

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO LENCI MARQUES

ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO CARDÍACO: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS

CURITIBA, 2015

GUSTAVO LENCI MARQUES

ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO CARDÍACO: ESTUDO EXPERIMENTAL
EM RATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo da R. L. Bueno

Co-Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga

CURITIBA, 2015

Marques, Gustavo Lenci

Estresse oxidativo no envelhecimento cardíaco: estudo experimental em ratos /
Gustavo Lenci Marques. -- Curitiba, 2015.
51 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo da R. L. Bueno

Coorientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna.
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Envelhecimento. 2. Ratos. 3. Estresse Oxidativo. I. Bueno, Ronaldo da R. L.
II. Título.

NLM QZ 160



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos treze dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quinze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: **Renato Tambara Filho, Marcelo Mazza do Nascimento, Ronaldo da Rocha Loures Bueno**, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Gustavo Lenci Marques**, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, nível Mestrado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO CARDÍACO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS”. A Banca examinadora considerou que **Gustavo Lenci Marques**, apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da Pós-Graduação.

Curitiba, 13 de fevereiro de 2015.


Prof. Dr. Renato Tambara Filho


Prof. Dr. Marcelo Mazza do Nascimento


Prof. Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Raul da Cunha Marques e Célia Bordin Lenci pela formação que possibilitaram chegar até aqui.

Ao meu irmão, Matheus Lenci Marques, pelo apoio incondicional durante todos os anos desse projeto.

A minha esposa, Bárbara Perdonsini Lima Marques, pela compreensão e incentivo dado durante esse projeto.

Aos amigos, Felipe Dunin dos Santos, Francisco Beraldi Magalhães, Nickolas Nobrega Nadal e Vinicius Bocchino Seleme pela amizade e apoio durante o projeto.

Aos mestres prof. Miguel Ibrahim Hanna Sobrinho, prof. Paulo Roberto da Cruz Marquetti e prof. Dr. Claudio Leinig Pereira da Cunha que viabilizaram toda a realização desse projeto.

Aos colegas de pós graduação, tanto de Clínica Médica quanto de Cardiologia, pelo companheirismo nos últimos anos.

Aos colegas Eduardo Melchiorreto, Marcelo Zeni e Bruno Neves pelo auxílio na atividade experimental.

Aos professores Prof. Dr. Francisco Filipak Neto, Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira e ao doutorando Samuel Liebel pela realização das atividades laboratoriais e orientação sobre os modelos de Estresse oxidativo.

A prof. Dra. Djanira Veronez e ao funcionário Rodrigo Shuch pelo apoio na realização da experimentação animal.

Aos professores que despertaram e estimularam interesse científico em mim, prof. Dr. Rogério de Fraga e prof. Dr. Mauricio de Carvalho.

Ao meu orientador, prof. Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno, pelo acompanhamento e orientação do trabalho.

A todos os demais professores que fizeram parte direta ou indiretamente de minha formação.

À equipe do Biotério do Hospital Angelina Caron, pelo suporte técnico e pelos cuidados com os animais durante o período do experimento.

Pessimismo leva à fraqueza, otimismo ao poder.

William James

RESUMO

Introdução: Diversas teorias já foram propostas para tentar explicar o envelhecimento, mas ainda não temos pleno conhecimento sobre os fatores que afetam esse complexo processo. Entre as teorias elaboradas uma das mais estudadas é a de que o envelhecimento se dá pelo acúmulo de dano oxidativo com o tempo. E um dos órgãos mais afetados por esse tipo de dano é o coração. **Objetivos:** Esse estudo avaliou os principais marcadores de dano oxidativo, no coração de animais em diferentes idades. **Métodos:** 72 ratos Wistar foram divididos em 6 grupos de 12 animais cada, cada grupo foi sacrificado em uma idade diferente: 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses. Após a eutanásia o coração dos animais foi removido e foi realizada a dosagem de peroxidação lipídica, carbonilação proteica, tióis não proteicos, atividade de superóxido dismutase e catalase no tecido miocárdico. **Resultados:** Para a peroxidação lipídica encontramos uma redução no grupo mais velho comparado ao mais jovem, com significância estatística, bem como para a atividade de superóxido dismutase e catalase. Para a carbonilação proteica foi encontrado um pico no grupo de 12 meses seguido de queda nos mais velhos, sendo também estatisticamente significativo. Os níveis de tióis não proteicos apresentaram uma discreta ascensão no grupo 12 meses que se manteve nos grupos mais velhos, com significância estatística. **Conclusão:** Os resultados não nos permitem afirmar que o estresse oxidativo seja a causa do envelhecimento, no entanto sugerem que algumas das alterações encontradas podem ajudar a explicar o que acontece no organismo durante esse processo.

Palavras-chave: Envelhecimento, Ratos, Espécies Reativas de Oxigênio, Superóxido Dismutase, Catalase, Peroxidação Lipídica, Carbonilação Proteica, Glutathione, Coração.

ABSTRACT

Introduction: Several theories have been proposed to explain 'aging', but the factors that affect this complex process are still poorly understood. Among those theories, the accumulation of oxidative damage over time is one of the most accepted. Particularly, the heart is one of the most affected organs by oxidative stress. **Objectives:** The current study, therefore, aims to investigate oxidative stress markers in myocardial tissue of rats at different ages **Methods:** 72 rats were distributed into 6 groups of 12 animals each and maintained during 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months. After euthanasia, the heart was removed and the levels of non-protein thiols, lipid peroxidation and protein carbonylation as well as superoxide dismutase and catalase activities were determined. **Results:** For superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation were found reductions, statistically significant, in the older groups when compared with the younger group differently for protein carbonylation. In this case, a peak in the 12-month group was observed followed by a decrease in the older group. The levels of non-protein thiols increased at 12-month with statistical significance. **Conclusion:** The results do not allow us to claim that oxidative stress is a cause of aging. However, we found some changes that may help to explain what happens in the organism during this process.

