

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

**Estresse oxidativo em testículos de ratos com e sem atividade  
reprodutiva durante o envelhecimento**

---

Dissertação de Mestrado

Tiago Boeira Salomon

Porto Alegre, 2013.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Estresse oxidativo em testículo de ratos com e sem atividade reprodutiva  
durante o envelhecimento

Tiago Boeira Salomon

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

Orientadora: Profa. Dra. Mara da Silveira Benfato

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

“Tudo seria fácil se não fossem as dificuldades.”

Apparício Fernando de Brinkerhoff Torelly

Barão de Itararé

## Índice

Lista de abreviaturas.....	6
Lista de conceitos.....	7
Resumo.....	8
Abstract.....	9
1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	17
Objetivo geral:.....	17
Objetivos específicos:.....	17
3. Material e métodos e resultados (Artigo científico).....	18
3.1. Manuscrito.....	18
4. Discussão e conclusões.....	38
5. Perspectivas.....	44
6. Referências.....	45
ANEXO I.....	50
ANEXO II.....	51

### **Lista de abreviaturas**

ACO	aconitase
AMP	adenosina-monofosfato
ATP	adenosina-trifosfato
CAT	catalase
CDNB	cloro-dinitro-benzeno
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CTE	cadeia transportadora de elétrons
Cu/Zn-SOD	cobre/zinco-superóxido dismutase
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
EAA	aminoácidos excitatórios
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FSH	Hormônio folículo estimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	glutaciona-peroxidase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
HNE	trans-4-hidroxi-2-nonenal
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
L-NAME	L-NG-Nitroarginina metil ester
MDA	malondialdeído
Mn-SOD	manganês-superóxido dismutase
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NE	noraepinefrina
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
PLA	ácido polilático
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PRx	peroxiredoxina
RNA	ácido ribonucléico
SOD	superóxido dismutase
t-BOOH	terc-butil-hidroperóxido
Vit C	vitamina C

## **Lista de conceitos utilizados nesta dissertação**

Histórias de vida	calendário de eventos importantes na vida de um organismo, como moldados pela seleção natural e / ou sexual.
Estresse oxidativo	Desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade do organismo de detoxificá-las.
Comportamento de lordose	postura sexual observada em fêmeas de mamíferos, caracterizada principalmente pelo arqueamento ventral da coluna vertebral.
Envelhecimento	acúmulo de mudanças em um organismo ao longo do tempo.
Senescência	processo endógeno e hereditário de alterações cumulativas à estrutura molecular e celular, interrompendo o metabolismo com o passar do tempo, o que resulta em deterioração e morte.
Longevidade	tempo esperado de vida de um organismo.
Reprodução	processo de geração de um novo organismo através da combinação do material genético de dois organismos.
Seleção natural	processo gradual, não aleatório pela qual as características biológicas se tornam mais ou menos comuns na população em função da reprodução diferencial de seus portadores.
Seleção sexual	o processo de escolha de características morfológicas e comportamentais que levam ao cruzamento bem sucedido.

## Resumo

A teoria dos radicais livres do envelhecimento postula que um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e as defesas antioxidantes seria um fator determinante na senescência. A reprodução sexuada é uma atividade custosa para o organismo, ou seja, requer um aporte energético maior e esse aumento de níveis energéticos tende a gerar mais espécies reativas. Para abordar esta questão e obter mais informações sobre o processo de envelhecimento nas gônadas de ratos machos, utilizamos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com comida e água *ad libitum* e ciclo de claro/escuro de 12 horas, em quatro idades – 3, 6, 12 e 24 meses, criados em condições com (pareados com fêmeas) e sem (agrupados com outros machos) atividade reprodutiva. Avaliamos as defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, GPx, GST e o consumo de peróxido de hidrogênio), não enzimáticas (vitamina C e glutathiona), avaliamos também o dano oxidativo (índices de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas), os níveis de nitritos e nitratos e a atividade da enzima aconitase. Nos animais reprodutores, os resultados mostraram um aumento progressivo na atividade de enzimas antioxidantes até 12 meses de idade seguida de uma queda na idade de 24 meses. Os animais não reprodutores demonstraram atividade antioxidante sem alterações até 12 meses de idade, com uma queda aos 24 meses de idade. Além disso, maior atividade da enzima aconitase e níveis de testosterona mais elevados foram encontrados nos animais reprodutores em relação aos não reprodutores. O grupo reprodutor também apresentou uma correlação positiva da atividade da enzima aconitase com níveis de carbonilação de proteína e uma correlação negativa com níveis de nitritos e nitratos, sugerindo que houve um aumento de danos a proteínas, provavelmente devido à maior atividade mitocondrial, sugerido pelo aumento da aconitase. Os resultados indicam que há diferenças metabólicas nos testículos de animais reprodutores ao longo do envelhecimento, embora os animais não reprodutores não tenham sofrido alterações enzimáticas ao longo do mesmo. Na idade de 24 meses, os não reprodutores apresentaram o mesmo padrão que os reprodutores, indicando que esta redução da atividade enzimática está relacionada ao envelhecimento, e não a reprodução.

Palavras-chave: **reprodução, ciclo de vida, envelhecimento, estresse oxidativo**



## Abstract

The free radical theory of aging postulates that an imbalance between the reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) and antioxidant defenses would be a determining factor in senescence. Sexual reproduction is a costly activity for the organism, and requires a higher energy intake and this increase of energy levels tends to generate more reactive species. To address this question and obtain more information about the overall aging process we used the gonads of male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), with food and water *ad libitum* and cycle light / dark 12 hours in four different ages - 3, 6, 12 and 24 months, reared in conditions with (paired with females) and without (grouped with other males) reproductive activity. We evaluated the antioxidant enzymatic defenses (SOD, GPx, GST and consumption of hydrogen peroxide), non-enzymatic defenses (vitamin C and glutathione) and, also evaluate the oxidative damage (index of lipid peroxidation, protein carbonylation), nitrites and nitrates levels, and the aconitase enzyme activity. The experienced animals' results showed a progressive increase in the activity of antioxidant enzymes until 12 months of age followed by an abrupt fall at the age of 24 months. The naïve animals showed no alteration in the antioxidant activity until 12 months of age, with a decline at 24 months of age. Furthermore, a higher aconitase activity and higher testosterone levels were found in experienced animals than in naïve. The naïve group also showed a positive correlation between aconitase activity and levels of protein carbonyls and a negative correlation with levels of nitrites and nitrates, suggesting that there was an increased damage to proteins, probably due to increased mitochondrial activity. The results indicate that there is metabolic differences between the testis of experienced animals during the aging period, although the naïve animals have not undergone enzymatic changes during the aging process, possibly because the gonads do not possess a very important role in the overall functioning of the body and, at the age of 24 months, showed the same pattern as experienced, indicating that this difference in activity is related to aging, not reproduction.

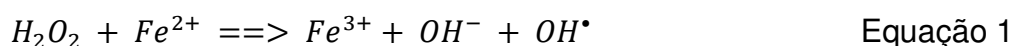
Keywords: ageing, oxidative stress, life cycle, reproduction, male rats

## 1. Introdução

O gás oxigênio (O<sub>2</sub>) surgiu na Terra cerca de 3,8 x 10<sup>9</sup> anos atrás devido ao processo fotossintético de cianobactérias, no qual a água era hidrolisada. Mas foi apenas cerca de 2,5 x 10<sup>9</sup> anos que seus níveis subiram para quantidades significativas. O aumento das concentrações atmosféricas de O<sub>2</sub> levou a um grande evento seletivo, a primeira grande extinção em massa, devido a oxidação das biomoléculas dos organismos que não se adaptaram às novas condições (Halliwell e Gutteridge, 2007). Por outro lado, ele permitiu a conquista do bioma terrestre com a formação de ozônio (O<sub>3</sub>) na estratosfera, que filtra uma parte da radiação ultravioleta (UV-C) (Grenfell, Rauer *et al.*, 2010). Além disso, os organismos conseguiram gerar mais energia utilizando o O<sub>2</sub> como substrato do que geravam apenas com a fermentação, porém, neste processo geraram espécies reativas (Nelson e Cox, 2008).

Espécies reativas (ER) são elementos que reagem com as moléculas biologicamente relevantes e podem ser classificados em radicalares e não-radicalares. Espécies reativas radicalares possuem, pelo menos, um elétron desemparelhado em alguma de suas camadas.

O radical hidroxil é o radical mais reativo conhecido *in vivo*. Formado principalmente por meio da reação de Fenton, em que o peróxido de hidrogênio reage com um metal de transição (Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>+</sup>) formando dois hidróxidos, sendo um deles um radical e o outro apenas um ion (Eq.1). Ele reage imediatamente após ser formado.

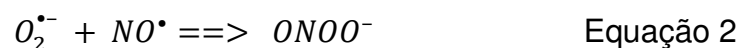


O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é simultaneamente um ânion e um radical, formado quando um elétron é adicionado à molécula de  $O_2$ . Ocorre principalmente na mitocôndria, mas pode ocorrer em outras organelas, como o retículo endoplasmático (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) é um radical estável em água, em condições fisiológicas sua meia-vida é de apenas alguns segundos. Produzido, em mamíferos, pela oxidação da L-arginina catalisada pela óxido nítrico sintase (Halliwell e Gutteridge, 2007) .

O peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$  é uma espécie reativa não radicalar formada principalmente na dismutação do superóxido. É importante na resposta imune. Entretanto, ao reagir com metais de transição, forma o radical hidroxil (reação de Fenton) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) é uma espécie reativa não radicalar, formado através da reação do radical superóxido com o óxido nítrico (Eq. 2).

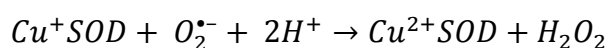
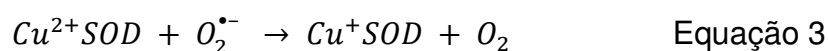


Apesar das espécies reativas agirem como mensageiros celulares causam danos a componentes celulares. Estes danos podem ocorrer, por exemplo, na membrana, alterando a permeabilidade da mesma; no DNA, podendo acarretar erros na transcrição ou na tradução. Em resposta a isso, os organismos desenvolveram defesas, que são chamadas de antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007).

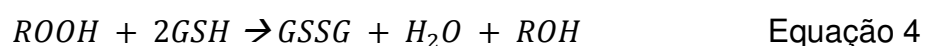
Antioxidantes são moléculas que são capazes de prevenir, inibir ou desfazer o dano oxidativo de outras moléculas. Podem ser classificadas como

enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as enzimáticas temos, como exemplo, a superóxido dismutase, a catalase, a glutaciona peroxidase, as peroxiredoxinas, entre outras.

A enzima superóxido dismutase (SOD) (Fukai e Ushio-Fukai, 2011), catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e água (Eq.3). Mamíferos possuem três tipos de SOD, duas possuem cobre (Cu) em seu sítio ativo, uma intracelular (constituída de duas subunidades) e uma extracelular (constituída de quatro subunidades), o terceiro tipo, possui manganês (Mn) em seu sítio ativo, e esta está localizada na mitocôndria.



Glutaciona peroxidase (GPx), possui um átomo de selênio (Se) em seu sítio ativo, atua na degradação de peróxidos no organismo (Eq. 4) (Halliwell e Gutteridge, 2007).



A GPx degrada peróxidos oxidando duas moléculas de glutaciona reduzida (GSH) em glutaciona oxidada (GSSG), esta glutaciona oxidada pode ser reduzida novamente pela enzima glutaciona redutase (Eq. 5) (Halliwell e Gutteridge, 2007).



