WANG, X. & HUANG, C.X. Effects of NADPH oxidase inhibition on cardiac function and myocardial calcium regulatory proteins in rabbits with heart failure. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 37(10): 883-886, 2009.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A. & CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4 (8): 118-126, 2010.

LUSHCHAK, V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 153: 175–190, 2011.

MAFFUCCI, J.A. & GORE, A.C. Age-related changes in hormones and their receptors in animal models of female reproductive senescence. In: Conn MP, editor. Handbook of models for human aging. *Academic Press and Elsevier*, 533–552, 2006.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J. & TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4): 609-614, 2002.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E. & VISENTAINER, J.V. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Revista de Nutrição*, 19(6):761-770, 2006.

MARTINDALE, J.L. & . Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1):1-15, 2002.

MARTINDALE, J.L. & HOLBROOK, N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1) :1-15, 2002.

MARTINS, D.; MAZZANTI, C.M.; FRANÇA, R.T.; OAGNONCELLI, M.; COSTA, M.M.; SOUZA, E.M.; GONÇALVES, J.; SPANEVELLO, R.; SCHMATZ, R.; COSTA, P.; MAZZANTI, A.; BACMANN, D.V.; CECIM, M.S.; SCHETINGER, M.R. & LOPES, S.T.A. 17-beta estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats. *Life Sciences*, 90:351-359, 2012.

MARTINS, M.B.; SUAIDEN, A.S.; PIOTTO, R.F. & BARBOSA, B. Properties of Omega-3 polyunsaturated fatty acids obtained of fish oil and flaxseed oil. *Revista do instituto de ciências da saúde*, 26(2) :153-156, 2008.

MENDOZA, C. & ZAMARRIPA, C. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases – A Role for Antioxidants. Chapters 12: Menopause Induces Oxidative Stress 1th ed. 2013: 289-316

MOINI, H.; PACKER, L. & SARIS, N. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182(1):84-90, 2002.

MOINI, H.; PACKER, L. & SARIS, N.E. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182(1):84-90, 2002.

MOZAFFARIAN, D. Fish and n-3 fatty acids for the prevention of fatal coronary heart disease and sudden cardiac death. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6):1991S-1996S, 2008.

MURDOCH, C.E.; GRIEVE, D.J.; CAVE, A.C.; LOOI, A.C. & SHAH, A.M. NADPH oxidase and heart failure. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(4): 148-153, 2006.

MURDOCH, C.E.; ZHANG, M.; CAVE, A.C. & SHAH, A.M. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodeling and failure. *Cardiovascular Research*, 71(2): 208-215, 2006.

OCTAVIA, Y.; LaROCCA, H.P.B. & MOENS. NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the failing heart: From pathogenic roles to therapeutic approach. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2): 291-297, 2010.

PACKER, L.; TRITSCHLER, H. & WESSEL, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1-2):359-378, 1997.

PEREIRA, I,R.O.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; CAMPOS, M.F.; FERDERBAR, S.; LIMA, E.S.; ALDRIGHI, J.M. & ABDALLA, D.S.P. Lipid peroxidation and nitric oxide inactivation in postmenopausal women. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 80(4):415-423, 2003.

QIN, F.; SIMEONE, M. & PATEL, R. Inhibition of NADPH oxidase reduces myocardial oxidative stress and apoptosis and improves cardiac function in heart failure after myocardial infarction. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(2): 271-281, 2007.

REHMANN, H.U. & MASSON, E.A. Neuroendocrinology of female aging. *Gender medicine*, 2(1):41-56, 2005.

ROCHETTE, L.; GUIBU, E.; RICHARD, C.; ZELLER, M.; COTTIN, Y. & VERGELY, C. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1): 114-125, 2013.

RODRIGUES, C.; CALLE, E.E.; COATES, R.J.; MIRACLE-MCMAHILL, H.L.; THUN, M.J. & HEATH, C.R.Jr. Estrogen replacement therapy and fatal ovarian cancer. *American Journal of Epidemiology*, 141(9):828–835, 1995.

ROSSOUW, J. E.; ANDERSON, G.L.; PRENTICE, R.L.; LACROIX, A.Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M.L.; JACKSON, R.D.; BERESFORD, A.A.; HOWARD, V.B.; JOHNSON, K.C.; KOTCHEN, J.M. & OCKENE, J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Journal of American Medical Association*, 288(3):321-333, 2002.

