

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

Avaliação do estresse oxidativo no rim de ratas submetidas a um modelo experimental de estropausa e a resposta ao uso de antioxidantes ômega 3 e ácido lipoico

**Dissertação de Mestrado**

**Jordana Salete Putti**

Porto Alegre, março de 2017

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

**Avaliação do estresse oxidativo no rim de ratas submetidas a um modelo experimental de estropausa e a resposta ao uso de antioxidantes ômega 3 e ácido lipoico**

Jordana Salete Putti

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

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Mara da Silveira Benfato

Porto Alegre, março de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof. Dra. Mara Benfato pela oportunidade de realização do trabalho e pelo apoio, paciência e ensinamentos desde a graduação.

Aos colegas de laboratório pela amizade, alegria e auxílio na realização do trabalho.

Aos professores integrantes da comissão de acompanhamento, Prof. Dr. Diego Bonatto e Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pelas colocações ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Itabajara Vaz pelas colocações na correção do artigo científico para submissão.

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

Aos meus amigos, em especial a Ana Carolina Moisés da Silva e a Mariê Mello, pela torcida, amizade e acolhimento e também pela revisão e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, pelo apoio, pela paciência e suporte incondicionais em toda minha vida.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Menopausa, Estropausa e Ovariectomia.....	9
1.2 Espécies Reativas, Radicais Livres e Estresse Oxidativo.....	11
1.3 Ácidos Graxos Poli-Insaturados: DHA e EPA.....	15
1.4 Ácido Lipoico.....	16
1.5 O Rim.....	19
1.6 Os Rins e a Menopausa.....	21
1.7 Os Rins e o Estresse Oxidativo.....	22
2. OBJETIVO .....	24
2.1 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
3.1 Artigo científico.....	26
4. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR.....	46
5. CONCLUSÃO .....	51
6. PERSPECTIVAS.....	52
7. REFERÊNCIAS.....	53
8. ANEXOS.....	62
I Parecer do comitê de ética da UFRGS.....	62
II Certificado das análises dos suplementos.....	63
III Curriculum Vitae.....	66

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AA** – Ácido Araquidônico (do inglês: Arachidonic Acid)

**ADHL** – Ácido Dihidrolipoico

**AGPI** – Ácidos Graxos Poli-Insaturados

**AL** – Ácido Linoleico

**ALA** – Ácido Alfa-Linolênico (do inglês: *alpha*-Linolenic Acid)

**BSA** – Albumina Sérica Bovina (do inglês: Bovine Serum Albumin)

**CAT** – Catalase

**CuZnSOD** – Cobre/Zinco Superóxido Dismutase

**DNPH** – Dinitrofenilhidrazina (do inglês: Dinitrophenylhydrazine)

**DHA** – Ácido Docosahexaenoico (do inglês: Docosahexaenoic Acid)

**EPA** – Ácido eicosapentaenoico (do inglês: Eicosapentaenoic Acid)

**ERs** – Espécies Reativas

**ERB** – Espécies Reativas de Bromo

**ERC** – Espécies Reativas de Cloro

**ERE** – Espécies Reativas de Enxofre

**ERNs** – Espécies Reativas de Nitrogênio

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio

**GPx** – Glutathione Peroxidase

**GR** – Glutathione Redutase

**GSH** – Glutathione (do inglês: Glutathione)

**GSSG** – Glutathiona Reduzida

**GST** – Glutathiona S-Transferase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogênio

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: High Performance Liquid Chromatography)

**LA** – Ácido Lipoico (do inglês: Lipoic Acid)

**MDA** – Malondialdeído

**MnSOD** – Manganês Superóxido Dismutase

**NADPH** – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (do inglês: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

**O<sub>2</sub>** – Oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Ânion Superóxido

**OH<sup>-</sup>** – Ânion Hidroxila

**OH<sup>•</sup>** – Radical Hidroxila

**Prxs** – Peroxirredoxinas

**SOD** – Superóxido Dismutase

**VIT. C** – Ácido Ascórbico/Vitamina C

**VIT. E** – Tocoferol/Vitamina E

**XO** – Xantina Oxidase

## RESUMO

Os rins desempenham vários papéis regulatórios essenciais nos vertebrados, como remover o excesso de moléculas orgânicas do sangue e os resíduos do metabolismo. Estes órgãos são alvos conhecidos do estresse oxidativo e foram escolhidos devido à possibilidade de se avaliar os efeitos da menopausa e de antioxidantes neles. A menopausa pode estar associada ao estresse oxidativo em vários órgãos e tecidos, mas o papel desempenhado por ela no estresse oxidativo que envolve os rins não é bem compreendido. Como modelo experimental utilizaram-se ratas que foram ovariectomizadas bilateralmente para induzir os sintomas e efeitos da menopausa. Uma dieta suplementada com antioxidantes foi introduzida para analisar os possíveis efeitos no estresse oxidativo e na menopausa. Como suplementos antioxidantes, foram utilizados o ácido lipoico (LA), ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA). O LA foi escolhido por causa de sua capacidade antioxidante e por ser um cofator das enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídeos. Os ácidos graxos do tipo ômega 3 (DHA e EPA) estão bem estabelecidos como protetores endoteliais e foram utilizados devido à sua elevada capacidade antioxidante. Este estudo empregou 50 ratas Wistar de três meses de idade (*Rattus norvegicus*). Os animais foram divididos em cinco grupos de dez animais cada. Quatro grupos foram submetidos à ovariectomia bilateral e um grupo foi operado simultaneamente, mas sem remoção dos ovários. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos. O grupo controle (SHAM) e um grupo ovariectomizado (OVX) receberam a dieta padrão; o restante dos animais operados recebeu suplementação e foram divididos em 3 grupos de acordo com o suplemento dietético. Nossos resultados mostraram que a atividade da fumarase foi menor nos grupos suplementados em comparação com OVX. Os níveis de vitamina C são elevados nos grupos EPA, DHA e LA comparados com OVX e SHAM. O dano oxidativo demonstra alta carbonilação de proteína em EPA, DHA e LA quando comparado com OVX e SHAM. Os níveis de malondialdeído foram elevados em EPA em comparação com SHAM. A atividade da superóxido dismutase, da glutathione peroxidase e os níveis da vitamina E não diferem significativamente entre os grupos. Estes resultados demonstram que a menopausa não tem efeito nos rins em relação a medidas de estresse oxidativo neste modelo experimental e que os antioxidantes utilizados não têm um efeito importante nos rins das ratas ovariectomizadas.

## ABSTRACT

Kidneys play several essential regulatory roles in vertebrates like removing excess organic molecules from the blood and the waste products of metabolism. These organs are known as a target of oxidative stress and were chosen due to the possibility to evaluate the effects of menopause and antioxidants in it. Menopause may be associated with oxidative stress in several organs and tissues, but the role played by menopause on oxidative stress (in the kidneys) is not well understood. As an experimental model female rats were used and they were ovariectomized bilaterally to induce the symptoms and effects of menopause. A diet, supplemented with antioxidants, has been introduced to analyze the possible effects in oxidative stress and menopause. Lipoic acid (LA), docohexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) were used as antioxidant supplements. The LA was chosen because of its antioxidant capacity and for being a cofactor of the enzymes involved in the metabolism of lipids. The omega-3 fatty acids (DHA and EPA) are well established as endothelial protective and were used due to their high antioxidant capacity. This study employed 50 three-month-old Wistar female rats (*Rattus norvegicus*). The rats were divided into five groups of ten animals each. Four groups were subjected to bilateral ovariectomy and one group was sham operated, but without removal of the ovaries. The animals were randomly assigned to five groups. Both control group (SHAM) and one ovariectomized group (OVX) received the standard diet; the other operated animals received supplementation were divided in 3 groups according to the diet supplement. Our results showed that the activity of fumarase was lower in the supplemented groups compared with OVX. Vitamin C levels are high in the groups EPA, DHA and LA than in OVX and SHAM. Oxidative damage demonstrates high protein carbonilation in EPA, DHA and LA when compared whit OVX and SHAM. The levels of malondialdehyde were high in EPA compared with SHAM. The activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and the levels of vitamin E don't differ significantly between groups. These results support that menopause has no effect in kidneys in relation to measures related to oxidative stress in this model and that the antioxidants used do not have an important effect in kidneys from ovariectomized rats.



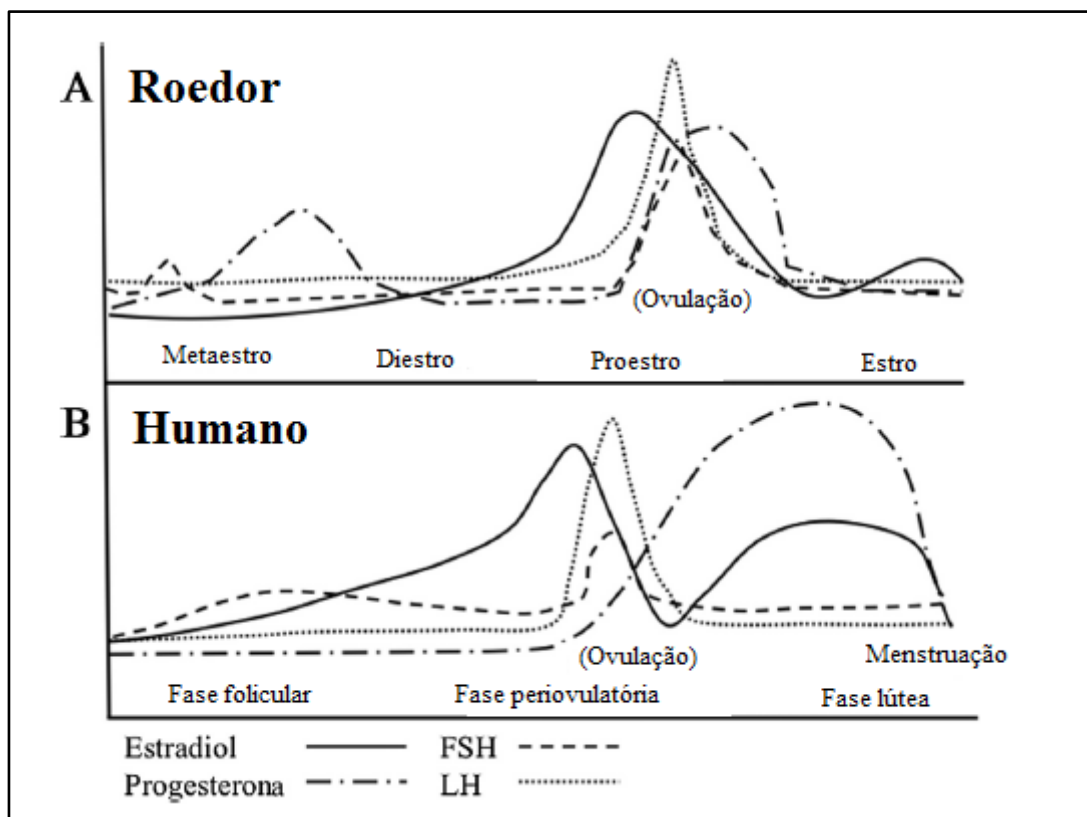
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Menopausa, Estropausa e Ovariectomia

A menopausa pode ser definida como a cessação natural e permanente da menstruação e ovulação devido à insuficiência ovariana. A menopausa "espontânea" ou natural ocorre após 12 meses de amenorreia, uma vez que a secreção do hormônio ovariano diminui (Crawford, 2017). Embora o tempo de vida da grande maioria das espécies não ultrapasse em muito os seus anos reprodutivos, uma clara exceção a esse fenômeno comum é a mulher, cuja vida se estende, atualmente, muito além do estágio da vida reprodutiva. Para as mulheres, a senescência reprodutiva ocorre tipicamente em torno da quinta década de vida, através de uma combinação de ciclos ovulatórios e apoptose normal (isto é, morte celular programada) chamada atresia. A menopausa ocorre quando o ciclo menstrual cessa devido à anovulação (Koebele *et al.*, 2017). O aparecimento da transição da menopausa e subsequente fase de vida pós-reprodutiva vêm acompanhado de uma variedade de mudanças fisiológicas, comportamentais e cerebrais que podem afetar a qualidade de vida da mulher. Muitos fatores de risco à saúde mudam com o envelhecimento e após a menopausa: aumento do risco de doenças cardiovasculares, osteoporose, obesidade, diabetes, acidente vascular cerebral, disfunção sexual, distúrbios de humor, distúrbios do sono e declínio cognitivo (Hickey *et al.*, 2016; Crawford, 2017).

A literatura fornece evidências de que o estresse oxidativo afeta toda a vida reprodutiva de uma mulher, até mesmo a menopausa. Há estudos que sugerem o envolvimento de radicais livres e estresse oxidativo no envelhecimento e em alguns processos relacionados à idade que frequentemente acompanham a menopausa (Miquel *et al.*, 2006; Munoz-Castaneda *et al.*, 2006). Nos últimos anos, diversos autores sugerem o uso de diferentes tratamentos para as mulheres na menopausa em vez da substituição hormonal tradicional. Devido ao fato de que nem todas as mulheres pós-menopáusicas com sintomas da menopausa são consideradas candidatas prováveis a receber terapia hormonal; E também para evitar o aumento do risco de desenvolver câncer de mama, acidente vascular cerebral e/ou complicações cardiovasculares associados com a reposição hormonal (Al-Safi e Santoro, 2014; Taylor *et al.*, 2014). Os tratamentos alternativos incluem, por exemplo, drogas não hormonais, vitaminas, minerais, suplementos antioxidantes e terapias alternativas (Hickey *et al.*, 2016; Crawford, 2017; Shadyab *et al.*, 2017).

Roedores são modelos valiosos e adequados para a investigação da menopausa e envelhecimento, principalmente pelo fato de apresentarem um padrão hormonal bastante semelhante ao humano (Figura 1), mas é necessário reconhecer algumas diferenças fundamentais entre humanos e roedores (Rousseau, 2006). A anatomia da fêmea do roedor difere das mulheres de várias maneiras, incluindo o fato de que os roedores possuem um útero bifurcado, chamado chifres uterinos, que acomoda um grande número de prole por gestação. Os roedores têm um ciclo estral em vez de um ciclo menstrual que difere do humano. O revestimento uterino dos roedores é reabsorvido, ao contrário do que é expelido através da menstruação pela mulher. O ciclo estral das ratas ocorre a cada quatro ou cinco dias e consiste em quatro fases - proestro, estro, metaestro e diestro - que envolvem flutuações hormonais ovarianas semelhantes ao ciclo menstrual humano de 28 dias. Com cerca de 9-12 meses de idade, ratos e camundongos normalmente experimentam ciclos irregulares de estro, a chamada estropausa, caracterizada por um estado de estro persistente (Koebele e Bimonte-Nelson, 2016).



**Figura 1.** Níveis hormonais ovarianos durante a senescência de A) roedores e B) humanos. (Adaptado de Koebele, 2016.)

O uso de modelos animais em pesquisa se dá devido ao fato de poderem portar uma doença ou lesão, inata ou induzida, semelhante a uma condição humana, com o propósito de compreender melhor tal condição ou para o desenvolvimento um novo tratamento, terapia ou estratégia (Moiety *et al.*, 2015; Koebele e Bimonte-Nelson, 2016). Modelos experimentais de menopausa são amplamente utilizados para fins de pesquisa e uma variedade de diferentes metodologias é apresentada na literatura.

O procedimento cirúrgico melhor caracterizado e relatado para induzir a menopausa experimental em ratos e camundongos é a ovariectomia bilateral. O procedimento padrão de ovariectomia é excetar bilateralmente os ovários, os ovidutos (isto é, as trompas de falópio) e as pontas dos cornos uterinos da cavidade peritoneal, deixando os cornos uterinos ligados intactos. A recuperação completa da cirurgia ocorre dentro de uma semana. Este procedimento torna possível em um curto período de tempo a aquisição de ratos fêmea sem secreção de hormônios ovarianos. Além disso, as ratas ovariectomizadas (OVX) demonstram maior risco de apresentar sintomas de osteoporose, hipertrofia cardíaca, disfunções cardiovasculares importantes, atrofia uterina, aumento da temperatura cutânea da cauda, diminuição das concentrações plasmáticas de vitamina A, C e E, e um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os níveis de defesa antioxidante, com aumento de estresse oxidativo e consequentemente maiores chances de danos e uma aceleração do processo de envelhecimento em diferentes tecidos (Moiety *et al.*, 2015; Koebele e Bimonte-Nelson, 2016; Koebele *et al.*, 2017; Lin, 2017).