Peroxiredoxinas (Prx) (Shuvaeva, Novoselov *et al.*, 2009) são enzimas que convertem peróxido de hidrogênio em água (Fig. 1) (papel desempenhado

também pela catalase (CAT) nos peroxissomos), peróxidos orgânicos em álcool e peroxinitrito em nitrito.

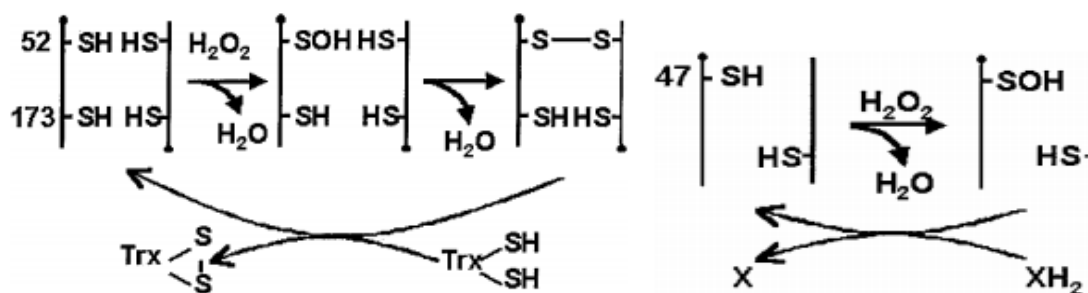


Figura 1: Mecanismo de reação das peroxiredoxinas. X denota um doador de hidrogênio não identificado. Imagem de Rhee, *et al.* 2001

Glutathione s-transferase (GST) é uma enzima dimérica envolvida na detoxificação de xenobióticos.

Como exemplos de defesas não enzimáticas temos a vitamina E, que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica; vitamina C, um doador de elétrons e que também pode impedir a etapa de iniciação da peroxidação lipídica; e glutathione, o mais abundante antioxidante intracelular, que é oxidada a dissulfeto de glutathione ao reagir com radicais, além de ser substrato para outras enzimas como a GPx, por exemplo (Halliwell e Gutteridge, 2007; Yoshihara, Fujiwara *et al.*, 2010).

### 1.1. Envelhecimento

Segundo a teoria de envelhecimento por radicais livres (Harman, 1956), o envelhecimento se dá através do aumento de espécies reativas, associado ao decréscimo das defesas antioxidantes, com o passar do tempo. Este processo levaria à senescência e, finalmente, a morte celular (Kirkwood, 2001; Rattan, 2006; Kirkwood, 2008a; 2010). De uma maneira ampla, o

envelhecimento pode ser definido como perda progressiva de função acompanhada por um decréscimo na fertilidade e um aumento da mortalidade com o avanço da idade.

Do ponto de vista evolutivo, o processo de envelhecimento é importante para a renovação das histórias de vida, ou seja, animais mais velhos acabam morrendo para que os mais novos possam sobreviver, visto que os recursos são limitados. Com a reprodução sexuada foi possível aumentar a variabilidade genética da prole, visto que esta é a união de dois genomas, seguido de segregação de alelos e recombinação entre loci. Normalmente envolve o cruzamento de dois indivíduos (Buchanan, Evans *et al.*, 2001; Kirkwood, 2001; Wiersma, Selman *et al.*, 2004; Alonso-Alvarez, Bertrand *et al.*, 2007).

## 1.2. Reprodução

A reprodução é uma atividade muito custosa para o organismo tanto para os machos quanto para as fêmeas, envolvendo diversos processos (Kirkwood, 2001). No caso dos machos pode-se citar a procura e disputa com outros machos por fêmeas, cuidado parental, e modificações tanto corporais (aumento da testosterona, desenvolvimento de estruturas secundárias) como comportamentais (corte). Todos estes processos demandam mais energia do organismo e, com o aumento do metabolismo energético provavelmente ocorre um aumento de espécies reativas (Garratt, Mcardle *et al.*, 2012).

## 1.3. Gônadas masculinas

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), as gônadas são órgãos com baixos níveis de defesas antioxidantes, quando comparados com fígado por exemplo, mas há poucos estudos relacionando estado redox à idade e

atividade reprodutiva. As gônadas masculinas (Fig. 2) contêm túbulos alongados muito finos, chamados de túbulos seminíferos, são revestidos com uma camada de células germinativas que se desenvolvem em espermatozóides.

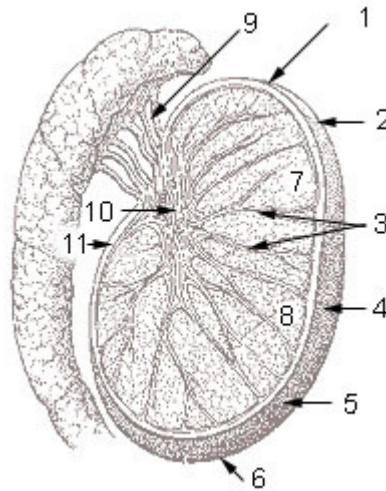


Figura 2: Corte transversal do testículo. 1 pólo superior do testículo - 2 túnica albugínea - 3 septos testiculares - 4 margem anterior (margem livre) - 5 superfície lateral - 6 pólo inferior do testículo - 7 lóbulos testiculares - 8 parênquima testicular - 9 ductulos eferentes - 10 mediastino testicular - 11 margem posterior

Eles também contêm as células de Sertoli e as células mióides. Células de Leydig estão localizadas entre os túbulos, no espaço intersticial, que também contém macrófagos intersticiais e células epiteliais. As gônadas são controladas pelo hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), ambos secretados pela adenohipófise. O LH estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig as quais, em conjunto com a FSH, estimulam as células de Sertoli que, por fim, estimulam a maturação das espermatogônias, para produzir os espermatozóides.

Há poucos trabalhos que abordam a relação entre estresse oxidativo e custos de reprodução em machos (Arenas-Rios, Leon-Galvan *et al.*, 2007; Vazquez-Memije, Capin *et al.*, 2008), e menos ainda relacionando estresse oxidativo com o ciclo de reprodução e envelhecimento (Rebrin, Kamzalov *et al.*, 2003). A fim de elucidar os custos de atividade reprodutiva e relacionar estes custos com o processo de envelhecimento, em termos de estresse oxidativo, comparamos as atividades das enzimas antioxidantes, os níveis de antioxidantes não enzimáticos, e o dano oxidativo às proteínas e lipídios nas gônadas de ratos machos, com e sem atividade reprodutiva.



## 2. Objetivos

### **Objetivo geral:**

Este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil oxidativo das gônadas de ratos machos, ao longo do envelhecimento, comparando animais reprodutores e não reprodutores.

### **Objetivos específicos:**

- Avaliação das atividades de antioxidantes enzimáticos: SOD, GPx, GST, consumo de peróxido de hidrogênio.
- Avaliação das atividades de antioxidantes não enzimáticos: Vitamina C e glutathione (total, reduzida e oxidada).
  - Mensuração da peroxidação lipídica
  - Mensuração da carbonilação de proteínas.
  - Mensuração dos níveis de nitritos e nitratos.
  - Avaliação da atividade da enzima aconitase.
  - Avaliação dos níveis de testosterona.

### 3. Material e métodos e resultados (Artigo científico)

#### 3.1. Manuscrito

#### Manuscrito submetido:

Tiago Boeira Salomon, Fernanda Schäfer Hackenhaar, Ana Carolina Almeida, Arthur K. Schüller, Paulo V. Gil Alabarse, Guilherme Ehrenbrink and Mara Silveira Benfato, Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity, *Experimental Gerontology*

## Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity

Tiago Boeira Salomon<sup>1,2</sup>, Fernanda Schäfer Hackenhaar<sup>1,2</sup>, Ana Carolina Almeida<sup>1,2</sup>, Arthur Krumberg Schüller<sup>1</sup>, Paulo V. Gil Alabarse<sup>1</sup>, Guilherme Ehrenbrink<sup>1</sup> and Mara Silveira Benfato <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica-IB-UFRGS, Av. Bento Gonçalves, Porto Alegre, Rio Grande do Sul State,

Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular-UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil

Correspondence: Dr. Mara Silveira Benfato, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500 prédio 43431, Porto Alegre, RS, Brazil, 91501-970 Phone: 55 51 3316-7603; Fax: 55 51 3316-7003; E-mail: mara.benfato@ufrgs.br

### Highlights

- Aging and reproduction reduce oxidative stress in male rat gonads.
- Enzymes activities and damage levels decrease during aging in reproductive animals.
- Evaluation of oxidative stress in 4 different ages (3, 6, 12 and 24 months).

## **Abstract**

The free radical theory of aging postulates that an imbalance between reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) and antioxidant defenses is important in senescence. To address this issue and gain insight into the aging process, we have evaluated the antioxidant defenses and have assessed oxidative damage in testis tissues in aging male rats. In order to relate aging and reproduction, animals with and without reproductive activity were studied. In reproductive animals the results showed a progressive increase in antioxidant enzyme activity until 12 months of age followed by an abrupt fall at 24 months. In non-reproductive animals, antioxidant activity was stable through 12 months of age, but again, fell abruptly at 24 months of age. In addition, increased aconitase activity and increased testosterone levels were found among reproductively active animals. The data demonstrate the existence of metabolic differences in testis of reproductively experienced animals and reproductively naïve animals.

## 1. Introduction

The evolutionary concept of aging, according to Kirkwood (Kirkwood, 2001, 2011), is the idea that senescence results from life-history trade-offs. At a molecular level, aging can be the result of a series of injuries that affect metabolic performance. For example, injuries causing losses in mitochondrial efficiency may alter metabolism producing characteristics of senescence and finally resulting in death (Beckman and Ames, 1998; Camougrand and Rigoulet, 2001; Dowling and Simmons, 2009; Harman, 1956; Kirkwood, 2008; Rattan, 2006; Vina et al., 2003; Wallace, 2005). During normal oxidative metabolism, cells use oxygen as an electron acceptor in the process of mitochondrial respiration, which typically consumes about 90% of the oxygen utilized by cells. Mitochondrial respiration is considered to be the major source of cellular reactive oxygen (Freeman and Crapo, 1982; Kowaltowski et al., 2009; Shigenaga et al., 1994). The aconitase (ACO) enzyme has two isoforms, one in the mitochondria which has a role in the Krebs cycle catalyzing the conversion of citrate to cis-aconitase and finally to isocitrate, and determinations of its activity provide useful measures of mitochondrial metabolic status (Medvedeva et al., 2002) and other in the cytosol, involved in iron regulation (Tong and Rouault, 2007). Usually, from 1 to 3% of the oxygen consumed is converted to ROS as electrons are released from the electron transport chain and transferred directly to molecular oxygen. When ROS are produced beyond the capability of a cell to detoxify them, damage to protein, lipid, and DNA ensues.

Reproduction is necessary to the permanency of the species but is an expensive activity. The metabolic costs of reproduction may be directly involved in gamete production, or may be more related to behavioral and physical alterations that occur (Buchanan et al., 2001). There are several reports relating higher metabolic rate and oxidative stress (Scheffer et al., 2012; Sun et al., 2012). It is expected that with the increased production of energy there will be an increase in the generation of reactive species, thus increasing oxidative stress.