Key Words: Aging, Rat, ROS, Superoxide Dismutase, Catalase, Lipid Peroxidation, Protein Carbonylation, Glutathione, Heart.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES DE FENTON (A) E HABER-WEISS (B).....	15
FIGURA 2 – REAÇÃO EM CADEIA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	16
FIGURA 3 – REAÇÕES DA SUPEROXIDO DISMUTASE (A) E CATALASE (B).....	17
FIGURA 4 – REAÇÕES DA GLUTATIONA PEROXIDASE.....	17
FIGURA 5 – PIRÂMIDE ETÁRIA BRASILEIRA NOS ANOS DE 1980, 2000 E ESTIMATIVA PARA 2020 E 2040.....	20
FIGURA 6 – FOTOGRAFIA DA PERFUSÃO COM SORO GELADO.....	25
FIGURA 7 – GRÁFICOS DO PESO, COMPRIMENTO e IMC DOS ANIMAIS.....	31
FIGURA 8 – GRÁFICOS DE RESULTADOS DOS MARCADORES DE DANO OXIDATIVO.....	32
FIGURA 9 – GRÁFICOS DE RESULTADOS DOS FATORES ANTIOXIDANTES.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EQUIVALENCIA DE 1 ANO DA VIDA HUMANA PARA VIDA DE RATOS WISTAR, EM DIAS, EM CADA FASE DO CICLO DE VIDA.....	23
TABELA 2 – MÉDIA, DESVIO PADRÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS ENCONTRADOS.....	34

LISTA DE SIGLAS

BHT – *Butylated Hydroxytoluene* (Hidroxitolueno butilado)

BSA – Albumina de Soro Bovina

CAT – Catalase

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEAE – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DTNB – 5,5-ditiobis- (2-ácido nitrobenzóico)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

GPx – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG – Glutathione Oxidada

HCl – Ácido Clorídrico

IGF – *Insuline-like Growth Factor* (Fator de Crescimento similar a Insulina)

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LPO – Peroxidação Lipídica

NaCl – Cloreto de Sódio

NBT – Nitroazul de Tetrazólio

NF-kB – Fator Nuclear Kappa B

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-salino)

PCO – Carbonilação Proteica

SOD – Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	15
2.2 DANO OXIDATIVO E DOENÇA.....	18
2.3 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E SAÚDE.....	20
2.4 MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS SOBRE ENVELHECIMENTO	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 GRUPOS.....	24
3.2 EXPERIMENTAÇÃO	24
3.3 DOSAGEM DE GLUTATIONA E OUTROS TIÓIS	26
3.4 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS	26
3.5 AVALIAÇÃO DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS	27
3.6 ATIVIDADE DA SUPEROXIDO DISMUTASE	28
3.7 ATIVIDADE DA CATALASE	28
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4 RESULTADOS	31
4.1 ANIMAIS.....	31
4.2 TESTE DE NORMALIDADE E CORRELAÇÕES.....	31
4.3 MARCADORES DE DANO OXIDATIVO	32
4.4 FATORES ANTIOXIDANTES.....	33
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	47
ANEXOS	49

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo inevitável, que ocorre em todas as espécies a partir do período reprodutivo. Com o passar do tempo culmina com a piora funcional de múltiplos sistemas e com o aumento da morbidade e mortalidade (Hayflick, 1998). Desde o início do século XX diversas teorias foram propostas para explicar como ocorre o processo do envelhecimento celular. Estas teorias podem ser divididas em dois grupos principais, as que se referem ao envelhecimento programado e as teorias do dano acumulado (Jin, 2010).

As teorias do envelhecimento programado propõem que o processo de envelhecimento é resultado de condições internas do organismo. Dentro dessa forma de pensamento podemos subdividir os estudos em três linhas: aqueles que pesquisam uma predeterminação genética, com a pesquisa de genes relacionados a maior longevidade (Davidovic *et al.*, 2010); aqueles que estudam os efeitos da atividade hormonal, como as alterações da mulher pós menopausa ou a variação nos níveis de *Insuline-like Growth Factor 1* (IGF-1) no processo de envelhecimento (Van Heemst, 2010); e os que avaliam o papel do sistema imune, como a redução de linfócitos, de células hematopoiéticas e do desequilíbrio imune que facilitaria processos infecciosos ou até mesmo doenças como mal de Alzheimer e alguns tipos de câncer (Rozemuller, Van Gool e Eikelenboom, 2005)

Já as teorias do envelhecimento por dano acumulado defendem um processo de envelhecimento causado principalmente por causas externas. Seguindo esse pensamento algumas linhas se sobressaem, entre estas destacamos: a teoria do desgaste, proposta por August Weissman em 1832, em que o processo ocorreria por danos causados por uso e exposição repetida a fatores agressores, como o que ocorre com algum objeto quando usado excessivamente, tendo como exemplo clássico no ser humano o foto dano causado pela exposição solar (Jin, 2010); a teoria do dano acumulado ao DNA, que propõe que durante o processo de divisão celular o DNA pode sofrer danos e podem ocorrer falhas no sistema de reparo, o acúmulo dessas falhas no material genético causaria disfunção e envelhecimento celular (Garinis *et al.*, 2008).

Outra teoria que se destaca dentro da linha de pensamento do envelhecimento por dano acumulado é a teoria dos radicais livres de oxigênio, que vem sendo

estudada desde a década de 50 (Harman, 1956). Ela propõe que o acúmulo do dano oxidativo produzido pela respiração celular no decorrer da vida, junto com um desequilíbrio de fatores antioxidantes, provocaria lesão em diversas estruturas celulares, como DNA, proteínas e lipídios, levando a falência funcional e consequente morte celular (Harman, 1956; Rikans e Hornbrook, 1997; Cui, Kong e Zhang, 2012). Seguindo essa linha de raciocínio, órgãos que apresentam grande consumo de oxigênio e células com grande longevidade estariam particularmente susceptíveis aos danos oxidativos. Dentre os órgãos com essa característica destacamos o sistema nervoso central e o coração, esse último, ainda com a característica de possuir um baixo *turnover* de moléculas antioxidantes (Molina e García, 1997; Lakatta e Sollott, 2002; Babusikova *et al.*, 2008).

Estas informações são corroboradas por dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA que revelam que o perfil de morbimortalidade em indivíduos idosos se dá principalmente por doenças crônico-degenerativas e apontam como a principal causa de óbito em idosos as doenças do aparelho cardiovascular (Murphy, Xu e Kochanek, 2013).