## **1.2. Espécies Reativas, Radicais Livres e Estresse Oxidativo**

Espécies reativas (ERs) podem ser definidas como moléculas ou elementos químicos altamente reativos que possuem capacidade de interagir com outros elementos, alterando tanto a sua estrutura como sua carga. Os radicais podem ser derivados do oxigênio (EROs) e estes representam a classe mais importante de espécies reativas geradas em sistemas vivos, contudo existem também espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERNs), do bromo (ERB) do enxofre (ERE) e do cloro (ERC). As espécies reativas podem ser classificadas como radicalares e não radicalares: a espécie reativa chamada de radicalar, ou radical livre, é qualquer espécie química (átomo, íon ou molécula) que possua um ou mais elétrons desemparelhados, enquanto

as espécies reativas não radicalares não apresentam o elétron desemparelhado (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Nos organismos aeróbicos, que só respiram na presença de oxigênio, em torno de 95% a 98% do oxigênio absorvido é reduzido, catalisando a formação de água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do oxigênio ( $O_2$ ) pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo simultaneamente 4 elétrons para o  $O_2$ , que se reduz diretamente à água (Rizzo *et al.*, 2012).

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

O  $O_2^{\bullet-}$  é o primeiro intermediário da reação de redução do oxigênio à água e é a partir dele que serão formadas as outras EROs. Uma pequena quantidade desse superóxido também é produzido por atividades enzimáticas que incluem a enzima óxido nítrico sintase (NOs), xantina oxidase (XO), NADPH-oxidase, desidrogenases e peroxidases (Halliwell e Gutteridge, 2015). O ânion radical superóxido é um radical que possui baixa reatividade com a maioria das moléculas biológicas, mas apresenta uma reatividade maior com grupamentos tiol e com metais, como cobre, manganês e ferro. A dismutação do superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD) leva a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), espécie reativa com alta capacidade de se difundir pelos tecidos, que reage com metais, principalmente ferro, na chamada Reação de Fenton (Abreu e Cabelli, 2010).

O  $OH^{\bullet}$  é considerado o radical mais reativo em sistemas biológicos devido a sua facilidade em se ligar a qualquer molécula biológica e até mesmo a metais e outros radicais. Ele tem origem na reação de  $H_2O_2$  com ferro onde ocorre a abstração de um elétron, decompondo o  $H_2O_2$  em ânion hidroxila ( $OH^-$ ) e  $OH^{\bullet}$ . A formação de radicais livres pela Reação de Fenton pode ocorrer principalmente com ferro e cobre, mas também ocorre com níquel, cromo e cádmio (Halliwell e Gutteridge, 2015)

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e a capacidade antioxidante total de um organismo. O dano oxidativo pode ser definido como qualquer modificação molecular, seja ela reversível ou não, com algum efeito deletério, causado por espécies reativas a moléculas biológicas tais como os lipídios, as proteínas e o próprio DNA. Contudo, em condições aeróbicas, as células desenvolveram um sistema de defesa contra as espécies reativas, conhecido como “sistema de defesa antioxidante” (Speakman e Selman, 2011). Antioxidante pode ser definido como: “qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo” (Halliwell e Gutteridge, 2015). Esse sistema é composto basicamente por vitaminas (como a vitamina C e E), metais como o zinco e o selênio, que atuam em conjunto com enzimas; a glutatona (GSH), que é o principal antioxidante não enzimático da célula e também enzimas específicas, as chamadas defesas antioxidantes enzimáticas. As principais enzimas antioxidantes são a SOD, a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx), e a glutatona S-transferase (GST) (Beguel *et al.*, 2013).

As superóxido dismutases são metaloenzimas altamente eficientes na remoção catalítica do  $O_2^{\bullet-}$  (Halliwell e Gutteridge, 2015). Em mamíferos existem três tipos desta enzima: a CuZnSOD-citosólica, descoberta por McCord e Fridovich, em 1969, a qual contém em seu sítio ativo um átomo de cobre (McCord e Fridovich, 1969). A MnSOD-mitocondrial, enzima de estrutura tetramérica que contém um átomo de manganês em seu sítio ativo (Keele *et al.*, 1970). E mais recentemente, Marklund, em 1982, descobriu uma forma extracelular da enzima, conhecida como EC-SOD ou SOD3, a qual também contém um átomo de cobre em seu sítio ativo (Marklund *et al.*, 1982). Essas três formas da enzima catalisam a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em oxigênio e peróxido de hidrogênio.

O  $H_2O_2$  pode então ser removido pela enzima CAT, localizada no interior dos peroxissomos, que catalisa a decomposição direta do  $H_2O_2$  a  $O_2$ . A CAT é uma enzima tetramérica que contém um grupamento  $Fe_{III}$ -heme em seu sítio ativo (Halliwell e Gutteridge, 2015).

As glutatonas peroxidases (GPx) são uma família de enzimas capazes de remover o  $H_2O_2$  e outros peróxidos através do acoplamento da redução do peróxido a água ( $H_2O$ ) à oxidação da glutatona (GSH). Existem pelo menos quatro formas desta enzima. Uma é a enzima citosólica, chamada de GPx1. O plasma de mamíferos contém outra forma, uma glicoproteína chamada de GPx3, que também é encontrada em outros fluidos extracelulares e origina-se principalmente do rim. A GPx3 também pode utilizar,

além da GSH, outro tipo de substrato, a tioredoxina. Existe ainda uma isoforma encontrada no trato gastrointestinal, a GPx2 ou GI-GPx e um quarto tipo, a GPx4 a única que reduz não apenas peróxidos orgânicos sintéticos e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas também hidroperóxidos de colesterol e ácidos graxos (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A molécula da GSH também pode estar envolvida no metabolismo de xenobióticos através da conjugação com a enzima detoxificadora glutathione-S-transferase (GST). Outra função da GST é a degradação de peróxidos orgânicos, porém se diferencia das demais peroxidases por não possuir atividade sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell e Gutteridge, 2015).

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

Além destas enzimas, existem famílias de proteínas que exercem importante papel na sinalização redox na célula: as peroxirredoxinas (Prxs), glutarredoxinas e tioredoxinas. Dentre elas, as Prxs merecem atenção especial, pois é uma família de proteínas extremamente eficazes na eliminação de peróxidos. Elas apresentam propriedades intrigantes que as distinguem dos antioxidantes convencionais, incluindo a susceptibilidade à inativação por hiperoxidação na presença de peróxido em excesso e a capacidade de formar complexos de estruturas oligoméricas. Estas propriedades, em conjunto com uma elevada abundância celular e reatividade com peróxido de hidrogênio, levaram à especulação de que essas Prxs teriam uma função de sensores redox, transmitindo sinais como parte da resposta celular ao estresse oxidativo (Cox *et al.*, 2010).

Marcadores de dano oxidativo auxiliam no estudo do estresse oxidativo. Algumas moléculas formadas pelo ataque direto dos radicais livres são instáveis e reagem até formar moléculas mais estáveis que podem ser utilizadas como marcadores de dano oxidativo. A carbonilação de proteínas é um dos biomarcadores mais comum utilizado para avaliar o dano oxidativo em proteínas, e reflete danos celulares ocasionados por múltiplas formas de espécies reativas. A carbonilação pode ser definida como uma modificação proteica irreversível e não enzimática. Em condições de estresse oxidativo, estes grupamentos são formados diretamente pelo ataque de espécies reativas aos aminoácidos: arginina, lisina, prolina e treonina (Halliwell e Gutteridge, 2015).

A peroxidação lipídica origina complexos e numerosos produtos, os quais são classificados em primários (os hidroperóxidos lipídicos) e secundários, que derivam da  $\beta$ -ruptura dos hidroperóxidos lipídicos. O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da  $\beta$ -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoleico (AL), ácido araquidônico (AA) e o mesmo o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido decosaheptaenoico (DHA). O MDA é considerado, portanto, um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em lipídios (Valko *et al.*, 2006).

### 1.3. Ácidos Graxos Poli-insaturados: DHA e EPA

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções tanto na estrutura das membranas celulares como nos processos metabólicos. Nos humanos, os ácidos: linoleico (18:2n-6, AL) e alfa-linolênico (18:3n-3, ALA) são necessários para manter as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo a partir dos ácidos graxos provenientes da síntese *de novo* (Fares *et al.*, 2012).

Em relação ao número de insaturações, esses ácidos são denominados genericamente de AGPIs, assim como outros ácidos que apresentam duas ou mais insaturações. Em relação ao tamanho da cadeia carbônica, os AGPIs que possuem 18 ou mais átomos de carbono são denominados, por alguns autores, de ácidos graxos de cadeia longa (Richard *et al.*, 2008).

Os AGPIs podem ser divididos em duas famílias: as famílias n-6 e n-3. Essas famílias abrangem ácidos graxos que apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto e terceiro carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal. Os ácidos graxos também podem ser representados por letras gregas minúsculas, para se referir à colocação do carbono no ácido graxo. A alfa ( $\alpha$ ) se refere ao primeiro carbono adjacente ao grupo carboxila, beta ( $\beta$ ) ao segundo carbono e ômega ( $\omega$ ) ao último carbono. As ligações

duplas rotuladas com um  $\omega$  são contadas no carbono metil terminal. Esses ácidos graxos são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos AL e ALA, pela ação de enzimas alongase e dessaturase. As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis* (Rosenberg, 2017; Velho *et al.*, 2017).

O ômega 3 é um tipo de gordura poli-insaturada encontrada principalmente em peixes marinhos de água fria tal como salmão, cavala e arenque devido a ingestão de muitas plantas marinhas, especialmente as algas unicelulares de fitoplancton, que contêm o ácido graxo ômega 3 em sua forma sintetizada, e também em algumas sementes de plantas, óleo de canola, de soja, noz e plantas com folhas verdes escuras. O óleo de linhaça, derivado da semente de linho (*Liniun usitatissimum*), é a fonte mais rica de ALA. O ALA, que pertence e dá origem ao ômega 3, permite a formação de dois importantes ácidos graxos de cadeia longa: o EPA e o DHA (Figura 2) (Richard *et al.*, 2008; Velho *et al.*, 2017).

O EPA é importante por sua ação anti-inflamatória, pois atua na produção de substâncias anti-inflamatórias chamadas prostaglandinas E3. Este ácido pode apresentar benefícios para a saúde cardiovascular e a circulação já que também pode impedir que as plaquetas se unam formando coágulos que podem causar trombose e derrame cerebral. Além disso, o EPA pode ser interessante para pessoas que apresentam sintomas ou doenças de caráter inflamatório, como celulite, obesidade e artrite reumatoide (Gebauer *et al.*, 2006; Fares *et al.*, 2012).

Em relação aos benefícios, o DHA contém propriedade antioxidante e está envolvido com diversos processos cognitivos, além da correta sinalização entre os neurônios. Estudos que afirmam que ele pode impedir a formação de substâncias deletérias para o cérebro e aumentar a produção de substâncias anti-inflamatórias e neuroprotetoras, tendo efeito protetor contra doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. O DHA também tem papel importante no desenvolvimento fetal, além de fazer parte da composição da retina dos olhos (Hagve *et al.*, 1998; Mendez *et al.*, 2013).

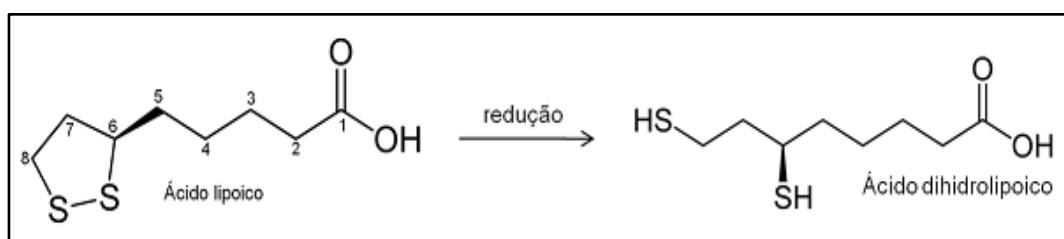




**Figura 2.** Detalhe das estruturas do EPA e do DHA. (Adaptado de Sociedade Brasileira de Química: <http://qnint.sbq.org.br/>)

#### 1.4. O Ácido Lipoico

O LA foi isolado pela primeira vez a partir de fígado bovino em 1951. Desde então muito já se sabe sobre essa substância (Goraca *et al.*, 2011). O LA é uma pequena molécula que contém dois grupos tiol oxidados ou reduzidos. Sua forma oxidada é geralmente definida como ácido  $\alpha$ -lipoico ou apenas ácido lipoico enquanto a forma reduzida é conhecida como ácido dihidrolipoico (ADHL) (Figura 3). ADHL é a forma predominante que interage com espécies EROs, mas a forma oxidada do ALP também pode inativar os radicais livres. Este ácido encontra-se naturalmente nas mitocôndrias, onde se liga à subunidade E2 do complexo piruvato desidrogenase - alfacetoglutarato desidrogenase e onde atua como coenzima da piruvato desidrogenase e da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase. É altamente reativo por causa da tensão da ligação S-S-C no anel dissulfureto heterocíclico. O LA é relativamente estável como um sólido, mas polimeriza quando aquecido acima do seu ponto de fusão (47,5°C) ou sob a influência da luz quando dissolvido numa solução neutra (Bilska e Wlodek, 2005; Demir *et al.*, 2005; Petronilho *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Detalhe da estrutura do ácido lipoico e de sua forma reduzida, o ácido dihidrolipoico. (Adaptado de Sociedade Brasileira de Química: <http://qnint.sbq.org.br/>)

Nos seres humanos, o LA é sintetizado no fígado e em outros tecidos com alta atividade metabólica, como o coração e rim. Ele é sintetizado *de novo* a partir de ácidos graxos e cisteína, mas apenas em quantidades muito pequenas, sendo necessário, portanto, ser absorvido também a partir da dieta. É solúvel tanto em água quanto em gordura e pode, dessa forma, atravessar membranas biológicas facilmente, atingindo assim todos os compartimentos da célula. Recentemente, se tem voltado a atenção à sua função antioxidante e de sua forma reduzida ADHL, pois eles protegem de forma eficaz as células contra os danos induzidos por EROs (Bilska e Wlodek, 2005). O LA é um antioxidante ideal que pode combater uma série de radicais livres, tais como:  $\text{OH}^\bullet$ , ácido hipocloroso e oxigênio singlet. Também pode exercer efeitos antioxidantes em sistemas biológicos devido à quelação de metais de transição (Goraca *et al.*, 2011; Behling *et al.*, 2015).

O complexo LA/ADHL tem ainda a capacidade de reciclar antioxidantes endógenos, tais como as vitaminas E e C. Vários estudos experimentais e clínicos enfatizam a utilidade do LA como um agente terapêutico para diversas condições, incluindo diabetes, aterosclerose, resistência à insulina, neuropatias, doenças neurodegenerativas e lesões de isquemia-reperfusão. Além disso, ele representa um potencial agente terapêutico para o endotélio vascular. O complexo redox LA/ADHL é reconhecido como um dos sistemas antioxidantes biológicos mais poderosos e atualmente é utilizado na prática clínica em estudos, como terapia natural para profilaxia do fígado e do rim, bem como disfunções e doenças de outros órgãos (Demir *et al.*, 2005; Goraca *et al.*, 2011; Cakir *et al.*, 2015).

Foi demonstrado recentemente que ratos idosos que receberam suplemento de LA apresentaram diminuição da peroxidação lipídica e um aumento nas atividades de enzimas mitocondriais, tais como isocitrato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, succinato desidrogenase, NADPH desidrogenase e citocromo C oxidase. Além disso, não foram encontradas alterações significativas na atividade enzimática mitocondrial em ratos jovens tratados. Os autores concluem que o LA reverte o declínio associado à idade nas enzimas mitocondriais e, portanto, pode diminuir o risco aumentado de danos oxidativos que ocorre durante o processo de envelhecimento (Cakir *et al.*, 2015; Petronilho *et al.*, 2016).