To oppose these reactive species, animals have developed antioxidant defense mechanisms. These are classified according to enzymatic activity, such as catalase (CAT) and peroxiredoxins (Prx), which act on  $H_2O_2$ , glutathione peroxidase (GPx), which reacts with peroxides in general, glutathione S-transferase (GST), which is involved in the detoxification of xenobiotics, and superoxide dismutase (SOD), which catalyzes dismutation of superoxides into  $H_2O_2$  and  $O_2$ . Among non-enzymatic antioxidant defenses available to cells, reduced glutathione is the most abundant; as well, vitamin C (Vit C) can also protect against oxidative stress (Adibhatla and Hatcher, 2010; Yoshihara et al., 2010). These defenses are distributed in different forms within tissues. According to Halliwell and Gutteridge (Halliwell and Gutteridge, 2007), the gonads are, in general, organs with low enzymatic activity and, presumably, low antioxidant defenses, even though there are a few enzymes with higher activity, such as phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) (Puglisi et al., 2005). The gonads contain very finely coiled tubes called seminiferous tubules. The tubules are lined with a layer of germ cells that develop into sperm cells. They also contain the Sertoli cells and myoid cells. Leydig cells are located between the tubules, in the interstitial space, which also contains interstitial macrophages and epithelial cells. The gonads are controlled by luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) secreted by the anterior pituitary gland. LH stimulates the production of testosterone by Leydig cells, which, together with FSH,

stimulates Sertoli cells, which in turn, stimulate the maturation of the spermatogonia in order to produce spermatozoa. Also, the production of testosterone generate ROS as a by-product (Hornsby, 1989) and promotes lipid peroxidation (Peltola et al., 1996)

There are only a few reports that address the relationship between oxidative stress and reproduction costs (Arenas-Rios et al., 2007; Vazquez-Memije et al., 2008), and fewer yet relating oxidative stress with the reproduction cycle and aging (Rebrin et al., 2003) in males. In order to create an oxidative profile to help elucidate the senescence process in animals with and without reproductive activity, we compared antioxidant enzyme activity, non-enzymatic antioxidant levels, and damage in proteins and lipids in male rat gonads.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and organs

The study made use of 80 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). One-month-old rats were separated into 2 groups (40 animals each): animals with reproductive (experienced) activity and animals without (naïve). Males were caged either with a female (experienced) or with another male rat (naïve), until the age of sacrifice. Reproduction was considered to have occurred when the females gave birth to litters. Pups were separated from the parent pair at 21 days of age, before the initiation of the pubertal stage, which corresponds to an age of 30-37 days for males and 33-42 days for females (Krinke, 2000). Litter size ranged from 5 to 11 pups, and each pair had more than 1 litter. To assess the effects of aging, both experienced and naïve groups were subdivided into 4 groups (10 animals each), each corresponding to a different age (3, 6, 12, 24-month-old).

Adult animals weighed between 250 and 500 g, and were weight-to-age proportional; they had good motor activity, and did not present hair loss or any symptoms of disease. Gonad and body weights did not alter significantly between the ages of 12 and 24 months, indicating they were well nourished and healthy, even at the older ages (Table 1). Sick animals were sacrificed and discarded from the sample (two 24-month old experienced males).

The animal house was kept on a 12 h light/dark cycle at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , with standard lab chow and drinking water ad libitum. All animals were anesthetized by i.p. injection with a mixture of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After saline infusion, the gonads were removed and immediately frozen in liquid nitrogen for further analysis. Other data from these same animals has been previously published (Alabarse et al., 2011a; Hackenhaar et al., 2009). These studies were conducted with the approval of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ethical Committee.

Organs were manually macerated with scalpels, sonicated (2 x 10s) in 30 mmol/L phosphate buffer (120 mmol/L KCl, 100  $\mu\text{mol/L}$  PMSF, phenylmethanesulfonylfluoride, pH 7.4), and centrifuged (10 min, 2,000 x g). The supernatant was transferred to a fresh tube and centrifuged for 10 min at 15,800 x g. The supernatant from the second centrifugation was aliquoted and frozen for later analysis.

### 2.2. Assays

#### 2.2.1. Testosterone levels

The levels of testosterone in serum were estimated by radioimmunoassay using Testosterone RIA DSL-4100<sup>®</sup> kits (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Oxford, UK). All assays were independently performed in triplicate.

### 2.2.2. Enzymatic antioxidants

Hydrogen peroxide consumption, which is a measure of the activities of catalase, glutathione peroxidase, and peroxiredoxins (Halliwell and Gutteridge, 2007; Rhee et al., 2003), was determined by the method of Aebi (1984). Briefly, in a cuvette containing 200  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer and 30  $\mu\text{L}$  of tissue extract, 250  $\mu\text{L}$  of 0.066 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  in phosphate buffer was added and decrease in absorbance was read at  $A_{240\text{ nm}}$  for 30 s in a spectrophotometer. A molar absorptivity of 43.6 mol/L/cm was used to determine the consumption, one unit of which is equal to mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  degraded per minute per mg protein in a spectrophotometer (Aebi, 1984).

The reaction mixture for the GPx assay consisted of 500  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer, 100  $\mu\text{L}$  of 0.01 mol/L reduced glutathione (GSH), 100  $\mu\text{L}$  of 1.5 mmol/L NADPH and 100  $\mu\text{L}$  of glutathione reductase (0.24 U). One hundred microliters of tissue extract was added to the reaction mixture and incubated at 37°C for 10 min. Fifty microliters of 12 mmol/L t-butyl hydroperoxide was added to 450  $\mu\text{L}$  of tissue reaction mixture and measured at  $A_{340\text{ nm}}$  for 180 s in a spectrophotometer. A molar absorptivity of  $6.22 \times 10^3$  mol/L/cm was used to determine enzyme activity. One unit of activity is equal to  $\mu\text{mol}$  NADPH oxidized per minute per mg protein. (Flohe and Gunzler, 1984).

Measurement of total superoxide dismutase (tSOD) activity was based on the inhibition of autooxidation of epinephrine ( $A_{480\text{ nm}}$ ) using a spectrophotometric method (Misra and Fridovic, 1972). Tissue extract (100  $\mu\text{L}$ ) was added to 880  $\mu\text{L}$  carbonate buffer of 0.05 mol/L, pH 10.2, 0.1 mmol/L EDTA. Twenty microliters of 30 mmol/L epinephrine in 0.05% acetic acid was added to the mixture and absorbance was followed for 4 min at  $A_{480\text{ nm}}$  in a spectrophotometer. The amount of enzyme that results in 50% inhibition of epinephrine auto-oxidation is defined as one unit.

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

### 2.2.3. Non enzymatic antioxidants

The assay to measure total, reduced, and oxidized glutathione (GSHt, GSH, and GSSG, respectively) was performed by measuring the formation of p-nitrophenol from 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) in the presence of the enzyme glutathione reductase and NADPH (Kondo and Awada, 2000). Color development was read at  $A_{412\text{ nm}}$ . To discriminate reduced glutathione from the oxidized form, N-ethylmaleimide (0.25 mM) was added to the samples (Kondo and Awada, 2000).

### 2.2.4. Oxidative Damage

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

hydrochloride. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone ( $21,000 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/g of protein.

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

#### 2.2.5. Aconitase activity

Aconitase (ACO) activity was measured at  $A_{340\text{nm}}$  over time at  $25^\circ\text{C}$  as citrate was converted to alfa-ketoglutarate by isocitrate dehydrogenase using  $\text{NADP}^+$  (Ramara et al., 2007). ACO was fully reactivated (ACORE) by incubation of the samples for 5 min with dithiothreitol (20mmol/L), ferrous ammonium sulfate (2mmol/L), and reduced glutathione (100mmol/L) (Ramara et al., 2007; Teixeira et al., 1998).

#### 2.2.6. HPLC assays

Levels of vitamin C, a non-enzymatic antioxidant, and malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation, were measured by HPLC employing a reverse-phase column (SUPELCOSIL™LC-18-DB HPLC column; 15 cm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), using a mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v); Samples were injected in a volume of 25  $\mu\text{L}$ . The absorbance of the column effluent was monitored at 254 nm (Karatepe, 2004). Under these conditions, the retention time of vitamin C was 3.0 min and MDA was 5.6 min.

#### 2.2.7. Data normalization

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

### 2.3. Statistical analyses

Kolmogorov-Smirnov was performed in order to evaluate normality. Parametric data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The results were analyzed using ANOVA followed by Tukey test. Non-parametric data were expressed as median (inter quartile range). The results were analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn test in order to determine statistical significance among the different groups. Spearman correlation was performed to evaluate relations between oxidative parameters. Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

As shown in Table 1, body and gonad weights, and length (without tail) of animals aged three, six, twelve, and twenty-four months did not differ among animals of the same group nor between groups. Testosterone levels in 3 and 6 month-old animals in the experienced group were 371.75 and 302.97 ng/mL, respectively, and in the naïve group were 40.72 and 103.91 ng/mL, respectively. Levels were higher at both ages (3 and 6 months) in experienced animals than in naïve.



## 2.4. Enzymatic antioxidants

In the experienced group there was an increase in the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> among 6 and 12 month-old animals compared to 3 and 24 month-old animals. Among the naïve group, the 24 month-old animals presented a significantly lower consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig 1A).

Among the experienced group, 12 month-old animals had higher GPx activity than 3 month-old, and 24 month-old animals showed the lowest levels. In the naïve group, the activity of 24 month-old animals was decreased 99% compared to 12 month-old animals from a median of 2912.4 to 6.62 U/mg protein. In between-group comparisons, the 3 month-old naïve animals had higher activity than 3 month-old experienced animals (Fig 1B).

In the experienced group tSOD activity increased progressively by age until 12 months; this was followed by a decrease of activity in 24 month-old animals. In the naïve group the 24 month-old animals showed the lowest activity. The activity in the experienced group was significantly lower than in the naïve group at 3 months (Fig 1D).

In the experienced group GST activity was increased among 6 and 12 month-old animals compared to 3 and 24 month-old animals. No difference was found among the naïve groups. In between-group comparisons, the 6 month-old naïve animals had higher activity than 6 month-old experienced animals (Fig 1C).

## 2.5. Non enzymatic antioxidants

In the experienced group, vitamin C levels were higher in 12 month-old animals (1.28 nmol/mg protein). In the naïve group, 3 month-old animals presented the highest level (1.8 nmol/mg protein). In between-group comparisons, naïve animals exhibited higher vitamin C levels at 3 and 6 months compared to experienced animals (Fig 3C).

The ratios of reduced glutathione to oxidized glutathione did not differ according to age, and was not different between experienced and naïve animals (Fig 3D).

## 2.6. Oxidative damage

In the experienced group, MDA levels in 6 month-old animals were lower than in 3 month-old animals, and between-group comparison showed that MDA levels in 6 month-old animals were lower in the experienced group than the naïve group. There were no differences within naïve groups (Fig 2A).

In the experienced group, nitrite and nitrate levels were higher in 3 and 12 month-old animals than in 6 and 24 month-old animals. In the naïve group, nitrite and nitrate levels were higher in 3 and 12 month-old animals than in 6 month-old animals. In between-group comparisons, experienced and naïve groups exhibited no differences (Fig 2C).

In the experienced group, there was an incremental increase in protein damage, indicated by increasing carbonyl levels, between 6 and 12 months of age. In the naïve group, the 24 month-old animals showed the lowest carbonyl levels. No differences were observed between experienced and naïve groups (Fig 2B).