Além disso, o dano oxidativo tem papel em diversas alterações no tecido miocárdico, como redução da capacidade contrátil, piora da função diastólica, aumento de arritmias, além de induzir apoptose dos cardiomiócitos (Singal *et al.*, 1998). Também já foi relacionado com a fisiopatologia de doenças do aparelho cardiovascular, como insuficiência cardíaca e doença arterial coronariana (Dhalla, Temsah e Netticadan, 2000; Grieve e Shah, 2003; Vassalle *et al.*, 2004; Vichova e Motovska, 2013).

Diversos foram os estudos que avaliaram a relação entre marcadores de estresse oxidativo e o envelhecimento (Reiss e Gershon, 1976; Hazelton e Lang, 1980; Sawada e Carlson, 1987; Cand e Verdeti, 1989; Stadtman, 2006). Mas os resultados foram divergentes e o seu papel no processo do envelhecimento cardiovascular continua incerto.

Com base nessas informações, o presente estudo foi planejado, utilizando um modelo com ratos da raça Wistar, a fim de avaliar a dosagem miocárdica de marcadores de dano oxidativo (Peroxidação Lipídica e Carbonilação Proteica) e

fatores antioxidantes (nível de Tióis não proteicos e atividade das enzimas Catalase e Superóxido Dismutase) ao longo da vida do animal.

1.1 OBJETIVOS

Esse trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1. Avaliar como ocorre a variação de marcadores do dano oxidativo, representados pela peroxidação lipídica e carbonilação proteica, ao longo da vida do animal, do período reprodutivo até a senescência.
2. Avaliar como ocorre a variação das principais defesas do organismo contra o dano oxidativo na vida do animal, representados pelo nível de tióis não proteicos e pela atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase.
3. Tentar estabelecer o papel dos marcadores como causa do processo de envelhecimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são espécies químicas que contém elétrons desemparelhados, altamente instáveis, e por isso altamente reativos, capazes de reagir com diversas moléculas a fim de obter estabilidade (Devasagayam *et al.*, 2004). Quando esses radicais livres são provenientes do processo de redução do oxigênio recebem o nome de Radicais Livres de Oxigênio ou Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Estima-se que 3 a 5% de todo oxigênio que passe pelo processo de respiração celular gere algum tipo de radical livre de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Dentre todos os radicais livres de oxigênio três se destacam, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical Hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O primeiro tem grande importância por ser o radical mais abundante na célula e por ser o mais estável. Já o segundo é extremamente instável, tem meia-vida muito curta, mas é o mais nocivo às células, pois não há uma via enzimática no organismo que atue diretamente contra esse ânion. O peróxido de hidrogênio não pode ser conceituado como uma ERO, mas tem sua importância pela grande capacidade em gerar radicais livres e por poder atuar como sinalizador celular.

Existe ainda a possibilidade de conversão de um radical em outro. O ânion superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) que por sua vez pode reagir com metais e gerar a radical hidroxila nas reações descritas por Fenton e Haber-Weiss, como pode ser observado na (FIGURA 1).

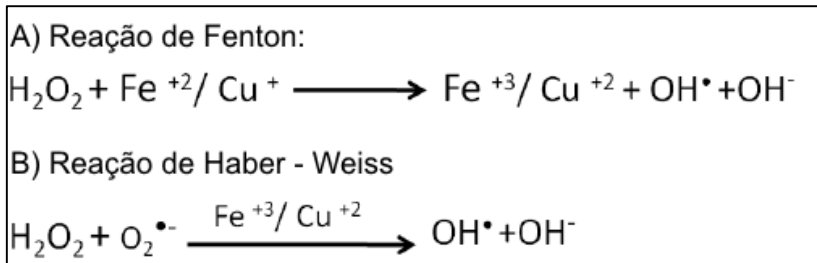


FIGURA 1: A) REAÇÃO DE FENTON, REAÇÃO DO PEROXIDO DE HIDROGÊNIO COM FERRO OU COBRE GERANDO O RADICAL HIDROXILA. B) REAÇÃO DE HABER-WEISS, PEROXIDO DE HIDROGÊNIO REAGINDO COM O ÂNION SUPERÓXIDO, MEDIADA POR FERRO OU COBRE, GERANDO O RADICAL HIDROXILA. FONTE: ADAPTADO DE HALLIWELL E GUTTERIDGE (2007)

Esses radicais podem reagir com diversas estruturas celulares como lipídios de membrana, DNA e proteínas celulares. Ao reagirem com os ácidos graxos insaturados da membrana celular geram um lipídio altamente reativo, que ao reagir com outro ácido graxo insaturado produz um aldeído ou lipídio peroxidado e um novo radical livre lipídico, propagando o fenômeno por meio de uma reação em cadeia que só é interrompida quando não há mais ácidos graxos insaturados para reagir ou quando algum sistema antioxidante age, como exemplificado na (FIGURA 2) (Abdalla e Sena, 2008). Quando reagem com aminoácidos da cadeia lateral das proteínas levam a um processo conhecido como carbonilação proteica, gerando alterações nas funções dessas proteínas, o mecanismo biológico dessa reação é complexo e ainda não bem compreendido (Suzuki, Carini e Butterfield, 2010). Quando reagem com o DNA podem gerar alterações diretamente nas bases nitrogenadas ou alterar a ligação entre elas, levando a mutações no material genético (Núñez, Hall e Barton, 1999).

Assim sendo, a peroxidação lipídica é um importante marcador do dano oxidativo a parede celular, podendo indicar o grau de disfunção celular. Já a carbonilação proteica indica um grau elevado de falência intra celular, podendo ser o marcador de algumas doenças.