ROUSSEAU, M.E. Managing menopausal symptoms. In: Conn MP, editor. Handbook for models for human aging. Elsevier Academic Press; Amsterdam: 2006.

SAUTIN, Y.Y. & JOHNSON, R.J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6) :608-6019, 2008.

SCHMIDT, P.J. & RUBINOW, D.R. Sex Hormones and Mood in the Perimenopause. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1179:70–85, 2009.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I. & MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9):567–579, 2007.

SHAY, K.P.; MOREAU, R.F.; SMITH, E.J.; SMITH, A.R. & HAGEN, T.M. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(10):1149–60, 2009.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Society of Clinical Nutrition*, 70(3): 560-569, 1999.

SINGAL, P.K.; KHAPER, N.; BELÓ-KLEIN, A. & BHAYANA, M. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Failure Reviews*, 4:353-360, 1999.

SMITH, M.; FREEMAN, M. & NEIL, J. The control of progesterone secretion during estrous-cycle and early pseudopregnancy in rat - prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of corpus-luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(1):219-226, 1975.

SONG, J.; FUJIMOTO, K. & MIYAZAWA, T. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *Journal of Nutrition*, 130(12):3028-3033, 2000.

STEPHENSON, J. FDA orders estrogen safety warnings: agency offers guidance for HRT use. *Journal of American Medical Association*, 289(5):537-538, 2003.

SZCZUREK, V. & JURKIEWICZ, B.S. Oxidative stress and inflammatory markers – the future of heart failure diagnostics? *Kardiochir Torakochirurgia Polska*, 2(2): 145-149, 2015.

TOSTES, R.C.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B. & CARVALHO, M.H. Effects of estrogen on the vascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(9):1143-1158, 2003.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S. & MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 301(6):2181-2190, 2011.

VERICEL, E.; POLETTE, A.; BACOT, S.; CALZADA, C. & LAGARDE, M. Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(3):566-572, 2003.

VICTORINO, V.J.; PANIS, C.; CAMPOS, F.C.; COLADO-SIMÃO, A.N.; OLIVEIRA, S.R.; HERRERA, A.C.; CECCHINI, A.L. & CECCHINI, R.. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *American Aging Association*, 35(4): 1411-1421, 2013.

WASSMANN, S.; BAUMER, A.T.; STREHLOW, K.; VAN EICKELS, M.; GROHE, C.; AHLBORY, K.; BOHM, M. & NICKENING, G. Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress During Estrogen Deficiency in Spontaneously Hypertensive Rats. *American Heart Association*. 103(3):435-441, 2001.

WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Geneva: World Health Organization, 1994.

WIERNSPERGER, N.F. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes & Metabolism*, 29(6): 579-585, 2003.


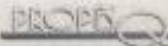
YOUNG, I.S. & WOODSIDE, J.V. Antioxidants en health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3) :176-186, 2001.

ZITNANOVÁ I; RAKOVAN, M.; PADUCHOVÁ, Z.; DVORÁKOVÁ, M.; ANDREZÁLOVÁ, M.; MUCHOVÁ, J.; SIMKO, M.; WACZULIKOVÁ, I. & DURACKOVÁ, Z. Oxidative stress in women with perimenopausal symptoms. *Menopause*, 18(11): 1249-55, 2011.

ZOCK, P.L. & KROMHOUT, D. Nutrition and health--fish fatty acids against fatal coronary heart disease. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 147: 2229-33, 2002.

_____. Office of Technology Assessment. Effectiveness and costs of osteoporosis screening and hormone replacement therapy. Washington: Congress of the United States, 1995.

ANEXOS

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

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

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

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

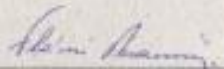
MARA DA SILVEIRA BENFATO - coordenador desde 01/03/2011

Equipe Externa:

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

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

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



FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

1

Grupo: Nuvital Nutrientes S/A	Amostra: 9911070368
Solicitante: DEPARTAMENTO TECNICO	Item: Nuvilab CR-1 - 100110002/2
Cidade: Colombo	Fornecedor: Nuvital Nutrientes S/A.
Estado: PR	Controlo:
Fone / Fax: (41) 2169-3150	Produto:
Produção:	Recepção: 22/07/2011
Coleta: 22/07/2011	Liberção: 28/07/2011
Lot: 0022071101 AO 30	

Análise	Unidade	Valor
Umidade	%	11,74
Proteína Bruta	%	25,70
Extrato Etéreo	%	4,01
Fibra Bruta	%	4,50
Resíduo Mineral	%	7,71
Fósforo	%	0,78
Cálcio	%	1,26