## 2.7. Aconitase activity

No differences in aconitase activity were observed within groups. Differences were observed between experienced and naïve groups at the ages of 6, 12, and 24 months. In the experienced group, reactivated aconitase activity was higher in 12 month-old animals than in 3 month-old animals, and in between-group comparisons we found that reactivated aconitase activities were higher in the experienced group at 3 and 6 months of age (Fig 3A, B).

## 3. Discussion

The aim of this study was to delineate the oxidative profile in male rat gonads during aging and to compare reproductively experienced and reproductively naïve animals. There have been a few studies relating reproduction and oxidative stress in vertebrates. A study in birds (*Taeniopygia guttata*) correlated oxidative stress and brood size, and demonstrated that SOD activity decreased as brood size increased (Wiersma et al., 2004). Although most studies on reproduction have used only females, which show great metabolic changes in the processes of carrying progeny, other studies have shown that males also exhibit physical changes, such as increased size of testis (Arenas-Rios et al., 2007) or the production of sperm, which was found to be trivial in metabolic costs (Olsson et al., 1997). Also, a work with *Teleogryllus oceanicus* found differences in sperm viability as the animal ages (Dowling and Simmons, 2012); and behavioral changes, such as fights with other males, that tend to decrease when the animal reaches middle age (Chambers and Phoenix, 1983; Nicolosi et al., 2004).

Aging and degenerative diseases associated with it are attributed basically to the deleterious side attacks of free radicals on cell constituents thus altering membrane constituents and inactivating proteins. These alterations, when in excess, may lead to cell death.

Our data revealed, in the experienced group, a progressive increase in activity of all antioxidant enzymes until the animals reached 12 months of age; then activity fell abruptly among older (24 months) animals. In the naïve group, antioxidant enzyme activities remained stable from 3 to 12 months of age, but again, activity fell abruptly in 24 month-old animals, GPx showed a different result, being higher in 3 months and then decreasing in elder ages; these GPx results agree with other work in testis (Tramer et al., 2002), that found, in Wistar rats, higher activity of PHGPx in 3 months than in the other ages tested (0, 6 and 12 months). These results agree with predictions of the free radical theory of aging (Harman, 1956), and corroborate previous reports from our lab (Alabarse et al., 2011a; Alabarse et al., 2011b; Ehrenbrink et al., 2006; Hackenhaar et al., 2009) and other labs (Vazquez-Memije et al., 2008). A difference in testosterone levels was also observed; the naïve group showed lower levels of testosterone at 3 and 6 months of age, but that difference diminished in older animals (Table 1).

Experienced males showed higher aconitase activity than naïve animals (Fig 3 A, B), but it is not possible to infer whether this activity is in the cytosolic aconitase or the mitochondrial since there are no data about their ratio in the testicles. The experienced group also showed a positive correlation (0.505) with carbonylation levels (protein oxidative damage) and a negative correlation (-0.845) with nitric oxide levels (Supplementary Table 1). This

suggests that there was increased damage to proteins, presumably due to the higher mitochondrial activity. There was no difference between aconitase and reactivated aconitase, which indicates that very little damage by superoxide was done to aconitase (Fig 3B).

Nitric oxide synthesis in tissues can occur through a reduction of nitrate to nitrite and nitrite can be subsequently reduced to nitric oxide. Nitric oxide can induce DNA damage through direct strand breaks and base modification, it also inhibits proteins with thiol groups (Burney et al., 1999; Niles et al., 2006). It has an important role in reproduction stimulating steroidogenesis in Leydig cells by activating soluble guanylate cyclase–cGMP signaling, which appears to be through activation of cGMP-dependent protein kinase 1 (PRKG1) and phosphorylation of StAR protein (Andric et al., 2007, 2010). The lower concentration of nitric oxide (Fig 2C) suggests that nitric oxide is being consumed in processes such as spermatogenesis and steroidogenesis (Lee and Cheng, 2004; Rosselli et al., 1998).

Naïve animals showed no difference in antioxidant defense mechanisms to the age of 12 months, unlike experienced animals, which might be expected given that the testis are important for reproduction but have little role in the overall functioning of the body, this agrees with the fact that the ratio testis/body weight significantly reduces from the age of 3 (0.01) months to the age of 24 (0.007) months (data not shown), and with the findings of other groups: one found in naïve Norway brown rats a regression on testis size and an increase in the expression of oxidative stress related genes (Syntin et al., 2001) and other found a morphological alteration of hamster epididymis, and a decrease in sperm quality in elderly ages (24 months) (Calvo et al., 1999). These changes are probably due to: changes that are intrinsic to the germ cells that decrease the ability of the somatic cells of the seminiferous tubules, the Sertoli cells, to support germ cell survival and differentiation, or to as yet unknown extrinsic factors.

The aging results suggest an important relationship between the end of reproductive life and enzymatic activity in the testis. From the age of 12 months onward, there are modifications in the levels of sex hormones in male rats (Rikans et al., 1992). For example, by the age of 24 months, Leydig cells lose approximately 50% of their capacity to secrete testosterone leading to an overall reduction in testosterone levels in the animals (Chen et al., 2001; Chen et al., 2009), not due to loss of cells (Wang et al., 1993), but due to changes in the steroidogenic pathway that could reduce the ability of the aged cells to produce testosterone. When compared to young cells, older cells present reduced luteinizing hormone receptors numbers, cAMP production (Chen et al., 1994; Lin et al., 1983). There is evidence that cholesterol transport mechanisms also are compromised in aged Leydig cells (Culty et al., 2002).

Modifications in the mitochondrial efficiency decreased the ability of Leydig cells to produce testosterone (Hales et al., 2005). As a consequence of the modification in testosterone levels, alterations occur in body composition, including decreased physical and sexual energy levels and decreased cognitive functions among other changes (Rebrin et al., 2003; Zirkin and Chen, 2000). It is puzzling that with the increase in antioxidant activity the oxidative damage did not also increase. One hypothesis to explain this is the fact that in testis, testosterone seems to exhibit a protective effect (Akishita et al., 2010); thus, we observed a lower MDA levels (lipid peroxidation index) in 6 month-old experienced animals (Fig 2A) and a negative correlation (-0.895) with carbonylation levels (supplementary Table 1).

Even though testosterone may play a protective role in the testis, it is a pro-oxidant, and increases oxidative stress in other organs (Halliwell and Gutteridge, 2007), probably by

increasing metabolism, and thereby reduces male lifespan. This hypothesis is supported by the observation that castrated male rats live longer than intact male rats (Buchanan et al., 2001; Halliwell and Gutteridge, 2007; Wikelski et al., 1999). Another important point is that the decrease in activity of all enzymes among 24 month-old animals was greater in experienced animals than in naïve animals.

From these results it is possible to conclude that there are metabolic differences in testis between reproductively experienced animals and reproductively naïve animal but further investigation is needed in order to establish the exact causes of these differences.

## Acknowledgments

We thank Z. Almeida for technical assistance, Dr. I. Vaz for generously providing equipment and Dr. E. Milner for language review and editing services. This research was supported by grants from CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian agencies for research support)

## References

- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2010. Lipid Oxidation and Peroxidation in CNS Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 12, 125-169.
- Aebi, H., 1984. Catalase invitro. *Method Enzymol* 105, 121-126.
- Akishita, M., Hashimoto, M., Ohike, Y., Ogawa, S., Iijima, K., Eto, M., Ouchi, Y., 2010. Low testosterone level as a predictor of cardiovascular events in Japanese men with coronary risk factors. *Atherosclerosis* 210, 232-236.
- Alabarse, P.V.G., Hackenhaar, F.S., Medeiros, T.M., Mendes, M.F.A., Viacava, P.R., Schüller, Á.K., Salomon, T.B., Ehrenbrink, G., Benfato, M.S., 2011a. Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. *Exp. Gerontol.* 46, 241-248.
- Alabarse, P.V.G., Salomon, T.B., Medeiros, T.M., Hackenhaar, F.S., Schueller, A.K., Ehrenbrink, G., Benfato, M.S., 2011b. Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. *Experimental Gerontology* 46.
- Andric, S.A., Janjic, M.M., Stojkov, N.J., Kostic, T.S., 2007. Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 293, E1399-E1408.
- Andric, S.A., Janjic, M.M., Stojkov, N.J., Kostic, T.S., 2010. Testosterone-Induced Modulation of Nitric Oxide-cGMP Signaling Pathway and Androgenesis in the Rat Leydig Cells. *Biology of Reproduction* 83, 434-442.
- Arenas-Rios, E., Leon-Galvan, M.A., Mercado, P.E., Lopez-Wilchis, R., Cervantes, D., Rosado, A., 2007. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 148, 150-158.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Buchanan, K.L., Evans, M.R., Goldsmith, A.R., Bryant, D.M., Rowe, L.V., 2001. Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling?

Proc R Soc B Biol Sci 268, 1337-1344.

Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424, 37-49.

Calvo, A., Pastor, L.M., Martinez, E., Vazquez, J.M., Roca, J., 1999. Age-related changes in the hamster epididymis. *Anatomical Record* 256, 335-346.

Camougrand, N., Rigoulet, M., 2001. Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Resp Physiol* 128, 393-401.

Chambers, K.C., Phoenix, C.H., 1983. Sexual behavior in response to testosterone in old long-term-castrated rhesus males. *Neurobiology of Aging* 4, 223-227.

Chen, H.L., Cangello, D., Benson, S., Folmer, J., Zhu, H., Trush, M.A., Zirkin, B.R., 2001. Age-related increase in mitochondrial superoxide generation in the testosterone-producing cells of Brown Norway rat testes: relationship to reduced steroidogenic function? *Exp Gerontol* 36, 1361-1373.

Chen, H.L., Ge, R.S., Zirkin, B.R., 2009. Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol* 306, 9-16.

Chen, H.L., Hardy, M.P., Huhtaniemi, I., Zirkin, B.R., 1994. Age-related decreased Leydig-cell testosterone production in the Brown-Norway rat. *Journal of Andrology* 15, 551-557.

Culty, M., Luo, L., Yao, Z.X., Chen, H., Papadopoulos, V., Zirkin, B.R., 2002. Cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in aging Leydig cells (vol 23, pg 439, 2002). *Journal of Andrology* 23, 584-584.

Dowling, D.K., Simmons, L.W., 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 276, 1737-1745.

Dowling, D.K., Simmons, L.W., 2012. Ejaculate Economics: Testing the Effects of Male Sexual History on the Trade-Off between Sperm and Immune Function in Australian Crickets. *Plos One* 7, 6.

Ehrenbrink, G., Hakenhaar, F.S., Salomon, T.B., Petrucci, A.P., Sandri, M.R., Benfato, M.S., 2006. Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. *Exp Gerontol* 41, 368-371.

Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione-peroxidase. *Method Enzymol* 105, 114-121.

Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982. Free-radicals and tissue-injury. *Lab Investigation* 47, 412-426.

Grisham, M.B., Johnson, G.G., Lancaster, J.R., 1996. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids, *Methods Enzymol*.

Hackenhaar, F.S., Salomon, T.B., Alabarse, P.V.G., Ehrenbrink, G., Benfato, M.S., 2009. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochem Funct* 27, 378-382.

Hales, D.B., Allen, J.A., Shankara, T., Janus, P., Buck, S., Diemer, T., Hales, K.H., 2005. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Testicular Cell Dynamics and Endocrine Signaling* 1061, 120-134.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. Oxford University Press, New York.

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

Hornsby, P.J., 1989. Steroid and xenobiotic effects on the adrenal - cortex - mediation by oxidative and other mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 6, 103-115.