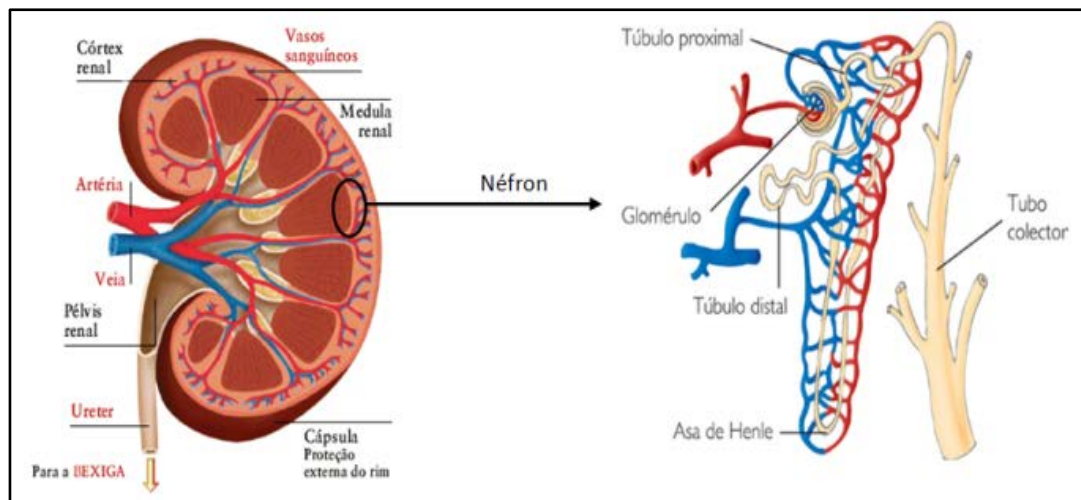
## 1.5. O Rim

O rim dos vertebrados tem origem no mesoderma intermediário da crista urogenital, estrutura encontrada ao longo da parede posterior do abdômen do feto em desenvolvimento. Desenvolve-se em três estágios sucessivos conhecidos como pronefros, mesonefros e metanefros, embora somente os metanefros deem origem ao rim adulto definitivo. No entanto, os estágios anteriores são necessários para o desenvolvimento de outros órgãos, como a glândula adrenal e as gônadas, que também se desenvolvem dentro da crista urogenital. Além disso, muitas das vias de sinalização e genes que desempenham papéis importantes no rim metanéfrico parecem desempenhar papéis paralelos durante os estágios iniciais do desenvolvimento renal, no pronefros e mesonefros.

O pronefro consiste em túbulos pronéfricos e o ducto pronéfrico (também conhecido como precursor do ducto wolffiano) e desenvolve-se a partir da região da crista urogenital aos 22 dias de gestação (humanos) e 8 dias após o coito (camundongos). Funciona nos estágios larvais de anfíbios e peixes, mas não em mamíferos. O mesonefro se desenvolve de forma caudal aos túbulos pronéfricos no meio da crista urogenital. O mesonefro torna-se o aparelho excretor funcional em vertebrados inferiores e pode realizar uma função de filtração durante a vida embrionária em mamíferos. O metanefro, o terceiro e último estágio, dá origem ao rim adulto definitivo dos vertebrados superiores (Bard, 2003; Cho *et al.*, 2003; Vize, 2003; Zhou *et al.*, 2008).

A unidade estrutural e funcional mais básica do rim é chamada néfron que é composto por um glomérulo, parte filtrante do néfron, e um túbulo, responsável por recuperar a maioria do fluido filtrado e eliminar o que deve ser excretado (Figura 4). O glomérulo é composto por uma rede de *loops* capilares, sendo cada um deles revestido por uma única camada endotelial, que é suportada por uma membrana basal e coberta por uma célula epitelial modificada de forma única, conhecida como podócito. Estruturalmente, o túbulo renal é uma estrutura semelhante a um tubo de células epiteliais interconectadas. À medida que o túbulo se aproxima do sistema coletor do rim, as células do revestimento epitelial mudam, e é então chamado de canal coletor. O

canal coletor abre-se subsequentemente para o sistema coletor renal e eventualmente para o sistema urogenital. O néfron e as partes mais proximais do túbulo coletor são derivados de uma fonte embriológica diferente da pelve renal e do sistema urogenital. No desenvolvimento precoce, o broto ureteral, que surge do ducto mesonéfrico, cresce para o tampão metanéfrico. O botão ureteral forma, em última instância, os ureteres, a pelve renal e as partes mais distais do ducto coletor, enquanto que o tampão metanéfrico formará o néfron e o túbulo proximal (Vize *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Estrutura e composição do rim e do néfron. (Adaptado do livro: Renal Physiology, 2012.)

Cada minuto de cada dia, o organismo é confrontado com uma série de desafios para manter a homeostase. Os processos metabólicos necessários para manter-nos vivos requerem combustíveis e resultam na produção de resíduos químicos e ácidos. O pH do sangue e de outros fluidos corporais que existem dentro e fora das células deve ser cuidadosamente regulado para permitir que as reações enzimáticas prossigam de forma eficiente. A água e a concentração de eletrólitos-chave, como sódio e potássio, devem ser monitoradas e ajustadas para manter a pressão sanguínea e a função celular adequada (Mulroy *et al.*, 2003). Os rins são órgãos vitais que desempenham um papel crítico para garantir que o corpo é capaz de enfrentar com êxito esses desafios. Quando a função renal é prejudicada, estes processos são alterados e a homeostase é interrompida o que pode resultar em intoxicação e morte do organismo (Vize *et al.*, 2003).

É o rim que tem a função de determinar o equilíbrio de água e eletrólitos, ao mesmo tempo em que assegura a remoção dos resíduos do nosso corpo. Em resposta a estímulos importantes de outras partes do corpo, o rim é capaz de regular o processo de absorção para controlar as alterações na quantidade de uma substância ingerida ou produzida pelo indivíduo. Hormônios do cérebro, coração, glândula adrenal e outros órgãos, que estão constantemente monitorando o estado interno do corpo, regulam este processo. Em última análise, de forma bem orquestrada e coordenada, a combinação de estímulos desses órgãos e a capacidade do rim de responder a esses estímulos permitem que nossos corpos mantenham o equilíbrio líquido de água e partículas. Assim, mesmo nos dias em que ingerimos ou perdemos grandes quantidades de água, sódio, potássio ou outros eletrólitos, nossos rins excretam apenas o suficiente para manter um estado estacionário e o resultado é que a concentração dessa substância no corpo permanece constante (Danziger, 2012).

## **1.6. Os Rins e a Menopausa**

Quando a mulher entra na menopausa, os rins podem perder uma porcentagem significativa de suas funções, algo esperado com o avanço da idade. Estes órgãos são necessários para ativar a vitamina D e, sem ela, o organismo perde cálcio. O coração também está ligado ao equilíbrio entre rins e ossos. A contração da musculatura cardíaca, assim como de qualquer músculo, requer cálcio no sangue. Se a substância faltar por insuficiência renal, o metabolismo do corpo acelera a queima do estoque natural do organismo, o esqueleto, para manter o coração batendo (Cheung *et al.*, 2015).

Tudo acontece sem avisos aparentes no corpo. Osteoporose e osteopenia (estágio inicial da doença) são quase totalmente assintomáticas e atingem sete vezes mais mulheres justamente pela influência da menopausa no organismo. A perda de função renal também é silenciosa e ela pode se transformar em uma doença renal crônica requerendo diálise ou transplante renal (Mcfarlane *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2016).

A perda óssea de cálcio pode ser agravada ainda mais pela falência renal. Em um levantamento recente, a Sociedade Brasileira de Nefrologia revela que o problema está se tornando mais comum em mulheres, que já representam 43% dos pacientes com doença renal crônica. Conforme a mulher perde sua função renal, um processo

inflamatório é gerado interferindo no metabolismo de cálcio e provocando acúmulo de fósforo no organismo. Ambos os fatores contribuem para a calcificação dos vasos sanguíneos e aumento das chances de se desenvolver doenças ainda mais graves tanto nos rins como no organismo. Além disso, a insuficiência renal desencadeada pela menopausa pode acometer o coração causando: anemia, edema (inchaço), piora do controle da pressão arterial e elevação dos níveis de gordura no sangue (colesterol e triglicérides) (Koek *et al.*, 2017; Paschalis *et al.*, 2017).

### **1.7. Os Rins e o Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo desempenha ação importante sobre o envelhecimento renal e fortes implicações nas doenças renais. Foi demonstrado que o declínio da função renal está relacionado ao envelhecimento e é acompanhado por estresse oxidativo, e que a administração de antioxidantes, tais como a vitamina E, atenuam este declínio (Reckelhoff *et al.*, 2006). Foi possível identificar uma queda de 60% da taxa de filtração glomerular com o envelhecimento e um aumento de três vezes de F2-isoprostano renal, marcador bioquímico que identifica lesão oxidativa, proveniente da peroxidação do AA durante o estresse oxidativo. Um aumento nos produtos finais avançados da glicosilação e de seus receptores, cuja interação tem demonstrado induzir ao estresse oxidativo. Também foi encontrado que a administração de altas doses de vitamina E na dieta (5,000 IU/kg) aumentou a taxa de filtração glomerular em 50%, a geração de F2-isoprostanos foi reduzida. Houve também uma tendência de atenuação da esclerose glomerular (Negri, 1999; Reckelhoff *et al.*, 1999).

O aumento do estresse oxidativo e da peroxidação de lipídeos no envelhecimento renal está correlacionada com um acréscimo nos produtos finais da glicosilação (Buemi *et al.*, 2005). Iglesias de la Cruz e colaboradores (2000) demonstraram um aumento na produção de EROs no rim de ratos com envelhecimento. Esse estudo verificou o papel protetor da taurina na esclerose renal progressiva relacionada com a idade. Segundo os autores, levando em conta que a taurina é considerado um aminoácido com papel antioxidante, os dados obtidos sugerem que EROs exercem um papel na fisiopatologia da fibrose renal progressiva relacionada com o envelhecimento (Iglesias-De La Cruz *et al.*, 2000). Zhu e colaboradores (2004) relataram que as EROs podem atuar como vasoconstritores diretos, mediadores

inflamatórios, e fatores fibrinogênicos, sendo que em um rim isquêmico, essas espécies reativas medeiam principalmente a fibrose (Zhu *et al.*, 2004).

A senescência renal nos humanos é caracterizada pela diminuição da massa e do número de células, com aumento na heterogeneidade e o aparecimento de anormalidades focais, especialmente em mulheres, cujo processo é acentuado devido à menopausa (Gourtsoyiannis *et al.*, 1990). O envelhecimento renal pode estar associado com o aumento da peroxidação lipídica, redução da função dos rins e aumento da esclerose glomerular (Reckelhoff *et al.*, 1999). A partir dos 40 anos ocorre diminuição de cerca de 10 % do número de néfrons funcionais a cada 10 anos, isso somente devido ao processo de senescência. Dessa forma, mesmo em pessoas saudáveis a função renal diminui em torno de 40% a 50% na oitava década de vida. De acordo com o *Baltimore Longitudinal Study on Aging*, a média de diminuição da filtração glomerular com o envelhecimento, em condições normais, (isto é, excluindo-se a menopausa, a presença de patologias renais pré-existentes, a hipertensão arterial e insuficiência cardíaca), é de 0,75/ml/min/ano (Lindeman *et al.*, 1985).

Além disso, de acordo com Thomas e colaboradores (1998), a redução da produção de óxido nítrico nos capilares peritubulares pode contribuir para o desenvolvimento da isquemia túbulo-intersticial crônica e para o dano no túbulo-intersticial associado com o envelhecimento. A disponibilidade de óxido nítrico diminui com o envelhecimento renal e tal fato se deve ao sequestro de óxido nítrico pelo radical superóxido produzido pela enzima NADPH-oxidase. Dessa forma, o estresse oxidativo, pela depleção do óxido nítrico, pode contribuir para o desenvolvimento das alterações estruturais e hemodinâmicas características do envelhecimento renal (Thomas *et al.*, 1998).

O envelhecimento associado ao estresse oxidativo pode levar a diversas alterações escleróticas nas paredes dos vasos renais. Mais de 20% dos rins envelhecidos apresentam alterações da vascularização intrarenal, como, por exemplo, espessamento da íntima das artérias interlobulares e hialinização das arteríolas com graus variados de estenose do rim (Tracy *et al.*, 2002).

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o efeito da estropausa induzida em um modelo experimental altera o perfil oxidativo (dano oxidativo e resposta ao estresse) nos rins de ratas fêmeas e o efeito da administração de antioxidantes do tipo ômega 3 e ácido lipoico nesses órgãos.

### **2.1. Objetivos específicos**

#### **Nos rins:**

Mensurar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, fumarase e o consumo de peróxido de hidrogênio;

Determinar os níveis dos marcadores de dano oxidativo em peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas;

Quantificar os antioxidantes não enzimáticos: vitaminas C, vitamina E e glutathione total.

#### **No soro:**

Determinar os níveis hormonais de estradiol.



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

Artigo científico ainda não submetido até o término dessa dissertação, mas que utilizou a revista **Molecular Nutrition & Food Research** como modelo pela significativa relevância de seu conteúdo com os assuntos abordados nesse trabalho.

---

## **Menopause and the effects in the kidney of supplementation with omega-3 and lipoic acid**

Jordana S. Putti<sup>1,2</sup>, Vanessa K. Engers<sup>2</sup>, Fernanda M. Heemann<sup>2</sup>, Fernanda S. Hackenhaar<sup>1,2</sup>, Tiago B. Salomon<sup>1,2</sup>, Mara S. Benfato<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Correspondence:** Dr. Mara Silveira Benfato - E-mail: [mara.benfato@ufrgs.br](mailto:mara.benfato@ufrgs.br)

**Keywords:** Kidneys / Lipoic acid / Ovariectomy / Oxidative stress / Polyunsaturated fatty acids.

**Abbreviations:** DHA, docosahexaenoic fatty acid; EPA, eicosapentaenoic acid; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GSSG, glutathione disulfide; GST, glutathione S-transferase; HPLC, high performance liquid chromatography NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase LA, lipoic acid; MDA, malondialdehyde; OVX, ovariectomized group; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SOD, superoxide dismutase; Vit. C, vitamin C; Vit. E, vitamin E.

## Abstract

**Scope:** Menopause may be associated with oxidative stress in kidneys. The ovariectomy in rats is an experimental model used to analyze the effects of the menopause and strategies to mitigate its effects and was applied in this work. A diet with antioxidants supplementation has been used to reduce the potential oxidative stress that menopause may cause. Our objective was to evaluate the oxidative profile in kidneys of ovariectomized rats and to determine the damage, the enzymatic and the nonenzymatic antioxidant responses.

**Methods and results:** We assessed the effects of oxidative stress and antioxidant defenses in the kidney of ovariectomized rats supplemented with docosahexaenoic fatty acid (DHA), eicosapentaenoic fatty acid (EPA) and lipoic acid (LA). We found that these antioxidants increased the levels of vitamin C, the activity of glutathione *S*-transferase and ratios of GSH/GSSG, and reduces the fumarase activity, but do not have effect in the levels of vitamin E, in the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase and in the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Supplementation with DHA and EPA increased lipid peroxidation and protein damage in kidneys.

**Conclusion:** These results suggest that the antioxidant response varies in kidney. In this study the supplementation had a pro-oxidant effect and the ovariectomy did not measurably influence oxidative stress.

## 1. Introduction

Menopause can be defined as a phase of aging in the females' reproductive system. It is a normal process characterized by a permanent cessation of the ovarian follicular activity and menstrual cycle [1]. The changes are prominent with menopause, mainly with decreased serum estradiol [2, 3]. The risk of cardiovascular disorders, such as hypertension and atherosclerosis, and the incidence of renal disorders increase significantly during the process. The reduction of estrogens also has a detrimental effect on serum antioxidant status in menopausal women. Additionally, several studies have demonstrated that decreased estrogen levels at menopause are associated with elevated oxidative stress [3, 4]. This oxidative stress is often the underlying mechanism which causes vascular alterations and cardiac damage [5].