Comentários

Cliente

Laboratório

Depto. Técnico

O RESULTADO TEM SEU VALOR RESTRITO À AMOSTRA ANALISADA

Suzane Maria Spiel - CRC 09403009 - 8ª Região

Estrada da Ribeira, 3.001 Km 03

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

www.nuvital.com.br

08/08/2011

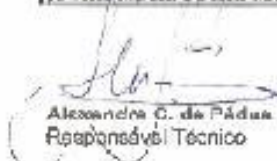
CERTIFICADO DE ANÁLISE

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

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

LAUDO: APROVADO

As informações contidas neste certificado de análise são verdadeiras e de boa fé, não devem ser consideradas como uma garantia, nem como comprovação para isenção de qualquer responsabilidade legal no uso indevido ou manuseio incorreto do produto. Os resultados indicados foram obtidos na análise de amostra representativa e são válidos de acordo com o fornecedor, relativos ao momento da análise. O produto mantém suas características de qualidade desde que manuseado e armazenado corretamente.



Alexandre C. de Pádua
Responsável Técnico

Dr. Alexandre C. de Pádua
Farmacêutico - Bioquímico
CRP-SP 7.776



CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:	ACIDO ALFA LIPOICO		Pág 1
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	CHINA/CHINA	DATA DE ANÁLISE:	05/07/2011
LOTE PHARMA NOSTRA:	11082051C	LOTE FABRICANTE:	110106
DATA DE FABRICAÇÃO:	Janeiro/2011	DATA DE VALIDADE:	Janeiro/2013
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:	TEMPERATURA ABAIXO DE 30°C		
OBS 1:	FM: C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂		
OBS 2:	PM: 206,32		
OBS 3:	CAS: 1077-28-7		
DATA DE EMISSÃO:	14/09/2011	NF:	3-156.330
		ORDEM FRACIONAMENTO:	2872-11

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

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

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / JF (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral Farmacopoeia) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante da matéria) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo L.C.D. Pharma Nostra)

NFC
P

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Reprovado

D. Rocha
Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade
Danielle Rocha Barbosa - CRF-GO Nº 7003

W. Gabriel
Responsável Técnico
Amin Gabriel Gebrem - CRF-GO Nº 1829

CURRICULUM VITAE

Dados pessoais

Nome: Priscila Machado Marinho

Nascimento: 17/11/1986 – Porto Alegre/RS - Brasil

E-mail: priscilahcr@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2016** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS,
Porto Alegre, Brasil.
Título: Avaliação do estresse oxidativo em coração de ratas ovariectomizadas e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipoico.
Orientador: Mara da Silveira Benfato.
- 2013** Graduação em Biomedicina. Centro Universitário Metodista,
IPA/ RS, Brasil.
- 2009** Curso de especialização em Técnico em Enfermagem do Trabalho.
Escola de Educação Profissional São Miguel.
Porto Alegre/RS.
(Carga horária: 360h).
- 2008** Curso de Auxiliar de Laboratório.
(Carga horária: 140h).
Escola Técnica Cristo Redentor. Porto Alegre/RS
- 2006** Curso Técnico/profissionalizante em Técnico em Enfermagem
Escola Técnica Dimensão
(Carga horária: 1700h).
Charqueadas/RS

Formação complementar

- 2015** Inglês. (Carga horária: 800h).
Easy English Language.
- 2015** Curso de Sequenciamento de Nova Geração em Doenças Genéticas Através de Painéis
(Carga horária: 12h).
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- 2015** Boas Práticas em Serviços de Manipulação de Alimentos

- (Carga horária: 20h).
Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- 2015** Diagnóstico e Monitoramento Laboratorial das Principais Patologias Metabólicas
(Carga horária: 4h).
Faculdade do Grupo UNIASSELVI.
- 2015** Curso de Fisiologia Geral. (Carga horária: 100h).
Instituto Politécnico de Ensino à Distância.
- 2014** Atualização em Imunizações e Implantação da Hep A.
(Carga horária: 8h).
Secretaria de Saúde de Porto Alegre.
- 2013** Extensão universitária em III Estudo da Sinalização Celular no Câncer.
(Carga horária: 15h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
- 2013** Higiene e Segurança.
(Carga horária: 20h).
SENAI Departamento Regional do Espírito Santo.
- 2013** Imunologia e o Programa Nacional de Imunização.
(Carga horária: 30h).
Conselho Federal de Enfermagem- COFEN
- 2012** Procedimentos em Sala de Vacinas.
(Carga horária: 40h).
Portal Educação.
- 2012** DST/AIDS: Da Prevenção ao Tratamento.
(Carga horária: 12h).
SEST/SENAT.
- 2012** Boas Práticas nos Serviços de Alimentação.
(Carga horária: 40h).
Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Porto Alegre.
- 2011** Boas Práticas nos Serviços de Alimentação.
(Carga horária: 40h).
Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Porto Alegre.
- 2011** Boas Práticas nos Serviços de Alimentação.
(Carga horária: 40h).
Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Porto Alegre.