Karatepe, M., 2004. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America*.

Kirkwood, T.B.L., 2001. Sex and ageing. *Exp Gerontol* 36, 413-418.

Kirkwood, T.B.L., 2008. Understanding ageing from an evolutionary perspective. *Journal of Internal Medicine* 263, 117-127.

Kirkwood, T.B.L., 2011. Systems biology of ageing and longevity. *Philos T R Soc B* 366, 64-70.

Kondo, T., Awada, F., 2000. Glutathione (oxidized and reduced form): assay mixture and

measurement, in: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press, Oxford, pp. 57–60.

Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Rad Biol Med* 47, 333-343.

Krinke, G.J., 2000. *The laboratory rat*, 1st edition ed. Academic Press, New York.

Lee, N.P.Y., Cheng, C.Y., 2004. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. *Biology of Reproduction* 70, 267-276.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 186, 464-478.

Lin, T., Vinson, N.E., Muroso, E.P., Osterman, J., Nankin, H.R., 1983. The aging Leydig cell. VIII. Protein kinase activity. *Journal of Andrology* 4, 324-330.

Medvedeva, L.V., Popova, T.N., Artyukhov, V.G., Matasova, L.V., 2002. Catalytic properties of cytoplasmic and mitochondrial aconitate hydratase from rat cardiomyocytes. *Biology Bulletin* 29, **426-430**.

Misra, H.P., Fridovic, I., 1972. Role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247, 3170-&.

Nicolosi, A., Laumann, E.O., Glasser, D.B., Moreira, E.D., Paik, A., Gingell, C., *Global Study Sexual Attitudes, B.*, 2004. Sexual behavior and sexual dysfunctions after age 40: The global study of sexual attitudes and behaviors. *Urology* 64, 991-997.

Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 2006. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 14, 109-121.

Olsson, M., Madsen, T., Shine, R., 1997. Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. *Proc. R. Soc. B* 264, 455-459.

Peltola, V., Huhtaniemi, I., MetsäKetela, T., Ahotupa, M., 1996. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 137, 105-112.

Puglisi, R., Tramer, F., Carlomagno, G., Gandini, L., Panfili, E., Stefanini, M., Lenzi, A., Mangia, F., Boitani, C., 2005. PHGPx in spermatogenesis: how many functions? *Contraception* 72, 291-293.

Ramara, A., Duckles, S.P., Krause, D.N., Procaccio, V., 2007. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Research* 1176, 71-81.

Rattan, S.I.S., 2006. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Free Radic Res* 40, 1230-1238.

Rebrin, I., Kamzalov, S., Sohal, R.S., 2003. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Rad Biol Med* 35, 626-635.

Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R., Kang, S.W., 2003. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *Journal of the American Society of Nephrology* 14, S211-S215.

Rikans, L.E., Snowden, C.D., Moore, D.R., 1992. Effect of aging on enzymatic antioxidant defenses in rat-liver mitochondria. *Gerontology* 38, 133-138.

Rosselli, M., Keller, P.J., Dubey, R.K., 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update* 4, **3-24**.

Scheffer, D.L., Silva, L.A., Tromm, C.B., da Rosa, G.L., Silveira, P.C.L., de Souza, C.T., Latini, A., Pinho, R.A., 2012. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme* 37, 1239-1246.

Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *PNAS* 91, 10771-10778.

Sun, M., Qian, F., Shen, W., Tian, C., Hao, J., Sun, L., Liu, J., 2012. Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 22, 764-775.

Syntin, P., Chen, H.L., Zirkin, B.R., Robaire, B., 2001. Gene expression in brown Norway rat Leydig cells: Effects of age and of age-related germ cell loss. *Endocrinology* 142, 5277-5285.

Teixeira, H.D., Schumacher, R.I., Meneghini, R., 1998. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 95, 7872-7875.

Tong, W.-H., Rouault, T.A., 2007. Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis. *Biometals* 20, 549-564.

Tramer, F., Micali, F., Sandri, G., Bertoni, A., Lenzi, A., Gandini, L., Panfili, E., 2002. Enzymatic and immunochemical evaluation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in testes and epididymal spermatozoa of rats of different ages. *International Journal of Andrology* 25, 72-83.

Tsuchida, S., 2000. Glutathione transferase, in: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press Oxford, pp. 83-85.

Vazquez-Memije, M.E., Capin, R., Tolosa, A., El-Hafidi, M., 2008. Analysis of age-associated changes in mitochondrial free radical generation by rat testis. *Mol. Cell Biochem.* 307, 23-30.

Vina, J., Sastre, J., Pallardo, F., Borras, C., 2003. Mitochondrial theory of aging: Importance to explain why females live longer than males. *Antioxid Redox Signal* 5, 549-556.

Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39, 359-407.

Wang, C., Leung, A., Sinhaikim, A.P., 1993. Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human. *Endocrinology* 133, 2773-2781.

Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R., Verhulst, S., 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271, S360-S363.

Wikelski, M., Lynn, S., Breuner, C., Wingfield, J.C., Kenagy, G.J., 1999. Energy metabolism, testosterone and corticosterone in white-crowned sparrows. *J Physiol [A]* 185, 463-470.

Yoshihara, D., Fujiwara, N., Suzuki, K., 2010. Antioxidants: Benefits and risks for long-term health. *Maturitas* 67, 103-107.

Zirkin, B.R., Chen, H.L., 2000. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod* 63, 977-981.

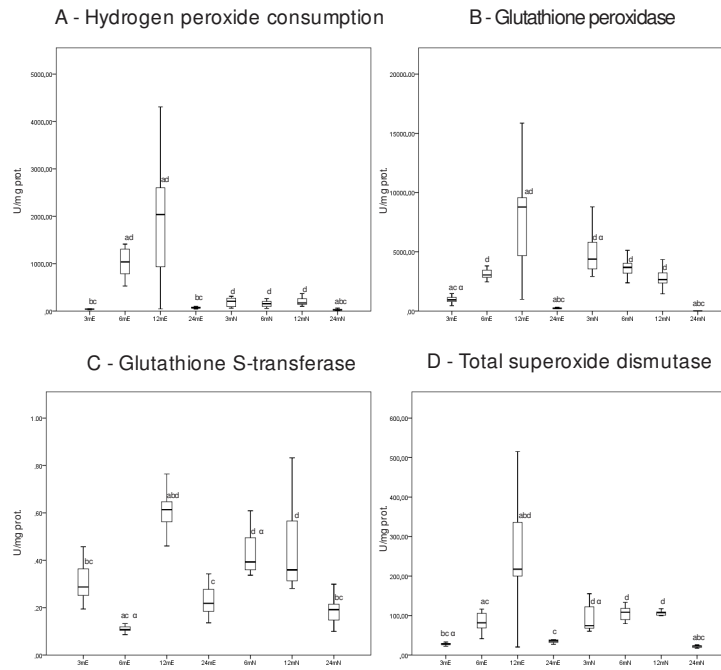


Figure 1: Boxplot of hydrogen peroxide consumption (A), glutathione peroxidase (B), glutathione S-transferase (C) and total superoxide dismutase (D). a - differs from 3 months, b - differs from 6 months, c - differs from 12 months, d - differs from 24 months,  $\alpha$  - differs from same age in the other group ( $p \leq 0.05$ ) \*m, months. E, experienced. N, naïve



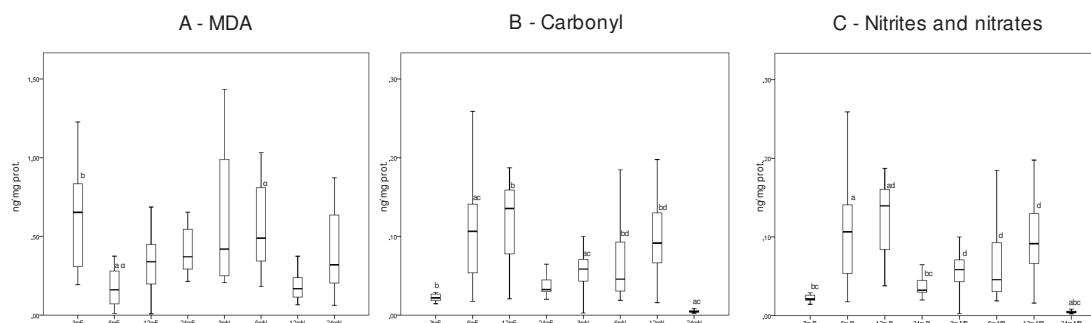


Figure 2: Boxplot of malondialdehyde (MDA) levels (A), carbonyl (B) and nitrites and nitrates (C). a - differs from 3 months, b - differs from 6 months, c - differs from 12 months, d - differs from 24 months,  $\alpha$  - differs from same age in the other group ( $p \leq 0.05$ ) \*m, months. E, experienced. N, naïve.

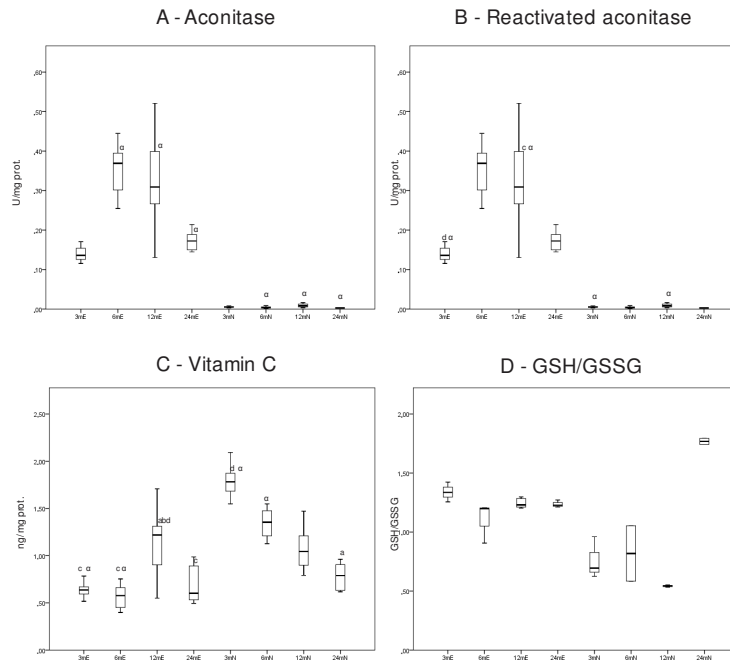


Figure 3: Boxplot of aconitase (A), reactivate aconitase (B), vitamin C (C) and GSH/GSSG ratio (D). a - differs from 3 months, b - differs from 6 months, c - differs from 12 months, d - differs from 24 months,  $\alpha$  - differs from same age in the other group ( $p \leq 0.05$ ) \*m, months. E, experienced. N, naïve.