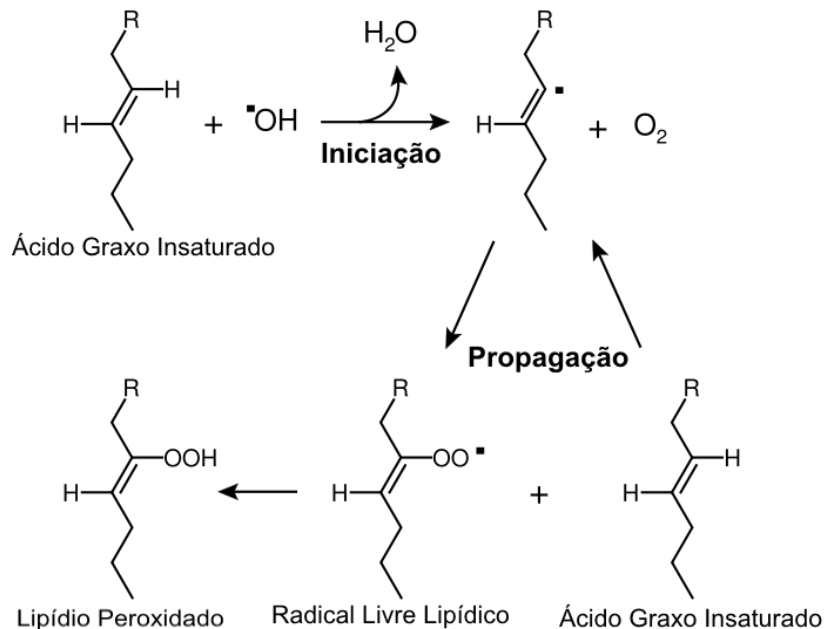


FIGURA 2: REAÇÃO EM CADEIA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. ADAPTADO DE HALLIWELL E GUTTERIDGE (2007)

Apesar da produção constante de espécies reativas de oxigênio existem formas de defesa contra esse dano, que incluem agentes antioxidantes como a vitamina A e C, os flavonoides, o ácido úrico, além de vias enzimáticas intrínsecas da célula. Dentre essas vias enzimáticas destacam-se três, a superóxido dismutase (SOD), a catalase(CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A catalase, nos peroxissomos, realiza uma reação de transformação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, complementando a reação já descrita para a SOD (conversão de O_2^- em H_2O_2), como representado na (FIGURA 3). A Glutathiona Peroxidase, utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como cofator e reage com peróxidos transformando-os em álcool ou em água quando reage com o peróxido de hidrogênio (FIGURA 4).

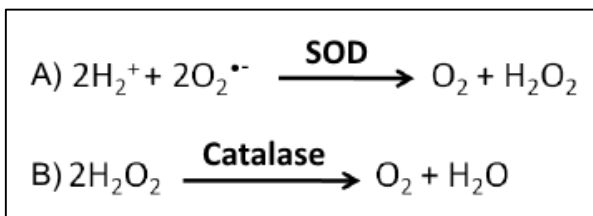


FIGURA 3: A) CONVERSÃO DO RADICAL SUPERÓXIDO EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E OXIGÊNIO, MEDIADA PELA SOD. B) CONVERSÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM OXIGÊNIO E ÁGUA. FONTE: ADAPTADO DE HALLIWELL E GUTTERIDGE (2007).

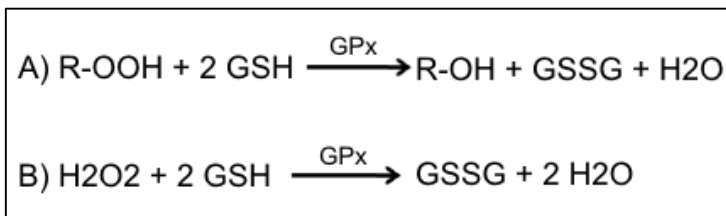


FIGURA 4: A) REAÇÃO DE UM PERÓXIDO COM A GSH, MEDIADA PELA GPX, GERANDO UM ÁLCOOL, ÁGUA E GLUTATIONA OXIDADA. B) REAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COM A GSH, MEDIADA TAMBÉM PELA GPX, GERANDO 2 MOLÉCULAS DE ÁGUA E GLUTATIONA OXIDADA. FONTE: ADAPTADO DE HALLIWELL E GUTTERIDGE (2007).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes, favorecendo a produção destes, temos o estresse oxidativo, dano celular, o que pode levar a doença (Sies, 1997).

2.2 DANO OXIDATIVO E DOENÇA

Além da teoria que relaciona o dano oxidativo como causa do envelhecimento, diversas doenças já foram relacionadas com esse mecanismo, entre elas podemos citar doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Jenner e Olanow, 1996; Markesbery, 1997), doenças pulmonares crônicas como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Rahman, 2005), insuficiência renal (Locatelli *et al.*, 2003) e doenças do aparelho cardiovascular. Dentre as doenças do aparelho cardiovascular destacam-se a doença coronariana aguda e crônica, a insuficiência cardíaca e a hipertensão.

Na doença coronariana crônica o estresse oxidativo exerce papel fundamental na gênese da placa aterosclerótica, gerando apoptose endotelial, exposição de fatores de adesão, estimulando a hipertrofia da musculatura lisa e alterando a resposta vasomotora, além de agir diretamente na oxidação lipídica da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), o que o torna mais aterogênico (Harrison *et al.*, 2003).

Na síndrome coronariana aguda, sabemos que as EROs exercem papel na placa instável, pois quanto mais LDL oxidado contém a placa mais células inflamatórias sofrem quimiotaxia local, contribuindo para a instabilidade (Stocker e Keaney, 2004). Além desse mecanismo, sabemos que durante o período de isquemia miocárdica ocorre uma redução importante nos níveis de glutathione reduzida e quando ocorre a reperfusão terapêutica esse tecido recebe uma grande carga de sangue rico em oxigênio, gerando EROs e provocando danos a um tecido que está com uma de suas vias de proteção debilitada (Ferrari *et al.*, 1990). Acredita-se ainda que esse dano oxidativo pós reperfusão seja o responsável pelo fenômeno do miocárdio atordado, ao gerar dano oxidativo às proteínas do cardiomiócito reduzindo sua capacidade contrátil (Bolli *et al.*, 1989).

Na hipertrofia miocárdica, as EROs exercem papel significativo, ativando uma cascata de reações que envolvem a hipertrofia mediada pela angiotensina II. Estudos laboratoriais comprovaram essa hipótese ao demonstrar que ao combater as EROs com antioxidantes ocorre uma redução na atividade da angiotensina II (Nakamura *et al.*, 1998). Parecem também estar relacionadas diretamente com a ativação da transcrição genética do fator nuclear kappa-B (NF-kB), um dos fatores responsáveis pela hipertrofia do cardiomiócito (Giordano, 2005). Além desses mecanismos, o dano

oxidativo ainda está relacionado com a indução de apoptose nas células cardíacas, participando na evolução de um quadro de hipertrofia para um de insuficiência cardíaca (Dhalla, Hill e Singal, 1996; Von Harsdorf, Li e Dietz, 1999).