- 2011** Introdução à Perfusão Extracorpórea.
(Carga horária: 7h).
Unidade de Pesquisa em Cirurgia Cardiovascular do Hospital São Francisco.
- 2011** Parada Cardiorespiratória Novas Diretrizes.
(Carga horária: 3h). Hospital Militar de Porto Alegre.
- 2010** Implicações Éticas em Enfermagem e Bioética.
(Carga horária: 30h).
Conselho Federal de Enfermagem – COREN/RS.
- 2010** Curso de Emergência/Urgência Liga do Trauma.
(Carga horária: 6h).
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- 2010** Jornada de Enfermagem.
(Carga horária: 9h).
Hospital Militar de Porto Alegre.
- 2010** Capacitação em Enfermagem.
(Carga horária: 10h).
Hospital Militar de Porto Alegre.
- 2009** Prevenção e Controle de Infecções Hospitalares.
(Carga horária: 30h).
Conselho Federal de Enfermagem-COREN/RS.
- 2009** Introdução à Saúde e Segurança do Trabalho - SST.
(Carga horária: 40h).
TSPV Projetos.
- 2009** NR32 Higiene e Limpeza em Serviço de Saúde.
(Carga horária: 40h).
TSPV Projetos.
- 2009** Curativos.
(Carga horária: 4h).
Escola de Educação Profissional São Miguel.
- 2009** Capacitação em Enfermagem - Práticas.
(Carga horária: 46h).
Hospital Militar de Porto Alegre.
- 2009** Capacitação em Enfermagem - Práticas.
(Carga horária: 46h).
Hospital Militar de Porto Alegre.
- 2009** Especialização em Enfermagem do Trabalho.
(Carga horária: 360h).

Escola de Educação Profissional São Miguel.

- 2008 Interpretação de Exames Laboratoriais.
(Carga horária: 100h).
Portal Educação.
- 2008 Auxiliar de Laboratório.
(Carga horária: 140h).
Escola Técnica Cristo Redentor.
- 2008 Enfermagem em Hemodiálise.
(Carga horária: 20h).
Escola Lafayette.
- 2008 Quimioterapia.
(Carga horária: 30h).
Conselho Federal de Enfermagem (RS).
- 2008 Segurança e Prevenção no uso de Perfurocortantes.
(Carga horária: 40h).
TSPV Projetos.
- 2008 Técnicas de Coleta em Laboratório Clínico.
(Carga horária: 20h).
Instituto Técnico de Educação Porto Alegre.
- 2008 Massoterapia.
(Carga horária: 440h).
Escola Lafayette.
- 2006 Técnico em Enfermagem.
(Carga horária: 1700h).
Escola Técnica Dimensão.
- 2005 Atualização no Tratamento de Feridas.
(Carga horária: 6h).
Conselho Regional de Enfermagem (RS).
- 2005 Prevenção e Controle das Infecções Hospitalares.
(Carga horária: 6h).
Conselho Regional de Enfermagem – COREN/RS.

Atuação profissional

1. Ministério da Defesa – Exército Brasileiro

2009-Atual Vínculo: Funcionário público

Enquadramento funcional: Técnico de Enfermagem.
Carga horária: 40. Regime: Integral.

2. Hospital Militar de Porto Alegre

2013 Vínculo: Estágio Curricular
Enquadramento funcional: Estágio em Análises Clínicas.
Carga horária: 402.

3. Centro Universitário Metodista do Sul – IPA

2012-2013 Vínculo: Bolsista
Enquadramento funcional: Monitoria de Fisiologia.
Carga horária: 20/semanais

4. Hospital Militar de Porto Alegre

2012 Vínculo: Estágio Curricular
Enquadramento funcional: Estágio em Bromatologia.
Carga horária: 402.

Projetos

2012 - Atual Avaliação de estresse oxidativo em coração de ratas ovariectomizadas e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipoico.
Situação: Concluído
Integrantes: Priscila Machado Marinho (Responsável); Alexey Santos de Andrade; Tiago B Salomon; Jordana Putti; Mara da Silveira Benfato.