Table 1 – Male rats with (experienced) and without (naïve) reproductive activity body and gonad weight, body length (without tail) and testosterone levels. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

	Experienced		Naïve	
<b>Body Weight (g)</b>				
3 months	339.54 $\pm$ 40.43		296.82 $\pm$ 3.30	
6 months	397.27 $\pm$ 59.13		310.51 $\pm$ 7.10	
12 months	468.37 $\pm$ 42.63		433.01 $\pm$ 24.62	
24 months	421.97 $\pm$ 26.97		436.71 $\pm$ 36.81	
<b>Body Length (cm)</b>				
3 months	21.81 $\pm$ 1.60		20.22 $\pm$ 0.21	
6 months	22.27 $\pm$ 1.19		22.02 $\pm$ 0.40	
12 months	23.78 $\pm$ 1.40		22.50 $\pm$ 0.30	
24 months	24.00 $\pm$ 0.81		22.03 $\pm$ 0.30	
<b>Gonad (g)</b>				
3 months	3.28 $\pm$ 0.27		3.02 $\pm$ 0.34	
6 months	3.54 $\pm$ 0.43		3.09 $\pm$ 0.35	
12 months	3.71 $\pm$ 0.43		3.02 $\pm$ 0.31	
24 months	3.92 $\pm$ 0.78		3.04 $\pm$ 0.31	
<b>Testosterone (ng/mL)</b>				
3 months	371.75 $\pm$ 86.23	cd $\alpha$	40.725 $\pm$ 17.36	cd $\alpha$
6 months	302.97 $\pm$ 93.02	cd $\alpha$	103.91 $\pm$ 97.57	cd $\alpha$
12 months	53.63 $\pm$ 27.08		32.37 $\pm$ 23.64	
24 months	38.52 $\pm$ 21.51		28.51 $\pm$ 7.82	

b - differs from 6 months ( $p \leq 0.05$ )

c - differs from 12 months ( $p \leq 0.05$ )

d - differs from 24 months ( $p \leq 0.05$ )

$\alpha$  - differs from same age in the other group ( $p \leq 0.05$ )

Supplementary table 1 - Spearman correlations

		$\Delta\text{H}_2\text{O}_2$	Gpx	MDA	tSOD	GST	Vit C	$\text{NO}^\bullet$	Aco	Acore	Carbonyl	Test.#
Spearman's rho Esperienced	$\Delta\text{H}_2\text{O}_2$	1	-0.348	-0.259	0.268	-0.329	-0.664**	0.102	-0.096	-0.189	0.18	-0.228
	Gpx	-0.348	1	0.24	-0.492*	0.319	0.221	-0.049	-0.139	-0.088	-0.437	0.314
	MDA	-0.259	0.24	1	-0.044	0.657**	-0.112	0.104	-0.211	-0.108	-0.29	0.167
	tSOD	0.268	-0.492*	-0.044	1	-0.335	-0.249	-0.182	0.108	0.077	0.450*	-0.453
	GST	-0.329	0.319	0.657**	-0.335	1	0.152	-0.296	0.127	0.27	-0.271	0.439
	VitC	-0.664**	0.221	-0.112	-0.249	0.152	1	-0.540*	0.527*	0.588*	0.304	0.027
	$\text{NO}^\bullet$	0.102	-0.049	0.104	-0.182	-0.296	-0.540*	1	-0.845**	-0.895**	-0.395	0.26
	Aco	-0.096	-0.139	-0.211	0.108	0.127	0.527*	-0.845**	1	0.880**	0.505*	-0.257
	Acore	-0.189	-0.088	-0.108	0.077	0.27	0.588*	-0.895**	0.880**	1	0.3	-0.137
	Carbonyl	0.18	-0.437	-0.29	0.450*	-0.271	0.304	-0.395	0.505*	0.3	1	-0.603*
	Test.	-0.228	0.314	0.167	-0.453	0.439	0.027	0.26	-0.257	-0.137	-0.603*	1

Spearman's rho		$\Delta H_2O_2$	Gpx	MDA	tSOD	GST	Vit C	NO•	Aco	Acore	Carbonyl	Test.
Naive	$\Delta H_2O_2$	1	0.311	-0.321	-0.165	-0.785**	0.115	0.044	-0.292	0.015	-0.483*	-0.168
	Gpx	0.311	1	-0.061	-0.564*	-0.504	0.036	-0.657**	-0.294	0.183	-0.493	-0.464
	MDA	-0.321	-0.061	1	-0.154	0.171	0.071	-0.4	0.147	0.047	0.089	0.464
	tSOD	-0.165	-0.564*	-0.154	1	0.286	0.2	0.343	-0.143	-0.498	0.538*	0.245
	GST	-0.785**	-0.504	0.171	0.286	1	0.059	0.153	0.065	-0.035	0.512*	-0.154
	VitC	0.115	0.036	0.071	0.2	0.059	1	0.062	0.056	0.363	0.174	0.042
	NO•	0.044	-0.657**	-0.4	0.343	0.153	0.062	1	0.419	0.236	0.403	-0.035
	Aco	-0.292	-0.294	0.147	-0.143	0.065	0.056	0.419	1	0.139	0.333	0.088
	Acore	0.015	0.183	0.047	-0.498	-0.035	0.363	0.236	0.139	1	0.035	-0.13
	Carbonyl	-0.483*	-0.493	0.089	0.538*	0.512*	0.174	0.403	0.333	0.035	1	-0.224
	Test.	-0.168	-0.464	0.464	0.245	-0.154	0.042	-0.035	0.088	-0.13	-0.224	1
		$\Delta H_2O_2$	Gpx	MDA	tSOD	GST	Vit C	NO•	Aco	Acore	Carbonyl	Test.

#Test, Testosterone

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

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

#### 4. Discussão e conclusões

A seleção sexual e conflito sexual podem moldar estratégias divergentes de esforço reprodutivo dependente da idade que, por sua vez, afetam a evolução do envelhecimento e longevidade. No entanto trabalhos tratando de seleção sexual têm sido pobremente integrados à pesquisa de envelhecimento (Graves, 2007; Bonduriansky, Maklakov *et al.*, 2008), visto que a maioria dos estudos sobre a reprodução utiliza apenas fêmeas que demonstram grandes alterações metabólicas nos processos de geração de prole. Alguns estudos mostraram que os machos também exibem mudanças físicas, tais como aumento do tamanho dos testículos (Arenas-Rios, Leon-Galvan *et al.*, 2007), e mudanças de comportamento, como brigas com outros machos (Bonduriansky, Maklakov *et al.*, 2008). Ao contrário do que se esperava, a produção de espermatozoides parece ter um custo trivial em relação aos demais custos metabólicos (Olsson, Madsen *et al.*, 1997).

O objetivo deste estudo foi traçar o perfil oxidativo nas gônadas de ratos machos durante o envelhecimento comparando animais com e sem atividade reprodutiva. No grupo com atividade reprodutiva (Capítulo 3), os dados revelaram um aumento progressivo na atividade de todas as enzimas antioxidantes, até atingirem a idade de 12 meses, seguido de uma queda abrupta nos animais mais velhos (24 meses). No grupo sem atividade reprodutiva, a atividade das enzimas antioxidantes permaneceu estável de 3 a 12 meses de idade, caindo em 24 meses. Estes resultados estão de acordo com a teoria de envelhecimento por radicais livres (Harman, 1956) a qual propõe que há um acúmulo de lesões moleculares ao longo do envelhecimento, provocadas pelas reações de espécies reativas nos

componentes celulares ao longo da vida, que conduzem à perda de funcionalidade com o aumento da idade.

Esta ausência de variações nos animais não reprodutores poderia ser entendida como uma preservação do organismo, visto que o órgão não está em uso, o que manteria a atividade enzimática em níveis basais, protegendo assim o órgão para quando o animal finalmente fosse reproduzir.

Os machos reprodutores apresentaram, como esperado, maior atividade da enzima aconitase (artigo fig. 3 A e B), que animais não reprodutores. Este resultado é indicativo de maior atividade mitocondrial nos animais reprodutores.

A atividade da enzima aconitase (ACO) está ligada ao controle de processos oxidativos, principalmente no funcionamento mitocondrial, participando do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) (Medvedeva, Popova *et al.*, 2002). Na mitocôndria, a ACO faz a conversão do citrato em cis-aconitato e este para isocitrato (Krebs e Holzach, 1952).

A atividade da enzima está intimamente relacionada com o estado redox do ferro em seu núcleo, se este estiver no estado  $Fe^{+3}$  a enzima está ativa, se estiver no estado  $Fe^{+2}$ , a enzima perde este ferro e está inativa. O mecanismo proposto de inativação da ACO é via danos por  $O_2^{\bullet-}$ . Ao reativarmos a enzima (Capítulo 3) estamos convertendo todos os  $Fe^{+2}$  em  $Fe^{+3}$ . O fato de não haver diferença significativa nestas medidas (normal e reativada) pode ser um indicativo que a mitocôndria está funcionando normalmente, sem maior escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons (CTE). (Teixeira, Schumacher *et al.*, 1998; Ramara, Duckles *et al.*, 2007)

O grupo reprodutor também mostrou uma correlação positiva (0,505) da atividade mitocondrial com níveis de dano oxidativo (carbonilação de proteína) e uma correlação negativa (-0,845), com níveis de óxido nítrico. Isto sugere que houve um aumento de danos a proteínas, provavelmente devido à maior atividade mitocondrial. A menor concentração de óxido nítrico (com o aumento de atividade mitocondrial), sugere que o óxido nítrico é consumido em processos como a espermatogênese e esteroidogênese (Fig 5) (Rosselli, Keller *et al.*, 1998; Lee e Cheng, 2004).

O óxido nítrico (NO) desempenha um papel importante na reprodução. No cérebro, ele ativa a liberação de hormônio luteinizante (através dos neurônios liberadores de hormônio luteinizante - LHRH) que atinge a hipófise e ativa a liberação de gonadotrofinas, que por sua vez estimulam a síntese neuronal de NO (via nNOS) na hipófise (Canteros, Rettori *et al.*, 1996). No pênis, estes terminais nervosos liberam NO que ativam a guanilato ciclase solúvel no músculo liso dos corpos cavernosos: essa geração de cGMP provoca o relaxamento do músculo liso do pênis permitindo a entrada de sangue através das artérias penianas causando assim a ereção (Burnett, Lowenstein *et al.*, 1992). O NO também influencia o comportamento sexual (em fêmeas de ratos é responsável pelo comportamento de lordose). No desenvolvimento das gônadas femininas, o NO desempenha um papel importante na indução da ovulação e luteólise (degradação do corpo lúteo na ausência de fecundação).