Já a hipertensão arterial foi relacionada com o estresse oxidativo pela primeira vez em 1991, quando Nakazono *et al* (1991) demonstrou que a injeção da enzima antioxidante Superóxido Dismutase reduzia a pressão arterial de ratos hipertensos. No entanto, o mecanismo pelo qual se relaciona a hipertensão com EROs ainda não está claro e parece ser dependente de vários outros órgãos além do sistema cardiovascular, como os rins e o cérebro (Harrison e Gongora, 2009). No sistema cardiovascular parece atuar diretamente reduzindo a síntese de óxido nítrico e reduzindo a resposta vasodilatadora, além de atuar como sinalizador e gerar hipertrofia da camada muscular dos vasos (Weber *et al.*, 2005). Nos rins o dano oxidativo induz uma constrição da arteríola aferente e uma ativação do aparelho justaglomerular, o que pode contribuir para a hipertensão, além de já ter sido relacionado a uma maior absorção tubular de sódio por levar à inativação dos receptores dopaminérgicos (Banday, Lau e Lokhandwala, 2008). No sistema nervoso central o dano oxidativo parece estar relacionado a alterações na regulação tanto central direta quanto na resposta simpática (Harrison e Gongora, 2009).

Dessa forma, percebemos que estudar o estresse oxidativo no envelhecimento não é apenas a procura de uma explicação do porquê envelhecemos, mas também um meio de compreender melhor como as doenças afetam um organismo idoso.

2.3 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E SAÚDE

O processo de envelhecimento da população humana é um fenômeno demográfico global, com a melhoria dos serviços de saúde e novas descobertas médicas, especialmente antibióticos e vacinas, teve início um processo conhecido como transição demográfica. Esse processo consiste em uma redução da taxa de natalidade e mortalidade, fazendo com que o número de indivíduos que nasce em uma população seja menor do que a população em idade ativa, gerando desta forma um envelhecimento populacional e alterando a pirâmide etária (FIGURA 5). No entanto, esse processo ocorreu em diferentes velocidades ao redor do mundo, iniciando no começo do século passado nos países desenvolvidos e mais recentemente nos países em desenvolvimento (Prata, 1992). No Brasil, o número de idosos (> 60 anos de idade) passou de três milhões em 1960 para sete milhões em 1975 e 14 milhões em 2002 (um aumento de 500% em quarenta anos) e estima-se que alcançará 32 milhões em 2020 (Lima-Costa e Veras, 2003).

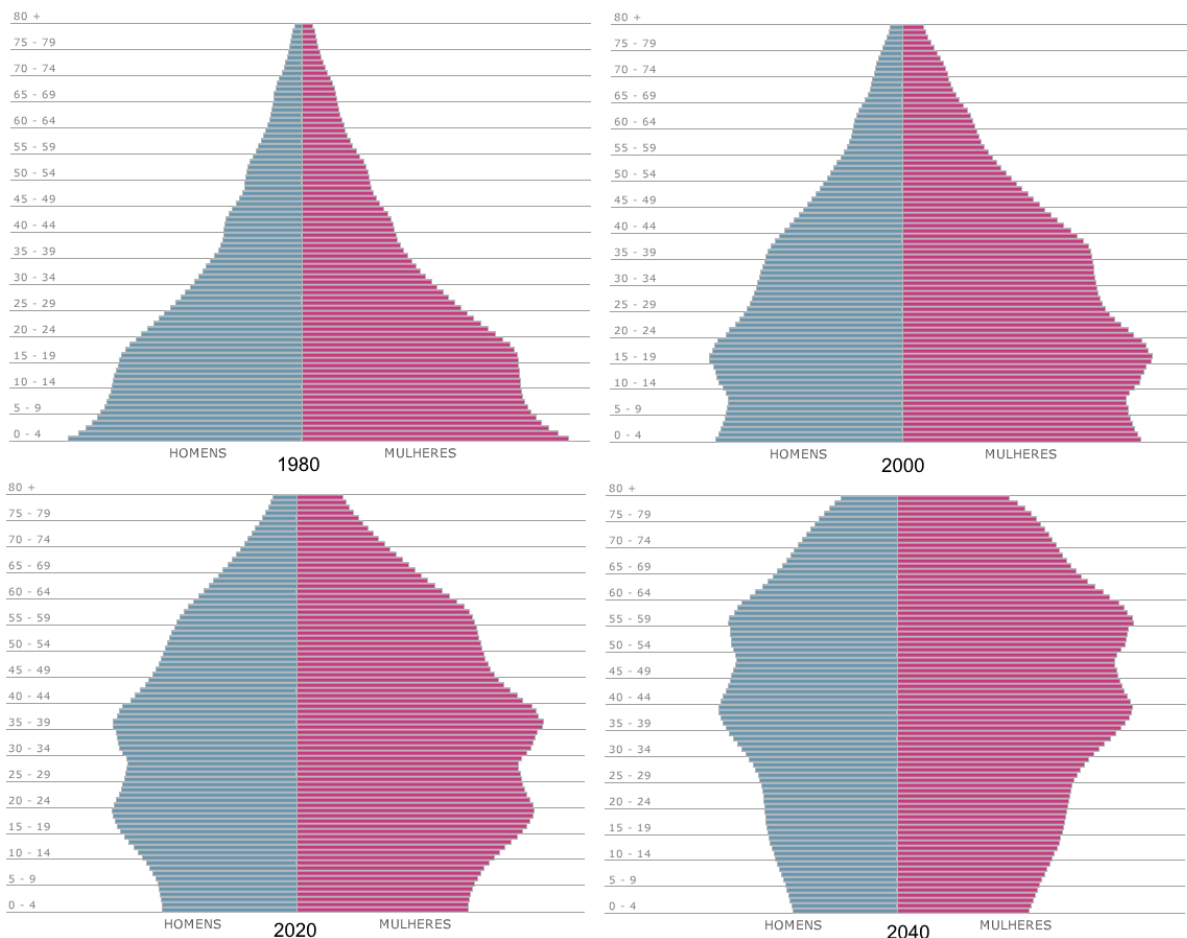


FIGURA 5: PIRÂMIDE ETÁRIA BRASILEIRA NOS ANOS DE 1980, 2000 E ESTIMATIVA PARA 2020 E 2040. FONTE: INSITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE)

Paralelo a esse fenômeno ocorre ainda uma mudança no processo de saúde-doença, no qual doenças infectocontagiosas tornam-se menos importantes e as doenças crônico-degenerativas tornam-se mais prevalentes (Prata, 1992).