Idiomas

Inglês: Compreende razoavelmente, fala pouco, escreve pouco, lê bem.

Espanhol: Compreende razoavelmente, fala razoavelmente, escreve pouco, lê bem.

Produção

Apresentações de Trabalho

1. MARINHO, P. M. ; BENFATO, M. S. Avaliação do Estresse Oxidativo em Coração de Ratas Ovariectomizadas e o uso de Antioxidantes ômega-3 e ácido Lipóico. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. MARINHO, P. M. Doenças Sexualmente Transmissíveis. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
3. MARINHO, P. M. Doenças Sexualmente Transmissíveis/HIV. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
4. MARINHO, P. M. ; PRATES, C. Prevenção de DST/AIDS e gravidez na adolescência. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
5. MARINHO, P. M. Prevenção DST/AIDS. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
6. MARINHO, P. M. Prevenção e Perfil do Conhecimento de DST e Gravidez na Adolescência em Alunos de 7ª Série do Ensino Fundamental em uma Escola Municipal de Porto Alegre. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MARINHO, P. M. ; GUTIERREZ, L. L. P. ; PRATES, C. Conhecimento Sobre DST e Gravidez na Adolescência entre Jovens Estudantes e Adultos Trabalhadores. Ciência em Movimento (Impresso), v. 2, p. 3940, 2012.

Livros publicados/organizados ou edições

1. GUTIERREZ, L. L. P. ; MARINHO, P. M. . Extensão Universitária - Práticas na Educação em Saúde. 1. ed. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA, 2015. v. 1. 217-240p .

Demais tipos de produção técnica

1. MARINHO, P. M. ; GUTIERREZ, L. L. P. ; PRATES, C. Prevenção da Gravidez na Adolescência. 2013. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional Folheto Informativo e Curso Ministrado).
2. MARINHO, P. M. DSTs e HIV da prevenção ao Tratamento. 2013. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional Folheto Informativo e Curso Ministrado).
3. MARINHO, P. M. Boas Práticas em Serviço de Alimentação. 2012. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional Folheto Informativo e Curso Ministrado).

4. MARINHO, P. M. Controle de Qualidade em Serviço de Alimentação. 2012. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional Folheto Informativo e Curso Ministrado).

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XVI Encontro do PPGBCM – UFRGS. 2015 (Apresentação de Pôster)
2. III Congresso de Biomedicina de Santa Catarina. 2015. (Congresso).
3. VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina. Avaliação do Estresse Oxidativo em Coração de Ratas Ovariectomizadas e o uso de Antioxidantes Ômega3 e Acido Lipóico. 2015. (Congresso – Apresentação de Pôster)
4. VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina. 2015. (Congresso - Ouvinte).
5. III Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares. 2014. (Simpósio).
6. II Mostra de Pesquisa em Enfermagem. Conhecimento sobre DST e Gravidez na Adolescência entre jovens estudantes e adultos trabalhadores. 2012. (Simpósio).
7. Dia Mundial da Saúde no Programa de Extensão: Saúde e Cuidado Humano. Dia Mundial da Saúde no Programa de Extensão: Saúde e Cuidado Humano. 2012. (Oficina).
8. Mini curso de Técnicas de Coleta em Laboratório. Técnicas de Coleta em Laboratório. 2011. (Oficina).
9. Campanha Nacional de Vacinação contra Poliomelite. Participação em Campanha Nacional de Vacinação. 2011. (Outra).
10. Campanha Nacional de Vacinação contra Poliomelite. Participação em Campanha Nacional de Vacinação. 2010. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. MARINHO, P. M. Curso de Férias: A Célula. 2015. UFRGS (Participação na organização).

2. MARINHO, P. M. ; GUTIERREZ, L. L. P. ; PRATES, C. Conhecimento sobre DST e Gravidez na Adolescência entre jovens estudantes e adultos trabalhadores. 2012. (Exposição).
3. MARINHO, P. M . V Semana Acadêmica do Curso de Biomedicina. 2012. (Exposição).
4. MARINHO, P. M.. Programa de Extensão: Saúde e Cuidado Humano. 2012.
5. MARINHO, P. M. IV Semana Acadêmica do Curso de Biomedicina. 2011. (Exposição).