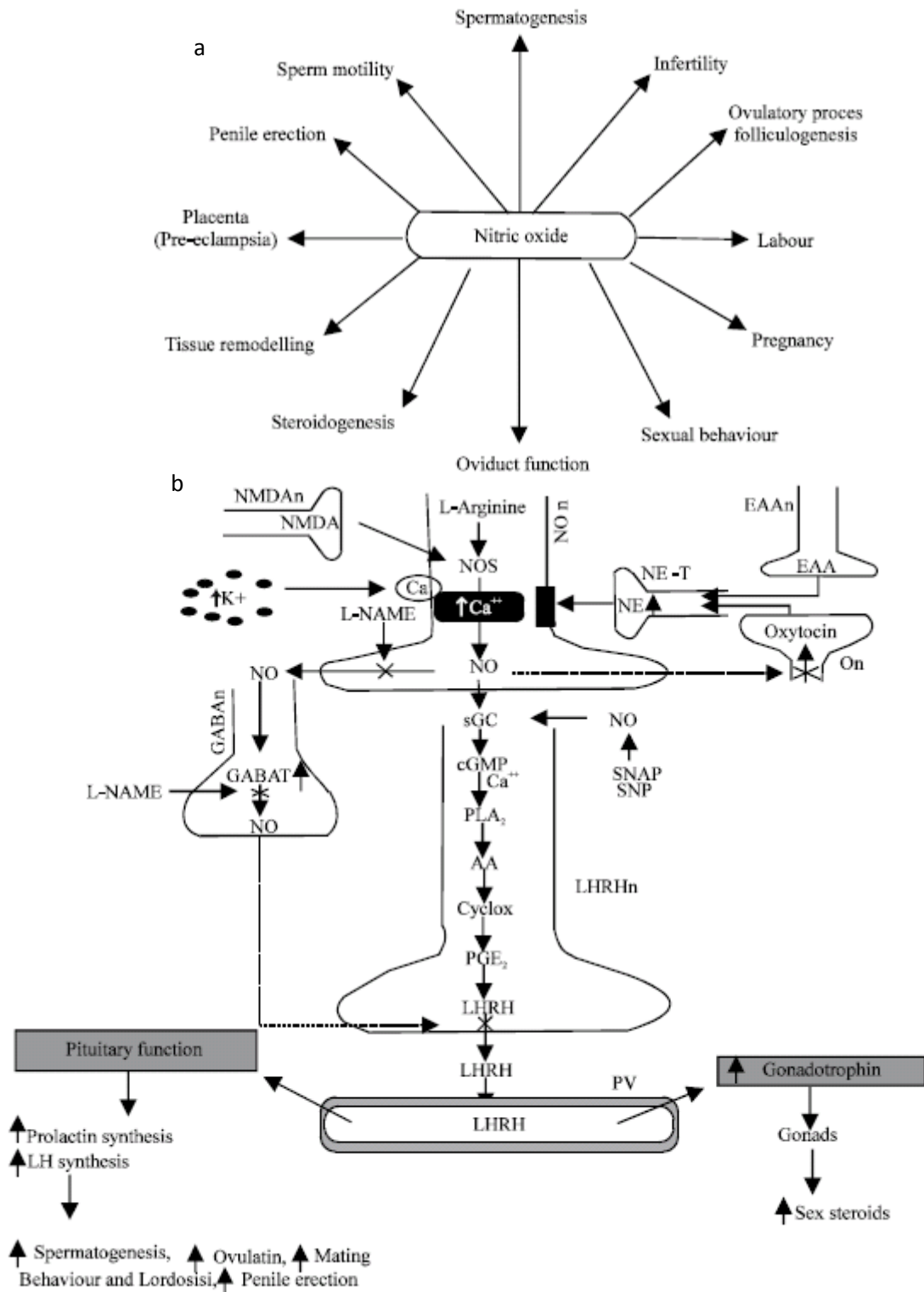


Figura 5: a) processos reprodutivos influenciados pelo óxido nítrico. b) múltiplos mecanismos/vias pelas quais o óxido nítrico regula a esteroidogênese em fêmeas. O NO regula a liberação de LHRH em resposta à oxitocina, noraepinefrina (NE), aminoácidos excitatórios (EAA) como o ácido glutâmico,

ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e potássio extracelular ( $K^+$ ). LHRH por sua vez estimula a hipófise e desencadeia a síntese de prolactina e LH. LHRH também estimula as gônadas via liberação de gonadotrofinas e isto regula a síntese de esteroides sexuais (figura adaptada de Shapar, *et al.* 2007)

No entanto, nossa compreensão de como a seleção sexual afeta o envelhecimento é ainda muito restrita. Para desenvolver a nossa compreensão novos estudos devem caracterizar como a seleção sexual afeta o esforço reprodutivo dependente da idade, envelhecimento e vida em uma ampla variedade de histórias de vida. Levando em conta, por exemplo, espécies com rituais de acasalamento monogâmico comparando com animais com acasalamento do tipo poliândrico, estratégias de cuidado parental (por exemplo materna vs paternal vs biparental). Essa pesquisa pode, portanto, elucidar a interação entre estratégias de histórias de vida e seleção sexual (Bonduriansky, Maklakov *et al.*, 2008).

Seria interessante também para ajudar a desenvolver ainda mais o entendimento da interação entre o envelhecimento, ambiente e seleção sexual comparar os efeitos de medição de envelhecimento em experimentos de laboratório com medições em ambiente natural (Bonduriansky, Maklakov *et al.*, 2008) permitindo assim estudos sobre a seleção sexual, por exemplo, e avaliar como esta afetaria a taxa de mortalidade e desempenho fisiológico (senescência). Com base nos resultados é possível concluir que há diferenças metabólicas no testículo entre animais reprodutores e animais não reprodutores.



## 5. Perspectivas

- Avaliar diferenças no perfil oxidativo de outros órgãos.
- Avaliar diferenças no perfil oxidativo em fêmeas, ao longo do envelhecimento, com e sem atividade reprodutiva.
- Estabelecer curvas de sobrevivência para a determinação da longevidade dos animais com e sem atividade reprodutiva.
- Avaliar diferenças no perfil oxidativo em espécies com rituais de acasalamento monogâmico comparando com animais com acasalamento do tipo poliândrico
- Avaliar diferenças no perfil oxidativo e estratégias de cuidado parental.
- Isolar e avaliar a atividade das mitocôndrias para confirmação dos resultados sugeridos pela enzima aconitase.

## 6. Referências

ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Lipid Oxidation and Peroxidation in CNS Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 1, p. 125-169, Jan 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272405000007 >.

AEBI, H. Catalase invitro. **Method Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1984AAB8100014 >.

AKISHITA, M. et al. Low testosterone level as a predictor of cardiovascular events in Japanese men with coronary risk factors. **Atherosclerosis**, v. 210, n. 1, p. 232-236, May 2010. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277085300038 >.

ALABARSE, P. V. G. et al. Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. **Exp. Gerontol.**, v. 46, n. 4, p. 241-248, 2011.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 10, Oct 2011. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295313000001 >.

ALONSO-ALVAREZ, C. et al. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 274, n. 1611, Mar 22 2007. ISSN 0962-8452. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243842100008 >.

ANDRIC, S. A. et al. Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 5, p. E1399-E1408, Nov 2007. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250800500034 >.

\_\_\_\_\_. Testosterone-Induced Modulation of Nitric Oxide-cGMP Signaling Pathway and Androgenesis in the Rat Leydig Cells. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 3, p. 434-442, Sep 2010. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281153800015 >.

ARENAS-RIOS, E. et al. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 1, p. 150-158, Sep 2007. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <Go to ISI>://000249103900017 >.

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

BONDURIANSKY, R. et al. Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. **Functional Ecology**, v. 22, n. 3, p. 443-453, Jun 2008. ISSN 0269-8463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255940400007 >.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

BUCHANAN, K. L. et al. Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling? **Proc R Soc B Biol Sci**, v. 268, n. 1474, p. 1337-1344, 2001. ISSN 0962-8452. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169865400003 >.

BURNETT, A. L. et al. NITRIC-OXIDE - A PHYSIOLOGICAL MEDIATOR OF PENILE ERECTION. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 401-403, Jul 17 1992. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JD67400038 >.

CAMOUGRAND, N.; RIGOULET, M. Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. **Resp Physiol**, v. 128, n. 3, p. 393-401, 2001. ISSN 0034-5687. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000172882000011 >.

CANTEROS, G. et al. Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: Increased by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 4246-4250, Apr 30 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UK55700094 >.

CHEN, H. L. et al. Age-related increase in mitochondrial superoxide generation in the testosterone-producing cells of Brown Norway rat testes: relationship to reduced steroidogenic function? **Exp Gerontol**, v. 36, n. 8, p. 1361-1373, 2001. ISSN 0531-5565. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170850600010 >.

CHEN, H. L.; GE, R. S.; ZIRKIN, B. R. Leydig cells: From stem cells to aging. **Mol Cell Endocrinol**, v. 306, n. 1-2, p. 9-16, 2009. ISSN 0303-7207. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267464000003 >.

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

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

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione-peroxidase. **Method Enzymol**, v. 105, p. 114-121, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984AAB8100013 >.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Free-radicals and tissue-injury. **Lab Investigation**, v. 47, n. 5, p. 412-426, 1982. ISSN 0023-6837. Disponível em: <<Go to ISI>://A1982PQ10800003 >.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, Sep 2011. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293576400008 >.

GARRATT, M. et al. Tissue-dependent changes in oxidative damage with male reproductive effort in house mice. **Functional Ecology**, v. 26, n. 2, Apr 2012. ISSN 0269-8463. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000302011400014 >.

GRAVES, B. M. Sexual selection effects on the evolution of senescence. **Evolutionary Ecology**, v. 21, n. 5, p. 663-668, Sep 2007. ISSN 0269-7653. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248941500007 >.

GRENFELL, J. L. et al. Co-Evolution of Atmospheres, Life, and Climate. **Astrobiology**, v. 10, n. 1, p. 77-88, Jan-Feb 2010. ISSN 1531-1074. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275838900006 >.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th. New York: Oxford University Press, 2007. 704.

HARMAN, D. Aging - a theory based on free-radical and radiation-chemistry. **J Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956. ISSN 0022-1422. Disponível em: < <Go to ISI>://A1956CHD5000009 >.

KIRKWOOD, T. B. L. Sex and ageing. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 3, p. 413-418, Mar 2001. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <Go to ISI>://000167533700003 >.

\_\_\_\_\_. Understanding ageing from an evolutionary perspective. **J Intern Med**, v. 263, n. 2, p. 117-127, Feb 2008a. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <Go to ISI>://000252557900002 >.

\_\_\_\_\_. Understanding ageing from an evolutionary perspective. **Journal of Internal Medicine**, v. 263, n. 2, p. 117-127, Feb 2008b. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <Go to ISI>://000252557900002 >.

\_\_\_\_\_. Global aging and the brain. **Nutr Rev**, v. 68, n. 12, p. S65-S69, Dec 2010. ISSN 0029-6643. Disponível em: < <Go to ISI>://000284587300003 >.

\_\_\_\_\_. Systems biology of ageing and longevity. **Philos T R Soc B**, v. 366, n. 1561, p. 64-70, Jan 2011. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <Go to ISI>://000284718700010 >.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Rad Biol Med**, v. 47, n. 4, p. 333-343, Aug 2009. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://000268386100001 >.

KREBS, H. A.; HOLZACH, O. THE CONVERSION OF CITRATE INTO CIS-ACONITATE AND ISOCITRATE IN THE PRESENCE OF ACONITASE. **Biochemical Journal**, v. 52, n. 4, p. 527-528, 1952. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1952UB54600034 >.

KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. 1st edition. New York: Academic Press, 2000. 756.

LEE, N. P. Y.; CHENG, C. Y. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, Feb 2004. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188395400001 >.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Method Enzymol**, v. 186, p. 464-478, 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <Go to ISI>://A1990MC42000049 >.

MEDVEDEVA, L. V. et al. Catalytic properties of cytoplasmic and mitochondrial aconitate hydratase from rat cardiomyocytes. **Biology Bulletin**, v. 29, n. 5, Sep-Oct 2002. ISSN 1062-3590. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179179000003 >.

MISRA, H. P.; FRIDOVIC, I. Role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-8, 1972. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://A1972M555300028 >.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry**. 5ª. W. H. Freeman, 2008. 1100 pages ISBN 071677108X.

OLSSON, M.; MADSEN, T.; SHINE, R. Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. **Proc. R. Soc. B**, v. 264, n. 1380, p. 455-459, Mar 1997. ISSN 0962-8452. Disponível em: <<Go to ISI>://A1997WQ94800025 >.

RAMARA, A. et al. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. **Brain Research**, v. 1176, p. 71-81, Oct 24 2007. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251203800009 >.

RATTAN, S. I. S. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. **Free Radic Res**, v. 40, n. 12, p. 1230-1238, Dec 2006. ISSN 1071-5762. Disponível em: <<Go to ISI>://000241848100002 >.