The disorders and the symptoms associated with menopause and the knowing estrogen reduction have become an important health concern worldwide. Many therapies have targeted the hormonal decline in estrogen and have also expanded to include lifestyle modifications, such as diet [6]. Estrogen regulates transcription of antioxidant enzymes and a decline in this hormone can lead to oxidative stress, and foods rich in antioxidants have been shown to be of great benefit. A dietary supplementation with antioxidants could help the organism to deal with the loss of estrogen's influence in the oxidative stress in women experiencing menopausal symptoms, helping them to eliminate oxidative stress within the body [5, 7].

An alternative for the treatment of menopausal symptoms is the use of the long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic fatty acid (DHA), which play important roles in cardiovascular, neurological and physiological regulatory processes [8, 9]. EPA and DHA are found in seafood, especially oily fish, and in fish oil-type supplements [9]. Other important antioxidant in supplementation is the lipoic acid (LA). The biological effects of LA are primarily associated with its antioxidant properties. LA also exhibits antimutagenic and anticarcinogenic activities and a number of experimental as well as clinical studies emphasize the usefulness of LA as a therapeutic agent for diverse conditions, including diabetes, atherosclerosis, insulin resistance, neuropathy, neurodegenerative diseases and ischemia-reperfusion injury [10-12]. Dietary LA is obtained from both animal and plant sources. LA is found primarily in animal-derived foods, such as red meat and liver, heart and kidney. The most abundant plant sources of LA are spinach and broccoli [12, 13].

Kidneys are essential to the urinary system and play several essential regulatory roles in vertebrates like removing excess organic molecules from the blood and the waste products of metabolism [14]. They are known as a target of oxidative stress and renal

damage can be a consequence of this oxidative stress generated by menopause [13, 15]. Besides that there are still few studies with the effect of menopause in the kidneys.

Experimental animal models can be used in medical testing in order to resemble effects occurring among the human being, since human studies in menopause and having kidney as target are still poorly feasible, [6, 16]. Rodents' genetic, biological and behavior characteristics mimic those of human and they suffer hormonal fluctuations in middle age (estropause) similar to the menopause in women, thus ovarian hormone depletion/estrogen deficiency can be studied using rodent models after the removal of the ovaries [ovariectomy (OVX)]. Rodent models, especially laboratory rats and mice, are particularly useful because of their well-defined aging trajectories and thoroughly studied brain and reproductive systems, as well as their approximate two to three year lifespan and similarly to women, rodents experience regular reproductive cycles in adulthood, as well as age-related dysregulation of this cycle, ovarian changes and gonadal hormone fluctuations. Many researchers have utilized the ovary-intact female as a model of human menopause to evaluate the changing brain, pituitary, and ovary interactions with age [17].

There are no studies associating redox profile and the possible effects of a supplementation with PUFAs or lipoic acid in the kidneys of ovariectomized rats as a model for menopause. Thus, we evaluated the antioxidant enzymatic and non-enzymatic responses and oxidative damage in this organ.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Animals

A total of 50 three-month-old female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used in the present study. They were divided in five groups containing ten animals each. Five rats were maintained per cage in a room under controlled conditions ( $24 \pm 1^\circ \text{C}$ , 12 h light/dark cycle) with free access to water. The surgical procedure was performed under general anesthesia. Immediately after surgery, while still under anesthesia, the rats received a combination of antibiotics and anti-inflammatory drugs (Pencivet PPU Plus, Intervet/Schering-Plough Animal Health, 0.1 ml/100 g, i.m.; containing (per 100 ml): procaine benzylpenicillin G, 10.000.000 IU, benzathine benzylpenicillin G, 10.000.000 IU dihydrostreptomycin, 10.5 mg, piroxicam 1.0 mg). After surgery, the animals were maintained under a heat lamp until recovered from anesthesia. The details of the animal preparation were previously published [18].

All animal studies followed the rules from the EU Directive for animal experiments 2010/63/EU and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (DHEW Publication No. (NIH) 85-23, revised in 1996, Office of Science and Health Reports, Division of Research Resources/NIH, Bethesda, MD,

USA) and were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## 2.2 Diets

One week after surgery, the animals were randomly assigned to five groups. Two groups received standard diet: the sham-operated control group (**SHAM**) and one ovariectomized group (**OVX**); the other three were formed only by operated animals and were grouped according to the received supplementation: **DHA** (predominance of docosahexaenoic acid ethyl ester: 1 g/kg body weight/day DHA plus 0.2 g/kg body weight/day EPA; capsule 1 g fish oil with 500 mg DHA and 100 mg EPA, PO9037701 Naturalis, SP, Brazil), **EPA** (predominance of EPA ethyl ester: 1 g/kg body weight/day EPA plus 0.2 g/kg body weight/day DHA; capsule 1g fish oil with 540 mg EPA and 100mg DHA, PO9037701 Naturalis, SP, Brazil), and **LA** (supplementation of alpha-Lipoic Acid: 180 mg/kg body weight/day LA, Pharmanostra, SP, Brazil). All five groups received the diets for a period of 16 weeks. The experimental diets were formulated with fish oil and alpha-LA and were blended daily into the standard diet in order to avoid fatty acid oxidation and loss of antioxidants before their use. The SHAM group was fed *ad libitum*. The food intake of OVX groups was limited to that of the SHAM group in order to reduce ovariectomy-induced weight gain. The food intake was recorded daily and all animals were weighted weekly. All diets had a total of 4% fat and at least 2% corn, soybean and wheat oils. These proportions are slightly above the minimum required to prevent deficiency of long chain omega-3 PUFA (1%).

## 2.3 Obtaining kidneys and processing

All animals were euthanized according to the experimental protocol with an intraperitoneal injection containing a mixture of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) [19]. After perfusion using a saline infusion, the kidneys were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. For the analysis, the kidneys of each animal were processed with manual maceration. The macerated tissues were mixed in 1 mL with 30 mmol/L phosphate buffer, 120 mmol/L KCl, 100 mmol/L PMSF, pH 7.4, sonicated three times for 10s each, and centrifuged for 10min, 1700 x g. The supernatant of each tube was transferred to a second tube and centrifuged again for 10min at 1700 x g. The supernatant from the second centrifugation was aliquoted and frozen at -80 °C for later analysis and assays.

## 2.4 Hormonal level measurements

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

## 2.5 Assays for enzymatic antioxidants

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured using the RanSOD kit (Randox, UK), with absorbance measured at 505 nm and enzymatic kinetics of GPx was assessed by the Ranse Kit (Randox, UK), with absorbance measured at 340 nm. The activities were expressed as U/mg of protein. The consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was evaluated by measuring the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption via absorbance at 240nm [20]. The activity was expressed as units per milligram of protein. The fumarase activity was accessed by the conversion of fumarate to malate and measured at 240 nm [21]. GST activity was measured by the GST-catalyzed reaction of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with reduced glutathione using absorbance at 340 nm [22]. GST activity was expressed as U/mg of protein.

## 2.6 Assays for non-enzymatic antioxidants

Vitamin C (Vit. C) levels were assayed by HPLC employing a reverse-phase SUPERCOSIL™ LC-18- DB HPLC Column (15 cm x 4.6 mm), using a mobile phase (30mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol in flow rate of 1 mL/min. The absorbance of the column effluent was monitored at 250 nm [23]. The amount of Vitamin E was measured by HPLC using a 15 cm x 4.6 mm column (Nucleosil 120 C-18) with a continuous flow of 2mL/min methanol:water. Detection was carried out by fluorescence (295 nm excitation and 350 nm emission) [24]. The assay method for glutathione (GSH) involves oxidation of GSH by the sulfhydryl reagent 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to form the yellow derivative 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB), measurable at 412 nm. The glutathione disulfide (GSSG) formed can be recycled to GSH by glutathione reductase in the presence of NADPH [25]. Color development was read at 412 nm, and the level was expressed as μmol of glutathione/mg of protein.

## 2.7 Assays for oxidative damage

As an index of protein damage, carbonyl levels were marked with 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) and measured at 370 nm [26]. Malondialdehyde (MDA), an index of lipid peroxidation, was measured by HPLC simultaneously with Vit. C [23].

## 2.8. Data normalization

All results were normalized to protein content with BSA (bovine serum albumin) as a standard [27]. All assays were independently performed in triplicate.

## 2.9 Statistical analysis

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

### 3. Results

#### 3.1 Hormone levels

The estrogen levels in all the ovariectomized groups were significantly decreased compared to the SHAM group (Table 1). This result demonstrates the successful induction of the surgical estropause.

#### 3.2 Enzymatic antioxidants

None of the supplemented groups (LA, DHA and EPA) exhibited a significant difference from ovariectomized OVX and SHAM groups in the levels of SOD, GPx and consumption of  $H_2O_2$  (Table 2). The activity of the enzyme fumarase in ovariectomized group (OVX); was higher compared to all other supplemented groups and compared to SHAM. The supplemented groups (LA, DHA and EPA) did not differ between them. DHA had a lower fumarase activity than the SHAM group (Fig. 1A). GST activity was increased in all supplemented groups (LA, DHA and EPA) compared to OVX and to the SHAM group (Fig. 1B). The LA group also had higher activity compared to DHA and EPA groups.

#### 3.3 Non-enzymatic antioxidant

Vit. C levels in all supplemented groups were higher than those in the SHAM group, but did not differ from those in OVX. OVX had no significant difference compared to the SHAM group (Fig. 2A). With respect to glutathione, the supplemented groups showed higher ratios of GSH/GSSG than those in OVX and in the SHAM group. These two later groups did not differ between themselves (Fig. 2B). There were no significant changes in the levels of Vit. E between groups (Table 3).

#### 3.4 Oxidative damage



The EPA group exhibited increased levels of protein carbonylation in kidneys tissues when compared to all other groups. DHA exhibited significantly decrease of protein carbonylation only when compared with EPA. The LA group exhibited high protein damage than the OVX and less than EPA, but did not differ from DHA and the SHAM group. OVX and the SHAM group did not differ between themselves. (Fig. 3A) The only observed difference in MDA (lipid peroxidation indicative of oxidative damage) was higher levels in EPA than in the SHAM group (Fig 3B).

#### 4. Discussion

Some of the symptoms and processes shown by many menopausal and postmenopausal women are linked not only to the reduction of estrogens but also to high levels of oxygen stress which is often accompanied by defenses deficiency and health loss. The ovariectomy has been described as a valid model for induction of estropause, and reproduces the numerous physiological changes that occur with estrogen deprivation in different organs [3, 28, 29]. The presented results showed a reduction of the estrogen levels in the serum of the ovariectomized rats, confirming the surgical induction of estropause (Table 1).

In the present study, the effects of dietary supplementation with n-3 PUFA and alpha-lipoic acid were assessed in the kidneys of an animal model of menopause. The enzymatic antioxidant activity measured through consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SOD and GPx activity was not altered in groups (Table 2). These findings showed that both ovariectomy and supplementation had no effect in the activity of these enzymes. In all supplemented groups, GST (an important detoxifying enzyme) had its activity increased but since there was no difference among OVX and the SHAM group, this enzyme may have been overexpressed as a result of supplementation (Fig 1B).

When we analyze the enzyme fumarase, an increased activity occurred mainly in the group OVX (Fig 1A). This enzyme catalyzes the conversion of l-malic acid to fumaric acid. In eukaryotes, fumarase is known to participate in the tricarboxylic acid cycle in the mitochondrial matrix [30]. Interestingly, fumarase enzymatic activity is also required for its extra-mitochondrial function during the cellular response to DNA damage [30, 31]. The presented assay for this enzyme did not discriminate between mitochondrial and extra mitochondrial activity, thus this finding can suggest either that OVX has a high DNA damage and is requiring fumarase for repairs or just that this group has a high mitochondrial activity of the enzyme.

Our result showed no change in the profile of vitamin E levels among groups (Table 3). However, vitamin C was high in all supplemented groups compared to the SHAM group but not compared to the OVX (Fig 2A). Clearly, both supplementation with LA and PUFAs had an effect in this vitamin levels in the kidneys of these rats. The vitamin C can act as a reducing agent trapping peroxy radicals and preventing the propagation of lipid-degradation chain reactions in cellular membranes [32]. Supplementation may have

induced a high production of this vitamin, but it is important to emphasize that rats can naturally synthesize vitamin C and that this process takes place in the liver [33].

GSH is the most abundant intracellular antioxidant which serves as a substrate to other enzymes such as glutathione peroxidase and can also form conjugates with some harmful endogenous and xenobiotic compounds via catalysis of glutathione S-transferase [34, 35]. Glutathione can reduce disulfide bonds formed within cytoplasmic proteins to cysteines by serving as an electron donor. In the process, glutathione is converted to its oxidized form, glutathione disulfide (GSSG). The ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione within cells is often used as a measure of cellular oxidative stress [35-37]. Our results showed a decreased ratio of GSH/GSSG in OVX and in the SHAM group compared with supplemented groups, but these two groups are not different between themselves (Fig. 2B), by this way we can affirm that menopause has no effect in the ratio of this antioxidant and that the supplementation increased the synthesis of GSH and reduced GSSG (data not shown).

In relation to oxidative damage, protein carbonylation levels were highest in EPA (Fig. 3A). This result showed that supplementation with EPA was enhancing protein carbonylation in the kidneys of these ovariectomized rats. The group supplemented with LA had a higher level of protein carbonylation than OVX. Thus, when we analyze this protein damage marker we can conclude not only that ovariectomy had no effect in it, but supplementation with antioxidants may be more harmful than usual diet of these animals.

These results are in agreement with previous assays performed by our research group, in which the brains of these same rats showed higher levels of protein carbonylation in the supplemented groups when compared to the controls [18]. Regarding lipid damage, we found that MDA levels in the kidneys were not altered by ovariectomy and that EPA supplementation can increase oxidative lipid damage in these organs (Fig. 3B). It also showed that supplementation with large doses of DHA induced oxidative stress in the kidneys of ovariectomized rats. These findings suggest that incorporation of fatty acids occurred differently in the supplemented groups since the EPA group had higher protein and lipid damage. Previous studies demonstrate that increasing levels of n-3 fatty acids in membranes affect the uptake and intracellular metabolism of fatty acids as well as membrane fluidity in the kidney. Fares[38], in a study with renal cell model, demonstrates that the fatty acids may represent new mechanisms by which renal membrane fatty acid composition homeostasis could occur since supplementations with long chain polyunsaturated fatty acids or their precursors lead to a particular regulation through lipidome (desaturases and elongases) associated to preserved omega-3 ratios.[38-40].

Others studies showed that supplementation with n-3 PUFA in Wistar rats can decrease protein carbonylation in the liver, plasma, kidney and skeleton muscle. The rats in these studies were females, but not ovariectomized and the control groups were supplied with the vegetable oils from soybean and linseed. The antioxidant effect of EPA and DHA turned out to be dependent on the ratio of these components, exhibiting protective effects at a 1:1 ratio [41, 42]. In our study, the doses of omega-3 used (1 g/kg) can explain the

high levels of protein and lipid damage in the animals. These doses may be very high for rats, as they are the recommendation for human adults by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [7, 43]. This fact could explain why these animals have more oxidative damage when compared with the ovariectomized (OVX) and even the non-ovariectomized animals (SHAM).

The lipoic acid is recognized as a universal antioxidant and is capable of scavenging free radicals, chelating metals, regenerating endogenous antioxidants and modulating various signal transduction pathways. It is unique among antioxidants in its ability to display antioxidant properties in both oxidized and reduced forms as well as in both lipid and aqueous environments [10, 44]. LA as an antioxidant is able to directly scavenge ROS, regenerate endogenous antioxidants, such as glutathione, and vitamins E and C, and possess metal chelating activity [45]. This ability to regenerate other antioxidants can explain our results in groups supplemented with LA in levels of vitamin C, activity of GST and also in ratio of GSH/GSSH.