Além disso, envelhecimento humano vem acompanhado de um desgaste físico funcional do corpo e da mente, bem como de uma diminuição das respostas fisiológicas às ações do meio. Isto acaba por alterar a qualidade de vida das pessoas em processo de envelhecimento.

Todas essas mudanças geram um grande aumento no custo das políticas públicas de saúde, motivo que leva o envelhecimento a ser um tema estudado cada vez mais profundamente (Wong e Carvalho, 2006). A partir destas informações várias estratégias no campo da prevenção e da terapêutica podem ser geradas para contemplar esta população. A compreensão do processo fisiológico do envelhecimento é, portanto, essencial para elaborar ações visando reduzir seus impactos na sociedade.

2.4 MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS SOBRE O ENVELHECIMENTO.

A fim de preservar o ser humano, o uso de modelos animais em experimentações vem sendo amplamente difundido desde o início do século XX e mesmo com a redução do seu emprego nas últimas duas décadas, estima-se que ainda sejam utilizados em torno de 12 milhões de animais por ano em pesquisas nos EUA (Van Zutphen, 2002). Quando falamos em pesquisas sobre envelhecimento e longevidade esse modelo torna-se ainda mais importante, pois assim conseguimos observar todo o ciclo de vida em um período mais curto de tempo e controlar a exposição ambiental durante toda a vida do animal.

Dentre os modelos animais que já foram utilizados o mais simples é o de moscas do gênero *Drosophila*, por possuírem um ciclo de vida extremamente curto e se reproduzirem rapidamente, no entanto, apresentam menor replicabilidade em seres humanos. Já o uso de primatas como modelo traz maior similaridade com humanos, mas, possuem um ciclo de vida extenso e os estudos precisam ser mais longos. Entre esses extremos temos o uso de roedores, que, por serem mamíferos, apresentam ciclo de vida estruturado de forma similar ao humano, mas muito mais curto (American Federation for Aging Research, 2011).

No entanto, um erro comumente cometido é tentar fazer uma relação direta entre a idade do animal com a de um ser humano, fazendo uma conta simples baseada na expectativa de vida para dizer quanto um ano da vida humana corresponderia para aquele animal. Essa correlação não é linear, uma vez que toda a fisiologia e o ciclo de vida são diferentes entre as espécies. Tomando como exemplo os ratos da raça Wistar em relação aos humanos, eles possuem, proporcionalmente, um período pré-puberal extremamente curto e um período reprodutivo longo (Sengupta, 2013).

Por este motivo, fórmulas foram propostas para realizar uma adaptação, realizando uma conta de equivalência para cada fase do ciclo de vida, como exemplificado na (Tabela 1) (Quinn, 2005).

TABELA 1: COMPARAÇÃO ENTRE 1 ANO DE VIDA HUMANO EM DIAS PARA CADA FASE DO CICLO DE VIDA ANIMAL.

Fase do Ciclo de Vida	Tempo de equivalência a 1 ano de vida humano
Período Neonatal	42,4 Dias
Período Pré Puberal	4,3 Dias
Adolescência	10,5 Dias
Idade Adulta	11,8 Dias
Senescência	17,1 Dias

FONTE: ADAPTADO DE SENGUPTA (2013)

Podemos considerar que um animal é idoso quando sua capacidade reprodutiva é reduzida, o que ocorre entre 15 e 20 meses para os animais da raça Wistar (Sengupta, 2013). A partir dessas informações desenhamos o modelo animal deste estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos deste estudo seguiram os preceitos éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências do *Canadian Concil on Animal Care*. Tendo todos os procedimentos sido verificados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o processo número 23075.031142/2013-73. Sendo este um projeto derivado do projeto previamente aprovado sob o numero XXX e intitulado: Análise Anatomo-Fisiológica do envelhecimento urogenital em ratos.

3.1 GRUPOS

Para o estudo, foram utilizados 72 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), do sexo masculino. Esses animais foram todos mantidos em gaiolas de polietileno com medidas de 60X50X22cm, distribuídos em 3 por gaiola. Foram submetidos a uma temperatura controlada em 22 graus Celsius, com um ciclo claro/escuro de 12 horas, com umidade do ar controlada e livre de ruídos externos. Receberam água filtrada e ração comercial padrão *ad libitum* durante todo o período do experimento.

Os animais foram divididos em 6 grupos de 12 animais cada e foram sacrificados em diferentes tempos de vida: o grupo 1 com 90 dias, grupo 2 com 180 dias, grupo 3 com 270 dias, grupo 4 com 360 dias, grupo 5 com 540 dias e grupo 6 com 720 dias.

3.2 EXPERIMENTAÇÃO

Os animais que seriam submetidos ao procedimento eram alocados em uma sala longe do sítio de experimentação, em um local calmo e sem ruídos externos, e então levados um a um em uma gaiola de transporte para o laboratório.

Na sala de experimentação era realizada pesagem em balança calibrada ultrassensível, medição com paquímetro digital e cálculo do Índice de Massa

Corpórea, por meio da fórmula: $\text{peso (em gramas) / estatura (em cm)}^2$. Então submetidos a anestesia com solução de Cloridrato de Cetamina (57,67mg/ml) associado a 2% de Cloridrato de Xilazina (2g), com aplicação de 1ml/1000 gramas de peso vivo, via intraperitoneal. Após anestesiados eram submetidos a uma esternotomia, realizada uma pequena incisão no átrio direito e sofriam eutanásia por meio de perfusão com soro fisiológico (solução de NaCl a 0,9%) resfriado a 0 grau (FIGURA 6).