REBRIN, I.; KAMZALOV, S.; SOHAL, R. S. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. **Free Rad Biol Med**, v. 35, n. 6, p. 626-635, Sep 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://000185164200009 >.

RHEE, S. G. et al. Cellular regulation by hydrogen peroxide. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p. S211-S215, Aug 2003. ISSN 1046-6673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184430000002 >.

RIKANS, L. E.; SNOWDEN, C. D.; MOORE, D. R. Effect of aging on enzymatic antioxidant defenses in rat-liver mitochondria. **Gerontology**, v. 38, n. 3, p. 133-138, May-Jun 1992. ISSN 0304-324X. Disponível em: <<Go to ISI>://A1992HW48800003 >.

ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 1, Jan-Feb 1998. ISSN 1355-4786. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000073657600001 >.

SCHEFFER, D. L. et al. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme**, v. 37, n. 6, p. 1239-1246, Dec 2012. ISSN 1715-5312. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000311483800026 >.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **PNAS**, v. 91, n. 23, p. 10771-10778, Nov 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://A1994PQ93800005 >.

SHUVAEVA, T. M. et al. Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 5, Sep 2009. ISSN 1068-1620. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270586800001 >.

SUN, M. et al. Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 22, n. 6, p. 764-775, Dec 2012. ISSN 0905-7188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000310732100014 >.



TEIXEIRA, H. D.; SCHUMACHER, R. I.; MENEGHINI, R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 7872-7875, Jul 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074717300008 >.

VAZQUEZ-MEMIJÉ, M. E. et al. Analysis of age-associated changes in mitochondrial free radical generation by rat testis. **Mol. Cell Biochem.**, v. 307, n. 1-2, p. 23-30, Jan 2008. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <Go to ISI>://000251373000003 >.

VINA, J. et al. Mitochondrial theory of aging: Importance to explain why females live longer than males. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 5, p. 549-556, Oct 2003. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://000186101200006 >.

WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. **Annu Rev Genet**, v. 39, p. 359-407, 2005. ISSN 0066-4197. Disponível em: < <Go to ISI>://000234685200017 >.

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

WIKELSKI, M. et al. Energy metabolism, testosterone and corticosterone in white-crowned sparrows. **J Physiol [A]**, v. 185, n. 5, p. 463-470, Nov 1999. ISSN 0340-7594. Disponível em: < <Go to ISI>://000083978100008 >.

YOSHIHARA, D.; FUJIWARA, N.; SUZUKI, K. Antioxidants: Benefits and risks for long-term health. **Maturitas**, v. 67, n. 2, p. 103-107, Oct 2010. ISSN 0378-5122. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282929900003 >.

ZIRKIN, B. R.; CHEN, H. L. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. **Biol Reprod**, v. 63, n. 4, p. 977-981, Oct 2000. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://000089489300003 >.

## ANEXO I

Parecer do comite de ética:



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

pro:pesq

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

**Número :** 2007831

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

**Pesquisador (es) :**

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

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

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

  
ILMA SIMONI BRUM DA SILVA  
Coordenador do CEP-UFRGS

## ANEXO II

Curriculum Vitae

# Tiago Boeira Salomon

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5105359452270837>
- Última atualização do currículo em 24/02/2013

---

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul(2009). Atuando principalmente nos seguintes temas:Aging, Gonads, Male Rats, Oxidative stress, Reproductive cycle. **(Texto gerado automaticamente pela aplicação CVLattes)**

## Identificação

---

**Nome:** Tiago Boeira Salomon

**Nome em citações bibliográficas:** SALOMON, Tiago Boeira;Salomon, Tiago Boeira;Salomon, Tiago B.

**Sexo:** Masculino

## Endereço

---

**Endereço Profissional**Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Bociências, Departamento de Biofísica.

Avenida Bento Gonçalves, 9500 predio 43431 sala 110

Agronomia

90540-000 - Porto Alegre, RS - Brasil

Telefone: (51) 33167372

Fax: (51) 33167003

URL da Homepage: <http://>

## Formação acadêmica/titulação

---

**2011** Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).

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

Título: Estresse oxidativo em ratos machos com e sem atividade reprodutiva durante o processo de envelhecimento,Orientador:

Mara da Silveira Benfato.

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

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

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biofísica / Subárea: Biofísica de Processos e Sistemas.

Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.

**2004 – 2009** Graduação em Ciências Biológicas.

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

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

Orientador: Mara da Silveira Benfato.

## Formação Complementar

---

**2007 – 2007** Extensão universitária em Introdução ao Dreamweaver. (Carga horária: 20h).

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

## Atuação Profissional

---

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

### Vínculo institucional

**2012 – 2012** Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Tutor, Carga horária: 40

### Vínculo institucional

**2010 – 2011** Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Técnico, Carga horária: 20

### Atividades

**4/2005 – Atual** Estágios , Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica.

Estágio realizado

Estágio no Laboratório de Estresse Oxidativo.

**3/2006 - 7/2006**

Estágios , Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica.

Estágio realizado

Monitoria na disciplina de Estresse Oxidativo em Sistemas Biológicos.

## Projetos de pesquisa

---

**2006 - 2010**

Defesas Antioxidantes E Dano oxidativo em espécies patogênicas de candida não-albicans

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

**2005 - Atual**

Determinação da expressão de atividade enzimática das defesas antioxidantes em ratos ao longo do envelhecimento

Descrição: Teste das Atividades de enzimas anti-oxidantes em diferentes órgãos.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (1) / Mestrado profissionalizante: (0) /

Doutorado: (0) .

Integrantes: Tiago Boeira Salomon / Fernanda Schäfer Hackenhaar - Integrante / Guilherme Ehrenbrink - Integrante / Mara

Silveira Benfato - Coordenador.

## Outros Projetos

---

Determinação da atividade enzimática das defesas antioxidantes em ratos reprodutores

Situação: Desativado; Natureza: Outra.

Determinação das defesas antioxidantes e dano oxidativo em ratos reprodutor e não reprodutores

Situação: Desativado; Natureza: Outra.

## Idiomas

---

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

**Português** Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

**Russo** Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

## Produções

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. Alabarse, Paulo Vinicius Gil ; Hackenhaar, Fernanda Schäfer ; Medeiros, Tássia Machado ; Mendes, Marcus Fabiano Almeida ; Viacava, Paula Ramos ; Schüller, Ártur Krumberg ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; EHRENBRINK, Guilherme ; BENFATO, M. S. ; Benfato, Mara Silveira . Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. Experimental Gerontology **JCR**, v. 46, p. 241-248, 2011.
2. Abegg, Maxwel Adriano ; ALABARSE, P. V. G. ; Alabarse, Paulo Vinicius Gil ; Casanova, Anderson ; Hoscheid, Jaqueline ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; Hackenhaar, Fernanda Schäfer ; Medeiros, Tássia Machado ; Benfato, Mara Silveira . Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic Yeast Species of the Genus Candida. Mycopathologia (1975. Print) **JCR**, v. 170, p. 11-20, 2010.
3. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; Alabarse, Paulo V. Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; BENFATO, Mara Silveira . Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. Cell Biochemistry and Function **JCR**, v. 27, p. 378-382, 2009.
4. EHRENBRINK, Guilherme ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; PETRUCCI, Antonella Pilla ; SANDRI, Marcia Rodrigues ; BENFATO, Mara Silveira . Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. Experimental Gerontology **JCR**, Oxford, v. 41, n.4, p. 368-371, 2006.

#### Resumos publicados em anais de congressos

1. Alabarse, Paulo V. Gil ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; Medeiros, Tássia Machado ; MENDES, M. ; SCHULLER, A. K. ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; EHRENBRINK, Guilherme ; BENFATO, Mara Silveira . Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. In: Annual Meetings of Society for Free Radical Research & The European Environmental Mutagen Society, 2010, Oslo. Programme & Abstracts. Oslo, 2010. p. 219-219.

2. **SALOMON, Tiago Boeira** ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BENFATO, Mara Silveira . Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GPx) activities in naïve and experienced male rats gonads. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 129-129.
3. ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; BENFATO, Mara Silveira . BRAIN AND AGEING: OXIDATIVE STRESS PROFILE IN REPRODUCTIVE MALE RATS. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 122-122.
4. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BENFATO, Mara Silveira . ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITIES IN KIDNEY OF NAÏVE AND EXPERIENCED MALE RATS. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 122-122.
5. Medeiros, T.M. ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; BENFATO, Mara Silveira . PULMONAR ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY AND PROTEIN DAMAGE IN FEMALE RATS OF 3, 6, 12, AND 20 MONTHS OF AGE. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008, 2008. p. 130-130.
6. **SALOMON, Tiago Boeira** ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BENFATO, Mara Silveira . Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) activities and the protein carbonylation among naïve and experienced male rat heart. In: V Meeting of SFRBM- South American Group, 2007, Montevideo. V Meeting of SFRBM-South American Group. Montevideo: Imprensa Gega s. r. l, 2007. p. 120-120.
7. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BENFATO, Mara Silveira . Pulmonary activities of antioxidant enzymes and protein damage in naïve and experienced male rats.. In: V Meeting of SFRBM-South American Group, 2007, Montevideo. V Meeting of SFRBM-South American Group. Montevideo: Imprensa Gega s. r. l., 2007. p. 59-59.
8. ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; BENFATO, Mara Silveira . Catalase, Glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities and protein damage in brains of naïve and experienced male rats.. In: V Meeting of SFRBM-South American Group, 2007, Montevideo. V Meeting of SFRBM-South American Group. Montevideo: Imprensa Gega s. r. l., 2007. p. 111-111.
9. **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE CARDÍACAS ENTRE RATOS MACHOS REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006. p. 384-384.
10. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BINS, Sofia Costa ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE PULMONARES ENTRE RATOS MACHOS REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006. p. 384-384.
11. BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES DE



- SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E CATALASE (CAT) EM GÔNADAS DE RATOS MACHOS REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006. p. 384-385.
12. ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM RATOS MACHOS DE 12 MESES REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2006. p. 385-385.
13. ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM RATOS MACHOS DE 12 MESES REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p. 2-2.
14. BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E CATALASE (CAT) EM GÔNADAS DE RATOS MACHOS REPRODUTORES E NÃO-REPRODUTORES.. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p. 11-11.
15. **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; BINS, Sofia Costa ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . Atividade das Enzimas Catalase e Superóxido Dismutase Cardíacas Entre Ratos Machos Reprodutores e Não-Reprodutores. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p. 96-96.
16. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BINS, Sofia Costa ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil ; EHRENBRINK, Guilherme ; DORNELLES, Paula ; BENFATO, Mara Silveira . COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p. 43-43.
17. BENFATO, Mara Silveira ; HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; ALABARSE, Paulo Vinicius Gil . Aprendizado usando o princípio da redescoberta. In: 2 Salão de Ensino a Distância, 2006, PORTO ALEGRE. ANAIS DO 2º SALÃO DE EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA. PORTO ALEGRE: EDITORA DA UFRGS, 2006.
18. HACKENHAAR, Fernanda Schäfer ; EHRENBRINK, Guilherme ; **SALOMON, Tiago Boeira** ; BENFATO, Mara Silveira . Atividade da superóxido dismutase em coração de ratos de ambos os sexos ao longo do envelhecimento. In: XVII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2005, Porto Alegre. Livro de resumos do XVII Salão de Iniciação Científica da Ufrgs, 2005. p. 368-368.

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

## Eventos

---

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

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