The studies with antioxidants supplementation are very controversial. In recent studies by our research group we analyzed the involvement of oxidative stress and the role of antioxidant supplementation on dry eye disease and in the brain [18, 44]. The effects of supplementation and ovariectomy were much diversified. Although the same animals and the same dosage of omega-3 and LA were used, dietary supplementation shows to be protective in some organs and harmful in others.

This research is important because there is no previous study on the kidney focusing all: ovariectomy as a model for estropause, the oxidative stress and the supplementation with antioxidants n-3 PUFA and lipoic acid. The present data provides evidence that menopause has no effect in this model and that the antioxidants used do not have an important effect in kidneys from ovariectomized rats. It would be very interesting as perspective to evaluate these conditions in other organs and with different doses of antioxidants.

*J.S.P contributed to manuscript preparation, oxidative stress assays, animal feed, and statistical tests. V.K.E., F.M.H., F.S.H. and T.B.S. contributed to the oxidative stress assays, animal feed, and surgical procedures. M.S.B. contributed to manuscript preparation and orientation.*

*We thank Z. Almeida for technical assistance. This research was supported by grants from CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian agencies for research support).*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5. References

1. Koebele, S.V., and Bimonte-Nelson, H.A. (2016). Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas* 87, 5-17.
2. Akcay, T., Dincer, Y., Kayali, R., Colgar, U., Oral, E., and Cakatay, U. (2000). Effects of hormone replacement therapy on lipid peroxides and oxidation system in postmenopausal women. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* 59, 1 5.
3. Mercantepe, T., Unal, D., Selli, J., Mercantepe, F., Unal, B., and Karabiyik, T.N. (2016). Protective effects of estrogen and bortezomib in kidney tissue of post-menopausal rats: an ultrastructural study. *Renal Failure* 38, 1129-1135.
4. Bednarek-Tupikowska, G., Tupikowski, K., Bidzinska, B., Bohdanowicz-Pawlak, A., Antonowicz-Juchniewicz, J., Kosowska, B., and Milewicz, A. (2004). Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecological Endocrinology* 19, 57-63.
5. Miquel, J., Ramirez-Bosca, A., Ramirez-Bosca, J.V., and Alperi, J.D. (2006). Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 42, 289-306.
6. Moiety, F.M.S., Salem, H.A., Mehanna, R.A., and Abdel-Ghany, B.S. (2015). Comparative study on induction and effects of surgical menopause in a female rat model: a prospective case control study. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8, 9403-9411.
7. Gebauer, S.K., Psota, T.L., Harris, W.S., and Kris-Etherton, P.M. (2006). n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *American Journal of Clinical Nutrition* 83, 1526S-1535S.
8. Vericel, E., Polette, A., Bacot, S., Calzada, C., and Lagarde, M. (2003). Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1, 566-572.
9. Richard, D., Kefi, K., Barbe, U., Bausero, P., and Visioli, F. (2008). Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological Research* 57, 451-455.
10. Bilska, A., and Wlodek, L. (2005). Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacological Reports* 57, 570-577.
11. Demir, U., Demir, T., and Ilhan, N. (2005). The protective effect of alpha-lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. *Ophthalmologica* 219, 49-53.
12. Goraca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., and Skibska, B. (2011). Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports* 63, 849-858.
13. Cakir, T., Polat, C., Basturk, A., Gul, M., Aslaner, A., Durgut, H., Sehirli, A.O., Aykac, A., Bahar, L., and Sabuncuoglu, M.Z. (2015). The effect of alpha lipoic acid on rat kidneys in methotrexate induced oxidative injury. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19, 2132-2139.
14. Vize, P.D., Woolf, A.S., and Bard, J.B.L. (2003). *The Kidney*, (San Diego: Academic Press).

15. Cheung, K.L., Stefanick, M.L., Allison, M.A., LeBlanc, E.S., Vitolins, M.Z., Shara, N., Chertow, G.M., Winkelmayr, W.C., and Tamura, M.K. (2015). Menopausal symptoms in women with chronic kidney disease. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society* 22, 1006-1011.
16. Speakman, J.R., and Garratt, M. (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *Bioessays* 36, 93-106.
17. Maffucci JA, G.A. (2006). Age-related changes in hormones and their receptors in animal models of female reproductive senescence. In *Handbook of Models for Human Aging*, P.M. Conn, ed. (San Diego: Elsevier Academic Press), pp. 533-552.
18. Behling, C.S., Andrade, A.S., Putti, J.S., Mahl, C.D., Hackenhaar, F.S., da Silva, A.C.A., Silva, M., Salomon, T.B., dos Santos, C.E.I., Dias, J.F., et al. (2015). Treatment of oxidative stress in brain of ovariectomized rats with omega-3 and lipoic acid. *Molecular Nutrition & Food Research* 59, 2547-2555.
19. Hackenhaar, F.S., Salomon, T.B., Gil Alabarse, P.V., Ehrenbrink, G., and Benfato, M.S. (2009). Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochemistry and Function* 27, 378-382.
20. Aebi, H. (1984). CATALASE INVITRO. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
21. Mescam, M., Vinnakota, K.C., and Beard, D.A. (2011). Identification of the Catalytic Mechanism and Estimation of Kinetic Parameters for Fumarase. *Journal of Biological Chemistry* 286, 21100-21109.
22. Tsuchida, S. (2001). Regulation of glutathione transferase expression and function in stress response. *Seikagaku* 73, 89-92.
23. Karatepe, M. (2004). Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America*, 104-106.
24. Barbas, C., Castro, M., Bonet, B., Viana, M., and Herrera, E. (1997). Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 778, 415-420.
25. Rahman, I., Kode, A., and Biswas, S.K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protocols* 1, 3159-3165.
26. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., and Stadtman, E.R. (1990). DETERMINATION OF CARBONYL CONTENT IN OXIDATIVELY MODIFIED PROTEINS. *Methods in Enzymology* 186, 464-478.
27. Bradford, M.M. (1976). RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
28. Munoz-Castaneda, J.R., Muntane, J., Herencia, C., Munoz, M.C., Bujalance, I., Montilla, P., and Tunez, I. (2006). Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. *Gynecological Endocrinology* 22, 74-79.
29. Guo, Y.C., Sun, N.Y., Duan, X.B., Xu, X., Zheng, L.W., Seriwatanachai, D., Wang, Y.Y., and Yuan, Q. (2016). Estrogen Deficiency Leads to Further Bone Loss in the Mandible of CKD Mice. *Plos One* 11.

30. Yogev, O., Naamati, A., and Pines, O. (2011). Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *Febs Journal* 278, 4230-4242.
31. Jiang, Y.H., Qian, X., Shen, J.F., Wang, Y.G., Li, X.J., Liu, R., Xia, Y., Chen, Q.M., Peng, G., Lin, S.Y., et al. (2015). Local generation of fumarate promotes DNA repair through inhibition of histone H3 demethylation. *Nature Cell Biology* 17, 1158-+.
32. Kim, H., Bae, S., Kim, Y., Cho, C.-H., Kim, S.J., Kim, Y.-J., Lee, S.-P., Kim, H.-R., Hwang, Y.-i., Kang, J.S., et al. (2013). Vitamin C prevents stress-induced damage on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF-alpha, and ROS production in Gulo (-/-)(Vit C-Insufficient) mice. *Free Radical Biology and Medicine* 65, 573-583.
33. Gupta, S.D., Choudhur.Pk, and Chatterj.Ib (1973). SYNTHESIS OF L-ASCORBIC-ACID FROM D-GLUCURONO-1,4-LACTONE CONJUGATES BY DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS. *International Journal of Biochemistry* 4, 309-314.
34. Rahman, I., Kode, A., and Biswas, S.K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 1, 3159-3165.
35. Robaczewska, J., Kedziora-Kornatowska, K., Kozakiewicz, M., Zary-Sikorska, E., Pawluk, H., Pawliszak, W., and Kedziora, J. (2016). ROLE OF GLUTATHIONE METABOLISM AND GLUTATHIONE-RELATED ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEMS IN HYPERTENSION. *Journal of Physiology and Pharmacology* 67, 331-337.
36. Pinto, R.E., and Bartley, W. (1969). EFFECT OF AGE AND SEX ON GLUTATHIONE REDUCTASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITIES AND ON AEROBIC GLUTATHIONE OXIDATION IN RAT LIVER HOMOGENATES. *Biochemical Journal* 112, 109
37. Couto, N., Wood, J., and Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine* 95, 27-42.
38. Fares, M., Armand, M., Francois, C., and Maixent, J.M. (2012). omega 6/omega 3 POLYUNSATURATED FATTY ACID SUPPLEMENTATIONS IN RENAL CELL MODEL LEAD TO A PARTICULAR REGULATION THROUGH LIPIDOME FOR PRESERVED omega 6/omega 3 RATIOS. *Cellular and Molecular Biology* 58, 1715-1719.
39. Losurdo, P., Grillo, A., Panizon, E., Cappellari, G.G., Fabris, B., Bardelli, M., Biolo, G., Zanetti, M., and Carretta, R. (2014). Supplementation of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevents Increase in Arterial Stiffness After Experimental Menopause. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 19, 114-120.
40. Hagve, T.A., Woldseth, B., Brox, J., Narce, M., and Poisson, J.P. (1998). Membrane fluidity and fatty acid metabolism in kidney cells from rats fed purified eicosapentaenoic acid or purified docosahexaenoic acid. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 58, 187-194.
41. Hoehn, A., Koenig, J., and Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of Proteomics* 92, 132-159.
42. Mendez, L., Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L., Perez-Jimenez, J., Nogues, R., Romeu, M., and Medina, I. (2013). Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine omega 3 PUFAs. *Free Radical Biology and Medicine* 55, 8-20.

43. Kris-Etherton, P.M., Grieger, J.A., and Etherton, T.D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 81, 99-104.
44. Andrade, A.S., Salomon, T.B., Behling, C.S., Mahl, C.D., Hackenhaar, F.S., Putti, J., and Benfato, M.S. (2014). Alpha-lipoic acid restores tear production in an animal model of dry eye. *Experimental Eye Research* 120, 1-9.
45. Petronilho, F., Florentino, D., Danielski, L.G., Vieira, L.C., Martins, M.M., Vieira, A., Bonfante, S., Goldim, M.P., and Vuolo, F. (2016). Alpha-Lipoic Acid Attenuates Oxidative Damage in Organs After Sepsis. *Inflammation* 39, 357-365.

**Table 1. Hormonal level (mean  $\pm$  S.E.M)**

GROUP	Estrogen (pg/mL)
SHAM	26.52 $\pm$ 10.03 b) c) d) e)
OVX	8.32 $\pm$ 2.48 a)
LA	6.63 $\pm$ 2.89 a)
DHA	9.88 $\pm$ 6.77 a)
EPA	10.39 $\pm$ 3.11 a)

Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA, and multiple comparisons for variables that showed significant differences were performed using *post hoc* Tukey test. N = 10 animals per group.

a) Lower than Sham ( $p \leq 0.05$ ).

b) Higher than OVX ( $p \leq 0.05$ ).

c) Higher than LA ( $p \leq 0.05$ ).

d) Higher than DHA ( $p \leq 0.05$ ).

e) Higher than EPA ( $p \leq 0.05$ ).



**Table 2. Enzymatic antioxidants activities (mean  $\pm$  S.E.M)**

<b>GROUP</b>	<b>Consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (U/mg prot.)</b>	<b>GPx (U/mg prot.)</b>	<b>SOD (U/mg prot.)</b>
SHAM	1469.73 $\pm$ 134.03	3539.27 $\pm$ 259.36	162.58 $\pm$ 13.56
OVX	1820.74 $\pm$ 209.99	3794.47 $\pm$ 293.53	149.71 $\pm$ 18.24
LA	1495.63 $\pm$ 172.89	4897.16 $\pm$ 1093.76	143.28 $\pm$ 10.20
DHA	1198.60 $\pm$ 77.98	3207.26 $\pm$ 294.98	141.57 $\pm$ 6.95
EPA	1453.66 $\pm$ 138.25	5434.67 $\pm$ 1176.36	160.39 $\pm$ 25.09

Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA. N = 10 animals per group. No statistical significant difference found between groups. P  $\leq$  0.05.

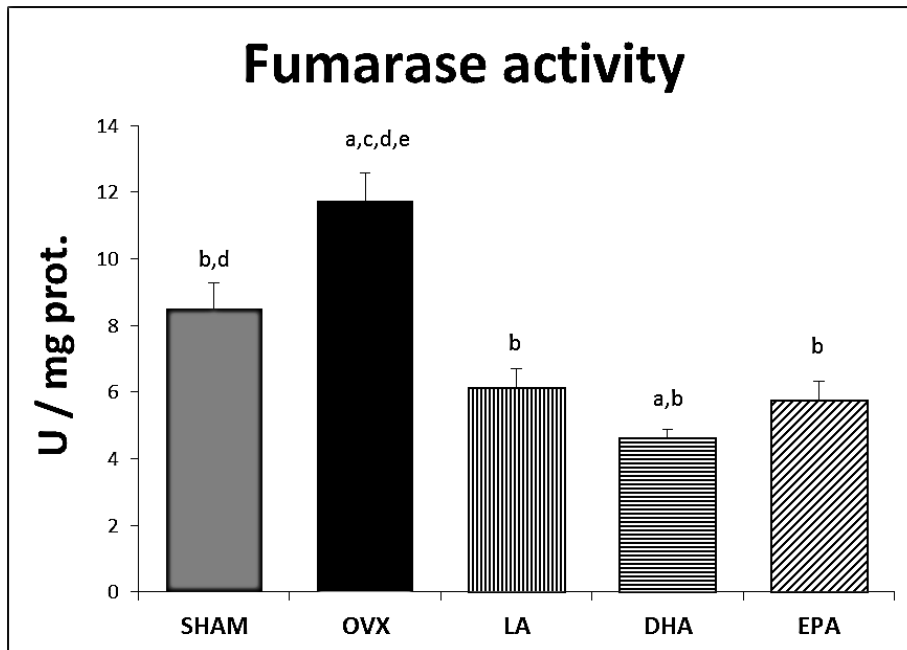
**Table 3. Vitamin E levels (mean  $\pm$  S.E.M)**

<b>GROUP</b>	<b>Vitamin E (nmol/mL)</b>
SHAM	336.89 $\pm$ 33.72
OVX	254.26 $\pm$ 23.01
LA	491.58 $\pm$ 84.38
DHA	346.51 $\pm$ 60.03
EPA	374.07 $\pm$ 68.52

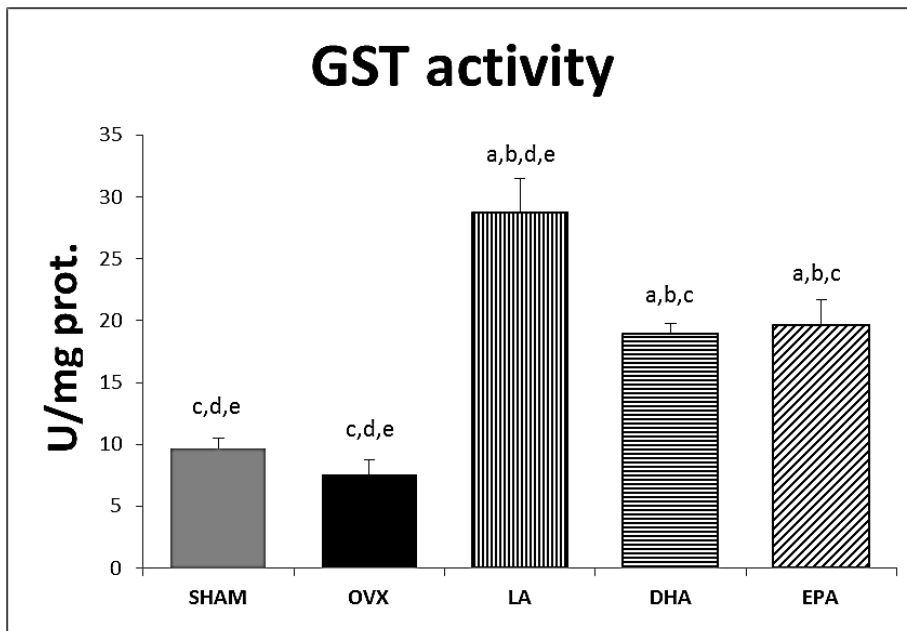
Statistical analysis of different variables was performed with one-way ANOVA. N = 10 animals per group. No statistical significant difference found between groups.  $P \leq 0.05$ .