FIGURA 6: FOTOGRAFIA DA PERFUSÃO COM SORO GELADO. FONTE: O AUTOR

Imediatamente após o procedimento de perfusão, o coração, ainda viável, foi retirado e congelado num freezer a -80°C .

Nesse momento também foi realizada a extração dos demais órgãos, como rins, testículos, fígado, cérebro e a artéria aorta, para uso em outros estudos.

Após descongelados, os tecidos coletados foram homogeneizados com tampão fosfo-salino (PBS) gelado e centrifugados a 12.000G durante 20 min a 4°C .

O sobrenadante foi alicotado em tubos de 2 ml para as análises propostas a seguir, que foram realizadas, em parceria, pela equipe do Laboratório de Toxicologia Celular do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

3.3 DOSAGEM DE GLUTATIONA E OUTROS TIÓIS

Um volume de 50 µl de solução de ácido tricloroacético (50%) foi adicionado a 200 µl do sobrenadante. Para o controle, utilizou-se 200 µl de PBS.

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 10 min a 4 °C. Em uma microplaca, 50 µl da amostra foram pipetados em triplicata, sendo em seguida adicionado tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9 e uma solução de 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) na concentração final de 2,5 mM. A placa foi mantida durante 5 minutos a 30 °C, e a absorbância foi medida a 415 nm para o cálculo do conteúdo de GSH por comparação com uma curva-padrão (Sedlak e Lindsay, 1968). Sua unidade de medida é esboçada na forma de *µmols de Tióis não proteicos/mg de proteína*.

3.4 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS

Para esta avaliação foi utilizado o Método Fox (Jiang, Woollard e Wolff, 1991; Jiang, Hunt e Wolff, 1992). O método baseia-se na rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 570 nm.

Nos tubos contendo 200 µl de amostra foi adicionado 800 µl de meio de reação [(laranja de xilenol a 100 µM, H_2SO_4 a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, $FeSO_4.NH_4$ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 µM (acrescentados, na sequência descrita, em metanol PA)].

Após incubação durante 20 min a 30 °C, as amostras foram centrifugadas novamente a 9000 g durante 10 min. Em seguida, adicionou-se 200 µl do sobrenadante a uma microplaca, procedendo-se a medida de absorbância a 570 nm.

Sua unidade de medida é esboçada na forma de *μmols de hidroperóxidos/mg de proteína*.

3.5 AVALIAÇÃO DE CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para esta análise foi utilizado o modelo previamente utilizado por Levine *et al* (1994) que baseia-se na reação de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com proteínas carboniladas, formando um complexo que pode ser detectado na faixa de absorção da luz entre 358nm e 370nm.

Inicialmente todas as amostras foram normalizadas para 2 mg.

Em cada tubo contendo 200 μl das amostras já normalizadas, foi adicionado um volume de 500 μl de DNPH [10mM de DNPH em 2M de Ácido Clorídrico (HCl)]. Para realizar o controle branco (que não absorve luz) a amostra foi adicionada a uma solução de HCl (2M, sem DNPH), sendo o conteúdo misturado em vortex e mantidas a 30°C por 1,5 h.

As proteínas foram precipitadas pela adição de 1 ml de ácido tricloroacético a 28 % e centrifugadas a 9000 g por 10 min. Os pellets de proteínas foram lavados duas vezes pela suspensão em etanol/etil acetado (1:1), misturados em vortex e centrifugados novamente. As proteínas foram então solubilizadas em 6 M de cloreto de guanidina e centrifugadas em 9000 g por 3 min para remover traços de material insolúvel. Em seguida 200 μl foram pipetados em microplaca e as carbonilas foram medidas espectrofotometricamente a 360 nm. Uma curva com padrão de albumina de soro bovino (BSA) em diferentes concentrações na presença ou não de DNPH foi usada, para comparação das análises.

Sua unidade de medida é esboçada na forma de *μmols de radicais carbonila/mg de proteína*.

3.6 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Para essa análise foi utilizado o método proposto por Crouch *et al* (1981). Esse método baseia-se na capacidade da Superóxido dismutase em inibir a redução do nitroazul de tetrazólio (NBT) para azul formazan pelo O_2^- gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo que a redução do NBT é medida espectrofotometricamente a 560 nm.

Após determinação da concentração de proteínas, as amostras foram normalizadas para $2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$. Em cada tubo contendo 200 μl das amostras já normalizadas, foi adicionado 50 μl de etanol. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 12 000 g (4°C) durante 20 min. Em seguida, foram pipetados 10 μl do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços. Como controle branco foram pipetados 10 μl de etanol a 25% em PBS. Em seguida adicionou-se em cada poço 20 μl de água deionizada. Após, foram adicionados 70 μl da amostra de solução de NBT $100\mu\text{M}$ com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) $0,05 \text{ mM}$, e 100 μl de solução de hidroxilamina ($36,85 \text{ mM}$) para iniciar a reação. A absorbância foi medida em 560 nm em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

Sua unidade de medida é esboçada na forma de *Unidades de atividade/mg de proteína*. Sendo que a Unidade de atividade é definida como a capacidade enzimática de inibir a redução do NBT em 50% em relação a curva de referência é obtida pelo seguinte calculo: $(|Absorbância \text{ final da curva de referência} - Absorbância \text{ Inicial da curva referência}|) / 2. (|Absorbância \text{ final da curva da amostra} - Absorbância \text{ Inicial da curva da amostra}|)$.

3.7 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

Para essa análise foi utilizado o método proposto por Aebi (1984). Esse método é baseado no decréscimo de absorbância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

Após determinação da concentração de proteínas, as amostras foram normalizadas para $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$. Em uma cubeta de quartzo, foram adicionados 990 μl do meio de reação constituído por 2,5 ml de Tampão Tris-HCl $1,0 \text{ M}$, EDTA $5,0 \text{ mM}$,

pH 8,0, 47,32 ml de água deionizada, e 180 µl de H₂O₂ (30%, d=1,1 g.ml⁻¹, MM = 34 g.mol⁻¹; concentração final 30 mM). Em seguida 10 µl da amostra foram adicionados a cubeta, e misturados por inversão, sendo imediatamente mensurada a absorbância a 240 nm (tempo total = 60 s, intervalos = 1 s) em espectrofotômetro de cubeta. Como branco foi utilizado somente o meio de reação.