**Figure 1. Enzymatic antioxidants**

A)



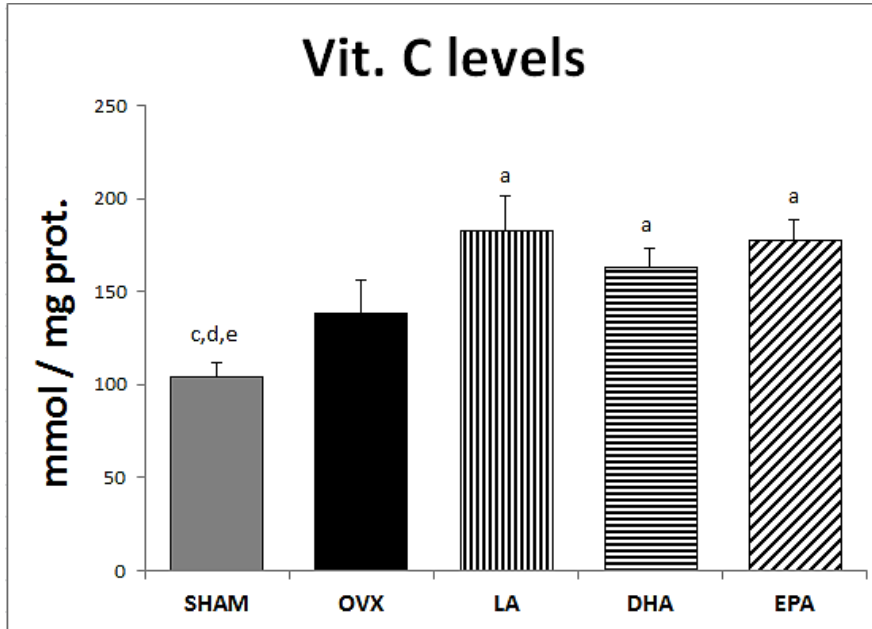
B)



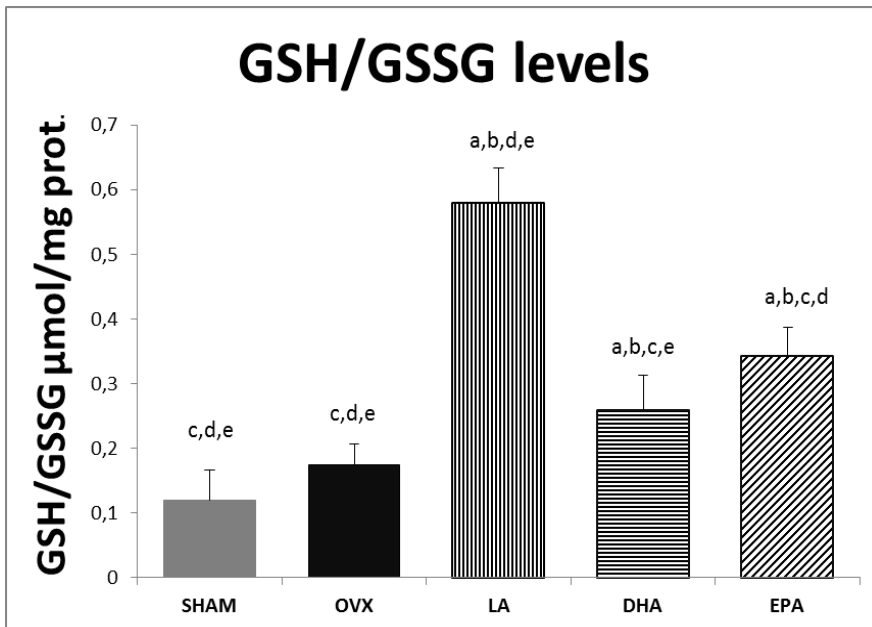
**Figure 1.** Enzymatic antioxidants activities in kidney tissue. (A) Fumarase activity. (B) Glutathione S-transferase activity. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; b- significant difference from the OVX group; c- significant difference from the LA group; d- significant difference from the DHA group; e- significant difference from the EPA group; One-way ANOVA with *post hoc* Tukey; n= 10 animals per group;  $p \leq 0.05$ .

**Figure 2.** Non-enzymatic antioxidants

A)



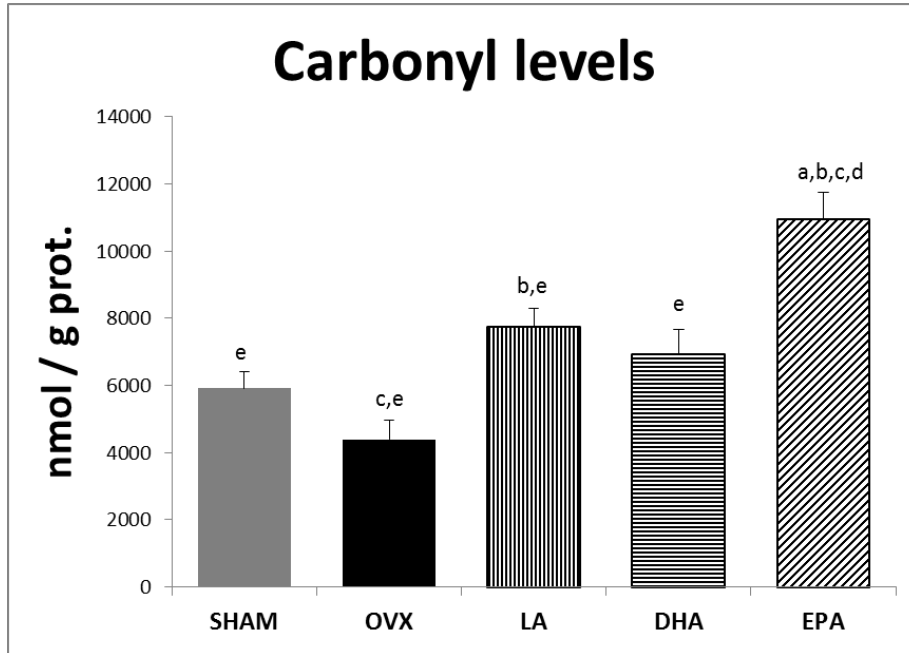
B)



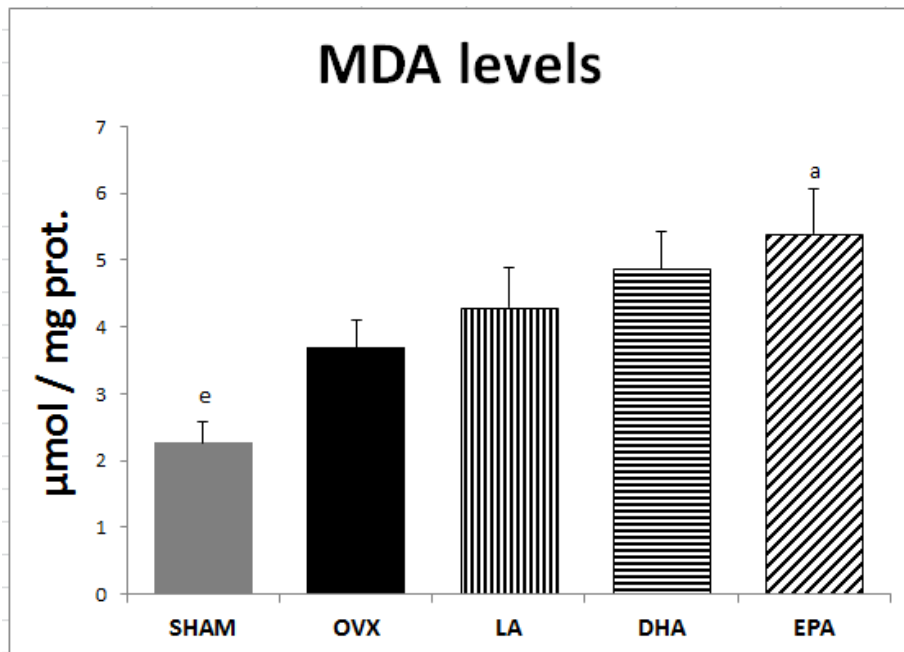
**Figure 2.** Antioxidants molecules. (A) Vitamin C levels. (B) Ratio of GSH/GSSG levels. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; b- significant difference from the OVX group; c- significant difference from the LA group; d- significant difference from the DHA group; e- significant difference from the EPA group; One-way ANOVA with *post hoc* Tukey; n= 10 animals per group;  $p \leq 0.05$ .

**Figure 3.** Oxidative damage

A)



B)



**Figure 3.** Oxidative damage in kidney tissue. (A) Protein carbonylation levels. (B) Malondialdehyde (MDA) levels. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. a- significant difference from the SHAM group; b- significant difference from the OVX group; c- significant difference from the LA group; d- significant difference from the DHA group; e- significant difference from the EPA group; One-way ANOVA with *post hoc* Tukey; n= 10 animals per group;  $p \leq 0.05$ .

#### 4. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR

A menopausa é um processo gradual que ocorre ao longo de um período que pode durar até alguns anos em mulheres que estão entre os 45-55 anos de idade. Ela marca o início de uma diminuição da fertilidade através da diminuição do número de folículos produzidos. Esta alteração do potencial reprodutivo é o resultado direto de um declínio na produção de hormônios pelos ovários, o que provoca manifestações físicas que afetam negativamente a qualidade de vida das mulheres na menopausa (Sievert, 2016).

A idade média das mulheres na menopausa é de 51 anos. Quando ocorre em mulheres com menos de 40 anos é chamada de menopausa prematura. A diminuição ou a falta dos hormônios sexuais femininos podem afetar vários locais do organismo e determinam sinais e sintomas conhecidos pelo nome de síndrome climatérica ou menopausal (Taylor *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2016; Mercantepe *et al.*, 2016).

##### **Os principais sintomas da menopausa são:**

- **Ondas de calor**, que causam uma vermelhidão súbita sobre a face e o tronco, acompanhados por uma sensação intensa de calor no corpo e por transpiração. Podem aparecer a qualquer hora e muitas vezes são tão desagradáveis que chegam a interferir nas atividades do dia a dia.
- **Alterações urogenitais** causadas pela falta de estrogênio que levam a atrofia do epitélio vaginal, tornando o tecido frágil a ponto de sangrar. Na vagina, a atrofia causa o estreitamento e encurtamento, perda de elasticidade e diminuição das secreções, ocasionando secura vaginal e desconforto durante a relação sexual (dispareunia). Modificações na flora vaginal facilitam o aparecimento de uma flora inespecífica que predispõe a vaginites. Outros efeitos indesejáveis ocorrem no sistema urinário (rins, uretra e bexiga), causando dificuldade de esvaziamento da mesma, perda involuntária de urina, ocasionando a chamada síndrome uretral, caracterizada por episódios recorrentes de aumento da frequência e ardência urinária, além da sensação de micção iminente.

- **Alterações do humor**, sintomas emocionais, tais como ansiedade, depressão, fadiga, irritabilidade, perda de memória e insônia devido às alterações hormonais que afetam a química cerebral.
- **Modificação da sexualidade** com diminuição do desejo sexual (libido), que pode estar alterado por vários motivos, entre eles, a menor lubrificação vaginal.
- **Aumento do risco de doenças cardiovasculares** pela diminuição dos níveis de estrogênio. O estrogênio protege o coração e os vasos sanguíneos evitando a formação de trombos que obstruem os vasos e mantendo os níveis do bom colesterol.
- **Osteoporose**, que significa a diminuição da quantidade de massa óssea, tornando os ossos frágeis e mais propensos às fraturas, principalmente no nível da coluna vertebral, fêmur, quadril e punho. Embora algumas mulheres possam não apresentar nenhum sintoma, alguma manifestação silenciosa da deficiência hormonal pode estar ocorrendo, como a perda de massa óssea. É nos cinco primeiros anos após a menopausa que ocorre uma perda óssea mais rápida (Moiety *et al.*, 2015; Sood *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo é parte integrante do processo de envelhecimento e resulta principalmente da elevada produção de radicais livres, como as EROs, que dominam os mecanismos antioxidantes do organismo. Normalmente, os antioxidantes neutralizam as EROs e, assim, ajudam a evitar a exposição excessiva ao estresse oxidativo. No entanto, na menopausa, os níveis de antioxidantes diminuem, deixando o corpo humano suscetível a uma variedade de patologias relacionadas à idade. Este declínio combinado com uma perda gradual de estrogênio no sistema reprodutivo feminino está altamente associado às várias sequelas da menopausa mencionadas anteriormente como as doenças cardíacas, distúrbios vasomotores e a própria osteoporose (Davies, 2000; Miquel *et al.*, 2006).

A acentuada redução do estrogênio tem demonstrado aumentar os níveis de estresse oxidativo no corpo, dependendo da concentração e estrutura química desse hormônio. Especificamente, em concentrações baixas, o estrogênio tende a ter efeitos pró-oxidante,

especialmente quando sua estrutura química contém um catecol. Esses efeitos incluem rupturas no material genético, formação de adutos de DNA e oxidação de bases. Além disso, as concentrações séricas de citocinas inflamatórias e biomarcadores pró-oxidantes como GSH, 4-hidroxinenal e MDA foram mais elevadas em mulheres pós-menopáusicas do que em mulheres pré-menopáusicas. As altas taxas de citocinas e de marcadores pró-oxidantes sugerem que existe um alto grau de estresse oxidativo durante a menopausa (Miquel *et al.*, 2006; Garratt *et al.*, 2011; Heiss e Schoech, 2012).

Por haver essa conhecida associação entre a menopausa e o estresse oxidativo, o presente estudo utilizou um modelo animal onde a estropausa foi induzida em ratas Wistar através da ovariectomia bilateral, a fim de mimetizar a menopausa em seres humanos e seus possíveis efeitos associados ao estresse oxidativo. A indução cirúrgica da estropausa foi confirmada pela queda dos níveis de estrogênio. É conhecido que a suplementação com antioxidantes possui efeitos favoráveis no quadro do estresse oxidativo e da menopausa. As ratas utilizadas neste estudo foram suplementadas com antioxidantes bastante conhecidos, como os ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3 (EPA e DHA) e também com o LA. Devido ao fato da existência de poucos estudos sobre os efeitos conjuntos da menopausa, do estresse oxidativo e dos antioxidantes nos rins, esse trabalho teve como foco o estudo da associação e do papel desses parâmetros nesses órgãos.

São os rins os responsáveis pelo equilíbrio da química interna do nosso organismo. Nossa sobrevivência depende do funcionamento normal destes órgãos vitais (Nussenzveig *et al.*, 2000; Danziger, 2012). Dentre as funções essenciais desempenhadas pelos rins podemos citar:

- Eliminação de toxinas do sangue por um sistema de filtração;
- Regulação da formação do sangue e dos ossos;
- Regulação da pressão sanguínea;
- Controle do delicado balanço químico e de líquidos do corpo.

Quando analisamos o dano oxidativo, no nosso estudo, a carbonilação de proteínas não diferiu significativamente entre o grupo ovariectomizado e o grupo SHAM, não se pode, portanto, afirmar que a ovariectomia estaria aumentando esse biomarcador. Os grupos suplementados com LA e EPA demonstraram níveis maiores desse marcador de



dano, o que demonstra que a suplementação, neste caso, está tendo uma ação pró-oxidante, ao contrário do que se esperava. Esse aumento de danos em proteínas pode ter ocorrido devido à dose utilizada dos antioxidantes, que é a recomendada para humanos e pode ser elevada quando analisamos ratos.

Na avaliação da peroxidação lipídica através do MDA, os resultados obtidos demonstram que não há associação entre a ovariectomia e um aumento nesse marcador, pois mais uma vez, assim como na carbonilação de proteínas, o grupo ovariectomizado não diferiu significativamente do grupo SHAM. Ainda na avaliação do MDA, o grupo EPA demonstrou ter um nível elevado desse marcador, quando comparado com o grupo SHAM. A partir desses resultados, podemos inferir que a suplementação está sendo pró-oxidante para os rins e que a absorção dos ômega 3 é diferenciada, uma vez que o grupo suplementado com DHA não apresentou diferença em ambos os marcadores de dano. Uma possível causa para esse efeito é a dosagem utilizada, que pode ter sido elevada para os ratos.

Nas defesas antioxidantes enzimáticas mensuradas, a atividade da GST não diferiu entre o grupo OVX e o grupo SHAM, portanto não há influência da estropausa induzida na atividade dessa enzima, entretanto todos os grupos suplementados apresentaram maior atividade da GST com relação aos dois grupos anteriormente mencionados, assim pode-se inferir que a suplementação com antioxidantes de alguma forma está induzindo uma maior atividade da enzima. A atividade da fumarase foi mais elevada no grupo ovariectomizado com relação tanto ao controle não operado, como em relação aos grupos suplementados; dessa forma pode-se inferir que a estropausa pode estar aumentando a atividade da mitocôndria nos animais desse grupo, já que a fumarase faz parte do ciclo de Krebs, ou também associar a estropausa induzida a algum nível de dano ao DNA, uma vez que a fumarase também age no reparo desses danos (Mescam *et al.*, 2011; Yogev *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2015).

Os seres humanos não são capazes de sintetizar vitamina C, porém ratos possuem a capacidade de sintetizar e armazenar vitamina C no fígado. Em pH fisiológico (7,4) a maior parte da vitamina C encontra-se na forma de ascorbato. Em mamíferos o ascorbato atua como cofator para algumas enzimas, e também como antioxidante de forma direta. A doação de um elétron pelo íon ascorbato resulta na formação do ânion radical ascorbila, que é pouco reativo. Além disso, interage com a vitamina E, que atua como antioxidante

lipofílico (Gupta *et al.*, 1973; England e Seifter, 1986). Nossos resultados demonstram que não há associação entre a estropausa induzida por ovariectomia e os níveis de vitamina C, porém quando analisamos a suplementação com EPA, DHA e LA, podemos observar uma elevação nos níveis desse antioxidante, sugerindo que essa suplementação pode estar influenciando uma maior síntese dessa vitamina.

A glutatona pode ser encontrada na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A razão entre elas GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado de oxidorredução (referente à toxicidade) dos sistemas biológicos, devido a sua alta importância (Tsuchida, 2001; Rahman *et al.*, 2007; Couto *et al.*, 2016). Nesse estudo, não foi observada diferença significativa na razão entre GSH/GSSG nos grupos OVX e SHAM, portanto a ovariectomia não estaria influenciando a GSH. Porém, quando analisamos os grupos que foram suplementados, podemos perceber que EPA, DHA e LA tiveram níveis elevados dessa razão quando comparados aos grupos SHAM e OVX, com um nível significativamente mais alto no grupo suplementado com LA. Assim pode-se inferir que os antioxidantes estariam agindo de forma a influenciarem uma maior taxa desse que é considerado o mais importante antioxidante não enzimático do organismo.

A partir dos resultados obtidos no nosso estudo é possível observar que há um perfil bastante variado nas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas nos rins das ratas. Também não se observou uma influência significativa da estropausa em um possível dano oxidativo, nem nas defesas mensuradas. Podemos atribuir estes resultados ao tempo transcorrido após a ovariectomia onde se iniciou o estudo, podendo este tempo não ter sido suficiente para causar efeitos significativos relacionados com a estropausa nos rins. A análise de outros órgãos dos mesmos animais demonstrou diferença entre os animais do grupo SHAM e OVX.

Conforme demonstra a literatura, a menopausa e o estresse oxidativo estão relacionados com problemas renais como a perda de cálcio e a queda da filtração glomerular e até mesmo com o aumento da peroxidação lipídica e a redução da função dos rins (Cheung *et al.*, 2015; Mercantepe *et al.*, 2016). O que podemos sugerir é que o modelo desenvolvido em ratos utilizado pelo nosso grupo nesse estudo não se aplica para comparação em humanos.

## **5. CONCLUSÃO**

Nossos resultados, de um modo geral, refutam a ideia de que a menopausa está necessariamente associada ao estresse oxidativo nos rins. Tendo em vista o perfil de dano oxidativo e defesas antioxidantes obtidas nesse trabalho, podemos afirmar que a menopausa não exerce influência significativa no modelo experimental que foi empregado. A participação dos antioxidantes utilizados para suplementação se mostrou controversa, não podendo gerar afirmações sobre benefícios específicos na atenuação dos efeitos da menopausa quando associada ao estresse oxidativo nos rins.

## **6. PERSPECTIVAS**

A conclusão deste trabalho contribui para a complementação do entendimento do impacto tanto da menopausa, como dos antioxidantes EPA, DHA e LA sobre o perfil oxidativo nos rins. Abre uma gama de possibilidade de outros estudos acerca do assunto, possibilitando que no futuro haja um estudo maior que associe esses parâmetros entre os diferentes órgãos. Dessa forma se poderão comparar os efeitos da estropausa e dos antioxidantes nos diferentes órgãos e estabelecer um perfil do organismo como um todo. Para um melhor entendimento da fisiologia do rim durante a estropausa, será realizada a medida de metais nesse tecido através da técnica de pixe. Também como perspectiva para o trabalho está a realização de análise de dano em DNA, a fim de complementar os dados de danos encontrados em proteínas e lipídios. O teste com doses menores dos antioxidantes também seria um aspecto interessante a ser considerado, para uma melhor visualização dos efeitos dose dependente.

## 7. REFERÊNCIAS

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

AL-SAFI, Z. A.; SANTORO, N. Menopausal hormone therapy and menopausal symptoms. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 4, p. 905-915, Apr 2014. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000333805000012 >.

BARD, J. 10 - The Metanephros. In: (Ed.). **The Kidney**. San Diego: Academic Press, 2003. p.139-148. ISBN 978-0-12-722441-1.

BEGUEL, J. P. et al. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 63-71, Jan 2013. ISSN 1532-0456. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312470600008 >.

BEHLING, C. S. et al. Treatment of oxidative stress in brain of ovariectomized rats with omega-3 and lipoic acid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 12, p. 2547-2555, Dec 2015. ISSN 1613-4125. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000367730600018 >.

BILSKA, A.; WLODEK, L. Lipoic acid - the drug of the future? **Pharmacological Reports**, v. 57, n. 5, p. 570-577, Sep-Oct 2005. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233976800002 >.

BUEMI, M. et al. Kidney aging: From phenotype to genetics. **Rejuvenation Research**, v. 8, n. 2, p. 101-109, Sum 2005. ISSN 1549-1684. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230074200006 >.

CAKIR, T. et al. The effect of alpha lipoic acid on rat kidneys in methotrexate induced oxidative injury. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 11, p. 2132-2139, Jun 2015. ISSN 1128-3602. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000357615400030 >.

CHEUNG, K. L. et al. Menopausal symptoms in women with chronic kidney disease. **Menopause-the Journal of the North American Menopause Society**, v. 22, n. 9, p. 1006-1011, Sep 2015. ISSN 1072-3714. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000369603500013 >.

CHO, E. A. et al. 14 - Formation and Development of Nephrons A2 - Vize, Peter D. In: (Ed.). **The Kidney**. San Diego: Academic Press, 2003. p.195-210. ISBN 978-0-12-722441-1.

COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 95, p. 27-42, Jun 2016. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000376169800003 >.

COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. **Biochemical Journal**, v. 425, p. 313-325, Jan 2010. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273772300003 >.

CRAWFORD, S. L. Links between reproductive factors and general health. **Menopause-the Journal of the North American Menopause Society**, v. 24, n. 1, p. 5-6, Jan 2017. ISSN 1072-3714. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000391845600003 >.

DANZIGER, J. **Renal Physiology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2012.

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **Iubmb Life**, v. 50, n. 4-5, p. 279-289, Oct-Nov 2000. ISSN 1521-6543. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000168002200007 >.

DEMIR, U.; DEMIR, T.; ILHAN, N. The protective effect of alpha-lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. **Ophthalmologica**, v. 219, n. 1, p. 49-53, 2005. ISSN 0030-3755. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226115000009 >.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. THE BIOCHEMICAL FUNCTIONS OF ASCORBIC-ACID. **Annual Review of Nutrition**, v. 6, p. 365-406, 1986 1986. ISSN 0199-9885. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986D346300017 >.

FARES, M. et al. omega 6/omega 3 POLYUNSATURATED FATTY ACID SUPPLEMENTATIONS IN RENAL CELL MODEL LEAD TO A PARTICULAR REGULATION THROUGH LIPIDOME FOR PRESERVED omega 6/omega 3 RATIOS. **Cellular and Molecular Biology**, v. 58, p. 1715-1719, 2012. ISSN 0145-5680. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327864300013 >.

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

GEBAUER, S. K. et al. n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1526S-1535S, Jun 2006. ISSN 0002-9165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000238477300011 >.

GORACA, A. et al. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 4, p. 849-858, Jul-Aug 2011. ISSN 1734-1140. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297530600001 >.

GOURTSOYIANNIS, N. et al. THE THICKNESS OF THE RENAL PARENCHYMA DECREASES WITH AGE - A CT STUDY OF 360 PATIENTS. **American Journal of Roentgenology**, v. 155, n. 3, p. 541-544, Sep 1990. ISSN 0361-803X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990DU95000017 >.

GUPTA, S. D.; CHOUDHUR.PK; CHATTERJ.IB. SYNTHESIS OF L-ASCORBIC-ACID FROM D-GLUCURONO-1,4-LACTONE CONJUGATES BY DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS. **International Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 21, p. 309-314, 1973 1973. ISSN 0020-711X.

HAGVE, T. A. et al. Membrane fluidity and fatty acid metabolism in kidney cells from rats fed purified eicosapentaenoic acid or purified docosahexaenoic acid. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 58, n. 3, p. 187-194, May 1998. ISSN 0036-5513. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000074347700003 >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fifth edition. Oxford University Press, 2015. 896 ISBN 9780198717485.

HEISS, R. S.; SCHOECH, S. J. Oxidative Cost of Reproduction Is Sex Specific and Correlated with Reproductive Effort in a Cooperatively Breeding Bird, the Florida Scrub Jay. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 85, n. 5, p. 499-503, Sep-Oct 2012. ISSN 1522-2152. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000308067900009 >.

HICKEY, M. et al. Depressive symptoms across the menopause transition: findings from a large population-based cohort study. **Menopause-the Journal of the North American Menopause Society**, v. 23, n. 12, p. 1287-1293, Dec 2016. ISSN 1072-3714. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000389254000006 >.

HILL, D. A.; CRIDER, M.; HILL, S. R. Hormone Therapy and Other Treatments for Symptoms of Menopause. **American Family Physician**, v. 94, n. 11, p. 884-889, Dec 2016. ISSN 0002-838X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000389292100004 >.

IGLESIAS-DE LA CRUZ, C. et al. Age-related progressive renal fibrosis in rats and its prevention with ACE inhibitors and taurine. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 278, n. 1, p. F122-F129, Jan 2000. ISSN 1931-857X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000084820100013 >.

JIANG, Y. H. et al. Local generation of fumarate promotes DNA repair through inhibition of histone H3 demethylation. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 1158+, Sep 2015. ISSN 1465-7392. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361113700009 >.

KEELE, B. B.; MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. SUPEROXIDE DISMUTASE FROM ESCHERICHIA-COLI-B - A NEW MANGANESE-CONTAINING ENZYME. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 22, p. 6176+, 1970. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1970H941200038 >.

KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas**, v. 87, p. 5-17, May 2016. ISSN 0378-5122. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000374606600003 >.

KOEBELE, S. V. et al. Cognitive changes across the menopause transition: A longitudinal evaluation of the impact of age and ovarian status on spatial memory. **Hormones and Behavior**, v. 87, p. 96-114, Jan 2017. ISSN 0018-506X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000392905500012 >.

KOEK, W. N. H. et al. Osteoclastogenic capacity of peripheral blood mononuclear cells is not different between women with and without osteoporosis. **Bone**, v. 95, p. 108-114, Feb 2017. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000392165100015 >.

LIN, A. Y. Estradiol Level and Menopause. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 1, p. 120+, Jan 2017. ISSN 0732-183X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000391381300021 >.

LINDEMAN, R. D.; TOBIN, J.; SHOCK, N. W. LONGITUDINAL-STUDIES ON THE RATE OF DECLINE IN RENAL-FUNCTION WITH AGE. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 33, n. 4, p. 278-285, 1985. ISSN 0002-8614. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985AFY3000011 >.



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

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

MCFARLANE, S. I.; NICASIO, J.; MUNIYAPPA, R. 58 - Osteoporosis and Cardiovascular Disease in the Elderly A2 - Conn, P. Michael. In: (Ed.). **Handbook of Models for Human Aging**. Burlington: Academic Press, 2006. p.703-712. ISBN 978-0-12-369391-4.

MENDEZ, L. et al. Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine omega 3 PUFAs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 55, p. 8-20, Feb 2013. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315009600002 >.

MERCANTEPE, T. et al. Protective effects of estrogen and bortezomib in kidney tissue of post-menopausal rats: an ultrastructural study. **Renal Failure**, v. 38, n. 7, p. 1129-1135, Aug 2016. ISSN 0886-022X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000382175000016 >.

MESCAM, M.; VINNAKOTA, K. C.; BEARD, D. A. Identification of the Catalytic Mechanism and Estimation of Kinetic Parameters for Fumarase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 24, p. 21100-21109, Jun 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000291464700009 >.

MIQUEL, J. et al. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 42, n. 3, p. 289-306, May-Jun 2006. ISSN 0167-4943. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236899800006 >.

MOIETY, F. M. S. et al. Comparative study on induction and effects of surgical menopause in a female rat model: a prospective case control study. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 6, p. 9403-9411, 2015. ISSN 1940-5901. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000359295600122 >.

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

MULROY, S. et al. 24 - Cystic Renal Diseases A2 - Vize, Peter D. In: (Ed.). **The Kidney**. San Diego: Academic Press, 2003. p.433-450. ISBN 978-0-12-722441-1.

MUNOZ-CASTANEDA, J. R. et al. Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. **Gynecological Endocrinology**, v. 22, n. 2, p. 74-79, Feb 2006. ISSN 0951-3590. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237487200004 >.

NEGRI, A. L. F2 Isoprostanos y Daño Oxidativo Renal. **Revista de Nefrología, Diálisis y Transplante**, p. 3-7, 1999.

NUSSENZVEIG, I.; CARVALHO FILHO, E. T.; PAPALÉO NETTO, M. Envelhecimento renal. In: (Ed.). **Geriatría: fundamentos, clínica e terapêutica**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.p.221-225.

PASCHALIS, E. P. et al. Vitamin D and calcium supplementation for three years in postmenopausal osteoporosis significantly alters bone mineral and organic matrix quality. **Bone**, v. 95, p. 41-46, Feb 2017. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000392165100007 >.

PETRONILHO, F. et al. Alpha-Lipoic Acid Attenuates Oxidative Damage in Organs After Sepsis. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 357-365, Feb 2016. ISSN 0360-3997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000370083500040 >.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nat. Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 01//print 2007. ISSN 1754-2189. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.378> >.

RECKELHOFF, J. F. et al. Chronic aminoguanidine attenuates renal dysfunction and injury in aging rats. **American Journal of Hypertension**, v. 12, n. 5, p. 492-498, May 1999. ISSN 0895-7061. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080173600008 >.

RECKELHOFF, J. F.. 83 - Models of Hypertension in Aging A2 - Conn, P. Michael. In: (Ed.). **Handbook of Models for Human Aging**. Burlington: Academic Press, 2006b. p.999-1009. ISBN 978-0-12-369391-4.

RICHARD, D. et al. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 6, p. 451-455, Jun 2008. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258436800007 >.

RIZZO, A. et al. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 344-352, Apr 2012. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301534200029 >.

ROSENBERG, K. OMEGA-3 FATTY ACID INTAKE LOWERS RISK OF DIABETIC RETINOPATHY. **American Journal of Nursing**, v. 117, n. 1, p. 60-61, Jan 2017. ISSN 0002-936X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000391963000023 >.

ROUSSEAU, M. E. 73 - Managing Menopausal Symptoms A2 - Conn, P. Michael. In: (Ed.). **Handbook of Models for Human Aging**. Burlington: Academic Press, 2006. p.873-879. ISBN 978-0-12-369391-4.

SHADYAB, A. H. et al. Ages at menarche and menopause and reproductive lifespan as predictors of exceptional longevity in women: the Women's Health Initiative. **Menopause-the Journal of the North American Menopause Society**, v. 24, n. 1, p. 35-44, Jan 2017. ISSN 1072-3714. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000391845600007 >.

SIEVERT, L. L. DCIS: Surgical Treatment Cross Cultural Menopause Symptoms. **Menopause-the Journal of the North American Menopause Society**, v. 23, n. 12, p. 1364-1364, Dec 2016. ISSN 1072-3714. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000389254000020 >.

SOOD, R. et al. A negative view of menopause: does the type of symptom matter? **Climacteric**, v. 19, n. 6, p. 581-587, Dec 2016. ISSN 1369-7137. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000389101900013 >.

SPEAKMAN, J. R.; SELMAN, C. The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. **Bioessays**, v. 33, n. 4, p. 255-259, Apr 2011. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288331100005 >.

TAYLOR, H. S. et al. Relationship Between Knowledge of Hormone Therapy Clinical Trial Results for Management of Menopausal Symptoms and Enthusiasm for Hormone Therapy Prescribing. **Menopause-the Journal of the North American Menopause Society**, v. 21, n. 12, p. 1329-1329, Dec 2014. ISSN 1072-3714. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000345846600048 >.

THOMAS, S. E. et al. Tubulointerstitial disease in aging: Evidence for underlying peritubular capillary damage, a potential role for renal ischemia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 2, p. 231-242, Feb 1998. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000071726600009 >.

TRACY, R. E. et al. Influence of arteriolar hyalinization on arterial intimal fibroplasia in the renal cortex of subjects in the United States, Peru, and Bolivia, applicable also to other populations. **American Journal of Hypertension**, v. 15, n. 12, p. 1064-1073, Dec 2002. ISSN 0895-7061. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179508700007 >.

TSUCHIDA, S. Regulation of glutathione transferase expression and function in stress response. **Seikagaku**, v. 73, n. 2, p. 89-92, Feb 2001. ISSN 0037-1017. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167284000003 >.

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

VELHO, I.; VEBER, J.; LONGHI, R. Effect of polyunsaturated fatty acid omega-3 (omega-3) engaged in physical activity: a systematic review. **Rbne-Revista Brasileira De Nutricao Esportiva**, v. 11, n. 61, p. 3-9, Jan-Feb 2017. ISSN 1981-9927. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000391422600002 >.

VINA, J.; HEMS, R.; KREBS, H. A. MAINTENANCE OF GLUTATHIONE CONTENT IN ISOLATED HEPATOCYTES. **Biochemical Journal**, v. 170, n. 3, p. 627-630, 1978. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1978ER89800023 >.

VIZE, P. D. 1 - Introduction: Embryonic Kidneys and Other Nephrogenic Models. In: (Ed.). **The Kidney**. San Diego: Academic Press, 2003. p.1-6. ISBN 978-0-12-722441-1.

VIZE, P. D.; WOOLF, A. S.; BARD, J. B. L. **The Kidney**. San Diego: Academic Press, 2003.

YOGEV, O.; NAAMATI, A.; PINES, O. Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. **Fibs Journal**, v. 278, n. 22, p. 4230-4242, Nov 2011. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297155600008 >.



ZHENG, X. H. et al. Olive oil exhibits osteoprotection in ovariectomized rats without estrogenic effects. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1881-1888, May 2016. ISSN 1792-0981. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000372710200054 >.

ZHOU, X. J. et al. The aging kidney. **Kidney International**, v. 74, n. 6, p. 710-720, Sep 2008. ISSN 0085-2538. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258874600007 >.

ZHU, X. Y. et al. Cortical microvascular remodeling in the stenotic kidney - Role of increased oxidative stress. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, n. 10, p. 1854-1859, Oct 2004. ISSN 1079-5642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224326200020 >.

## 8. ANEXOS

### I – Parecer do comitê de ética UFRGS

	<b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> 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:**

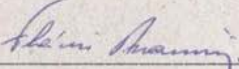
MARA DA SILVEIRA BENFATO - coordenador desde 01/03/2011

**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

## II – Certificado das análises dos suplementos



### Laboratório de Nutrição Laudo de Análises

**Cliente :** Nuvital Nutrientes S/A  
**Solicitante :** DEPARTAMENTO TECNICO  
**Cidade :** Colombo  
**Estado :** PR  
**Fone / Fax :** (41) 2169-3150  
**Produção :**  
**Coleta :** 22/07/2011  
**Lote :** 0022071101 AO 30

**Amostra :** 9911070366  
**Item :** Nuvilab CR-1 - 100110002/2  
**Fornecedor :** Nuvital Nutrientes S/A.  
**Controle :**  
**Produtor :**  
**Recepção :** 22/07/2011  
**Liberação :** 28/07/2011

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

#### Comentários

Cliente  
Laboratório  
Depto. Técnico

**O RESULTADO TEM SEU VALOR RESTRITO À AMOSTRA ANALISADA**

Suzane Maria Spiel - CRQ 09403009 - 9ª Região

Estrada da Ribeira, 3.001 Km 03  
83408 - 000 Colombo - PR fone/fax (0xx41) 2169-3100  
www.nuvital.com.br

09/09/2011



DATA: 16/09/2009

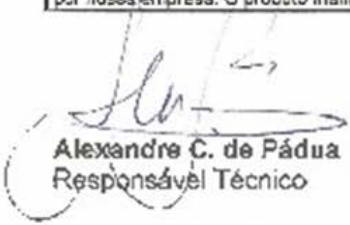
**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Produto:	ÓLEO DE PEIXE OMEGA-3
Lote nº:	PO9037701
Data de Fab.:	JUL/2009
Data de Val.:	JUL/2012

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
<b>1. Aspecto Físico</b>		
1.1. Descrição	• Líquido Oleoso	DE ACORDO
1.2. Odor	• Característico	DE ACORDO
<b>2. Parâmetros</b>		
2.1. Teor de Peróxidos	• $\leq 5,0$ meq O <sub>2</sub> /Kg	3,2 meq O <sub>2</sub> /Kg
2.2. Ácidos Graxos Livres	• $< 0,5\%$	0,07%
2.3. Vitamina E	• $> 2,0$ U.I./g	3,2 U.I./g
<b>3. Teor de Ácidos Graxos tipo Omega-3</b>		
3.1. Ácido Docosahexaenóico (DHA)	• Mínimo 12%	12,6%
3.2. Ácido Eicosapentaenóico (EPA)	• Mínimo 18%	19,7%

**LAUDO: APROVADO**

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



Alexandre C. de Pádua  
Responsável Técnico

Dr. Alexandre C. de Pádua  
Farmacêutico - Bioquímico  
CRF-SP 2716

RUA GUSTAVO DA SILVEIRA, 1337 - VILA SANTA CATARINA - SÃO PAULO - SP - CEP 04378-000 - FONE: (0xx11) 2188-3737 - FAX (0xx11) 2188-3700  
e-mail: naturalis@naturalis.com.br - http://www.naturalis.com.br



## CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:	ACIDO ALFA LIPOICO			Pág 1
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	CHINA/CHINA	DATA DE ANÁLISE:	05/07/2011	
LOTE PHARMA NOSTRA:	11062051C	LOTE FABRICANTE:	110106	
DATA DE FABRICAÇÃO:	Janeiro/2011	DATA DE VALIDADE:	Janeiro/2013	
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:	TEMPERATURA ABAIXO DE 30°C			
OBS 1:	FM: C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>			
OBS 2:	PM: 206,32			
OBS 3:	CAS: 1077-28-7			
DATA DE EMISSÃO:	14/09/2011	NF:	3-156.330	ORDEM FRACIONAMENTO:
				2872-11

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Identificação	HPLC	Positivo	USP - 33
Perda por Dessecação*	≤ 0,2% (3 horas / 40°C à vácuo)	0,15%	USP - 33
Ponto de Fusão*	60,0°C - 62,0°C	61,6°C	USP - 33
Rotação Específica*	-1,0° a +1,0°	+0,10°	USP - 33
Metais Pesados*	≤ 0,001%	< 0,001%	USP - 33
Resíduo por Ignição*	≤ 0,10%	0,03%	USP - 33
Teor ( Base Anidra )	99,0% - 101,0%	99,66%	USP - 33
TESTES ADICIONAIS			
Descrição*	Pó cristalino levemente amarelo com odor característico	Pó cristalino levemente amarelo com odor característico	Fabricante
Densidade Aparente*	Informativo (Sem compactação)	0,26 g/mL	Met.Geral FB IV

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

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

NFC  
P

CONCLUSÃO: ( X ) Aprovado ( ) Reprovado

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

*Uep*  
Responsável Técnico  
Amin Gabriel Gebrim - CRF-GO N° 1829

### III - Curriculum vitae

#### **JORDANA SALETE PUTTI**

##### **DADOS PESSOAIS:**

**Data de Nascimento:** 18/03/1991

**Sexo:** Feminino

**Naturalidade:** Nova Prata - RS

**Estado Civil:** Solteiro

**Endereço:** Rua Dervelino de Nardi, 115 – Nova Prata/RS

**CEP:** 95.320-000

**Telefone:** (51) 99113-6831

**Filiação:** Irineo João Putti e Loiva Barbosa Putti

**E-mail:** jojo.jsp@gmail.com

##### **Formação:**

**Superior Completo** - Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - RS.

##### **Estágios:**

**2011 a 2015** - Iniciação Científica - Laboratório de Estresse Oxidativo/Departamento de Biofísica - UFRGS - Av. Bento Gonçalves, 9500; Porto Alegre – RS.

**Julho a dezembro de 2015** – Estágio no Laboratório de malacologia – Fundação Zoobotânica do RS - Rua Dr. Salvador França, 1427; Porto Alegre - RS

##### **Prêmios e distinções:**

**2013-** Destaque do XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UFRGS.

**2012-** Destaque do XXIV SALAO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UFRGS.

##### **Produções:**

Behling, Camile S.; Andrade, Alexey S.; **Putti, Jordana S.**; Mahl, Camila D.; Hackenhaar, Fernanda S.; Da Silva, Ana Carolina A.; E Silva, Mélyny Natuane C.; Salomon, Tiago B.; Dos Santos, Carla E. I.; Dias, Johnny F.; Benfato, Mara S. . Treatment Of Oxidative Stress In Brain Of Ovariectomized Rats With Omega-3 And Lipoic Acid. *Molecular Nutrition & Food Research (Print)*, V. 59, P. N/A-N/A, 2015.

Mahl, Camila Donato ; Behling, Camile Saul ; Hackenhaar, Fernanda S. ; De Carvalho E Silva, Mélyny Natuane ; **Putti, Jordana** ; Salomon, Tiago B. ; Alves, Sydney Hartz ; Fuentefria, Alexandre ; Benfato, Mara S. . Induction Of Ros Generation By Fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*,v. 82, p. 203-208, 2015.

Andrade, Alexey S.; Salomon, Tiago B.; Behling, Camile S.; Mahl, Camila D. ; Hackenhaar, Fernanda S.; **Putti, Jordana** ; Benfato, Mara S. . Alpha-Lipoic Acid Restores Tear Production In An Animal Model Of Dry Eye. *Experimental Eye Research*, V. 120, P. 1-9, 2014.

Silva, Ana Carolina A.; Salomon, Tiago B.; Behling, Camile Saul; **Putti, Jordana** ; Hackenhaar, Fernanda S.; Alabarse, Paulo V. G. ; Schüller, Artur K. ; Benfato, Mara S. . Oxidative Stress In The Kidney Of Reproductive Female Rats During Aging. *Biogerontology (Dordrecht)*, V. 14, P. 411-422, 2013.

### **Resumos publicados em anais de congresso**

1. HACKENHAAR, FERNANDA S. ; MEDEIROS, T. ; BEHLING, CAMILE S. ; **PUTTI, J.** ; MAHL, CAMILA D. ; SILVA, ANA CAROLINA A. ; BENFATO, MARA S. . Oxidative stress in post-cardiac resuscitation syndrome after mild hypothermia. In: VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013, Buenos Aires. VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013.

2. MAHL, CAMILA D. ; BEHLING, CAMILE S. ; HACKENHAAR, FERNANDA S. ; **PUTTI, J.** ; SALOMON, TIAGO B. ; BENFATO, MARA S. . Resposta antioxidante e dano oxidativo induzidos por fluconazol em *Candida glabrata*.. In: Reunião anual do PPGBCM., 2013, Porto Alegre. XV Reunião anual do PPGBCM, 2013.

3. BEHLING, CAMILE S. ; ANDRADE, ALEXEY S. ; **PUTTI, J.** ; HACKENHAAR, FERNANDA S. ; MAHL, CAMILA D. ; SALOMON, TIAGO B. ; BENFATO, MARA S. . Avaliação do estresse oxidativo em cérebro de ratas ovariectomizadas e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipoico.. In: Reunião anual do PPGBCM., 2013, Porto Alegre. XV Reunião anual do PPGBCM, 2013.

4. MAHL, CAMILA D. ; BEHLING, CAMILE S. ; HACKENHAAR, FERNANDA S. ; **PUTTI, J.** ; BENFATO, MARA S. . Oxidative stress and fluconazole resistance in *Candida glabrata*. In: VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013, Buenos Aires. VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013.

5. BEHLING, CAMILE S. ; **PUTTI, J.** ; ANDRADE, ALEXEY S. ; SILVA, ANA CAROLINA A. ; SALOMON, TIAGO B. ; HACKENHAAR, FERNANDA S. ; BENFATO, MARA S. . Dano em proteínas em cérebro de ratas ovariectomizadas e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipóico.. In: Reunião anual do PPGBCM., 2012, Porto Alegre. XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012.

6. SILVA, A. C. A. ; SALOMON, TIAGO B. ; HACKENHAAR, FERNANDA S. ; ALABARSE, PAULO V. G. ; **PUTTI, J.** ; BEHLING, CAMILE S. ; BENFATO, MARA S. . Estresse Oxidativo em Rins de Ratas Reprodutoras ao Longo do Envelhecimento. In: Reunião anual do PPGBCM., 2012, Porto Alegre. XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012.

7. ANDRADE, ALEXEY S. ; **PUTTI, J.** ; SALOMON, TIAGO B. ; BENFATO, MARA S. . Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental de olho seco e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipóico.. In: Reunião anual do PPGBCM., 2011, Porto Alegre. XIII Reunião Anual do PPGBCM, 2011. p. 04-04.

#### **Eventos:**

**XVII Encontro do PPGBCM** - The effects of supplementation with Lipoic acid and Omega-3 in the kidney of ovariectomized rats, 2016.

**XVI Encontro do PPGBCM** - The effects of supplementation with Lipoic acid and Omega-3 in the kidney of ovariectomized rats, 2015.

**XXVI Salão de Iniciação Científica UFRGS** - Efeitos do uso de antioxidantes do tipo ômega 3 e ácido lipoico na córnea e conjuntiva de ratas Wistar submetidas a um modelo experimental de olho seco, 2014.

**Jornada Acadêmica da Biologia**, 2013.

**XXV Salão de Iniciação Científica UFRGS**- Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental de olho seco e a resposta ao uso de antioxidantes ômega-3 e ácido lipóico, 2013.

**10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology.** Oxidative stress in the kidney of female rats with or without reproductive activity during aging, 2012.

**XXIV Salão de Iniciação Científica UFRGS** - Estresse oxidativo no rim de ratas com e sem atividade reprodutora durante o envelhecimento, 2012.

**III Congresso Brasileiro de Genética Forense**, 2011.

**Jornada Acadêmica da Biologia**, 2011.

**XXIII Salão de Iniciação Científica UFRGS** - Dano Oxidativo e Defesas Enzimáticas em Rins de Ratos Reprodutores e Não Reprodutores de Diferentes Idades, 2011.

**10º Congresso Florestal Estadual e 1º Seminário Mercosul da Cadeia Madeira**, 2008.