Sua unidade de medida é esboçada na forma de *µmols de H₂O₂ degradado/mg de proteína*.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado como variável independente o tempo de vida do animal, e então os valores absolutos obtidos pela dosagem de Carbonilação proteica, peroxidação lipídica, tióis não proteicos e atividade de catalase e superóxido dismutase, utilizados como uma variável dependente.

Todos os valores obtidos foram plotados em planilha no programa Microsoft Excel 365 Home Edition, então submetidos a análise estatística por meio do programa SAS JMP Statistical Discover 10.0. Para a criação do gráfico dos pesos e altura dos animais foi utilizado o programa Graphpad Prism 5.03.

Inicialmente as variáveis dependentes foram submetidas a uma análise de padrão de normalidade, utilizando o teste estatístico de Shapiro-Wilks. As dosagens que não obtiveram um padrão de normalidade tiveram seus valores logaritmizados e submetidos novamente ao teste, uma vez que algumas amostras podem obter normalidade apenas quando expressas na forma de logaritmo.(Limpert e Stahel, 2011)

Para os valores que obtiveram um padrão de normalidade foi utilizado uma análise estatística utilizando o teste de Tukey-Kramer, para a comparação pareada entre os diferentes grupos de tempo.

Para os valores que não obtiveram um padrão de normalidade, foi realizado uma análise utilizando o teste pareado de Wilcoxon.

Para os valores de p obtidos foram considerados estatisticamente significantes os valores menores que 0,05.

Por último, foi realizado uma avaliação de correlação por meio do teste de correlação multivariável, sendo considerado significativa quando apresentou um resultado com valor $p < 0,05$ e um coeficiente de correlação $(r) > 0,5$.

4 RESULTADOS

4.1 ANIMAIS

Não houve perdas durante o estudo, sendo que no último grupo tínhamos 12 animais com 24 meses. Os animais do grupo mais velho aparentavam sinais claros de envelhecimento como rarefação de pelos e hipoatividade. Quanto ao peso e altura, os animais tiveram uma ascensão franca até 12 meses, seguido de uma discreta redução nos últimos grupos (Figura 7 A e B), o que levou a uma estabilidade no índice de massa corpórea (Figura 7 C).

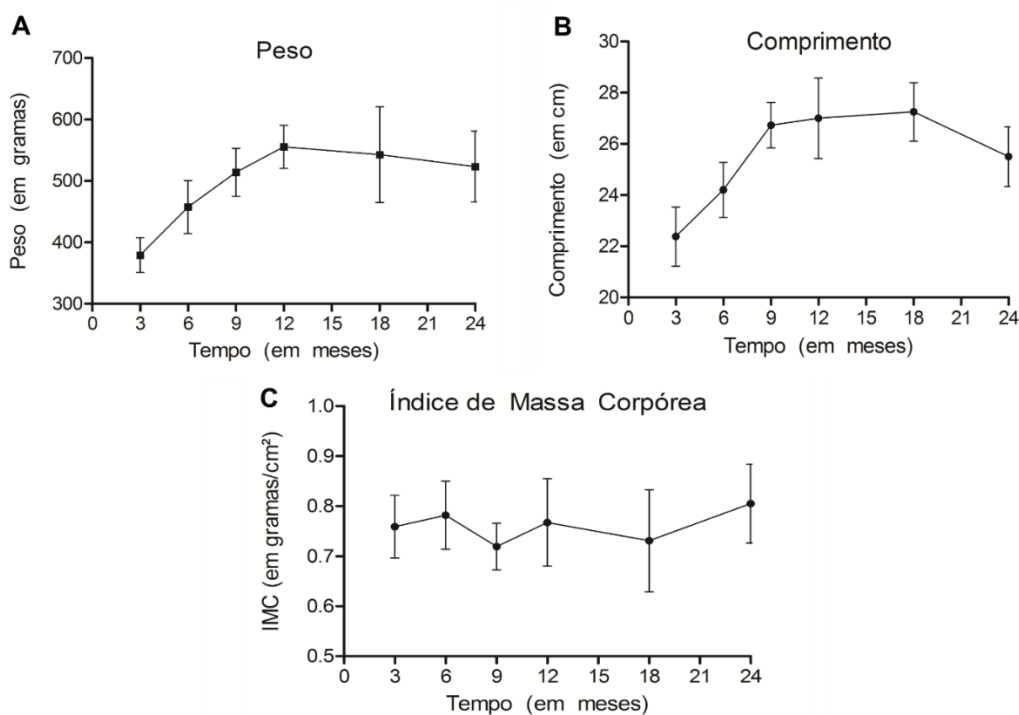


FIGURA 7: A) GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS PELO TEMPO. B) EVOLUÇÃO DO COMPRIMENTO DOS ANIMAIS (EM CM) PELO TEMPO. C) CURVA DO IMC ANIMAL PELO TEMPO.

4.2 TESTE DE NORMALIDADE E CORRELAÇÕES

Como não foi encontrado padrão normal para nenhuma das análises os dados foram logaritimizados e submetidos novamente ao teste. Foi encontrado um padrão de normalidade para o logaritmo dos valores de Peroxidação Lipídica, Tióis não proteicos, atividade de SOD e CAT. Não foi encontrado um padrão de normalidade para os valores de Carbonilação Proteica.

No teste de Pearson a única correlação com significância estatística e força de associação foi entre atividade de Catalase e Peroxidação lipídica, com um $p < 0,01$ mas um r de 0,51.

4.3 MARCADORES DE DANO OXIDATIVO.

A análise dos resultados para peroxidação lipídica por meio do teste pareado de Tukey não mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apenas em algumas análises isoladas, como quando comparamos apenas o grupo mais jovem com o mais velho, em que encontramos uma redução de aproximadamente 13%, com significância estatística (FIGURA 8-A).

A análise dos valores encontrados para carbonilação proteica revelou um crescimento progressivo até o grupo com 9 meses, mas sem significância estatística, seguido por um pico, com um crescimento de aproximadamente 50% do grupo 12 meses em relação ao grupo 9 meses, e por uma queda importante de quase 78% do grupo 18 meses em relação ao grupo 24 meses, ambos com relevância estatística (FIGURA 8-B).

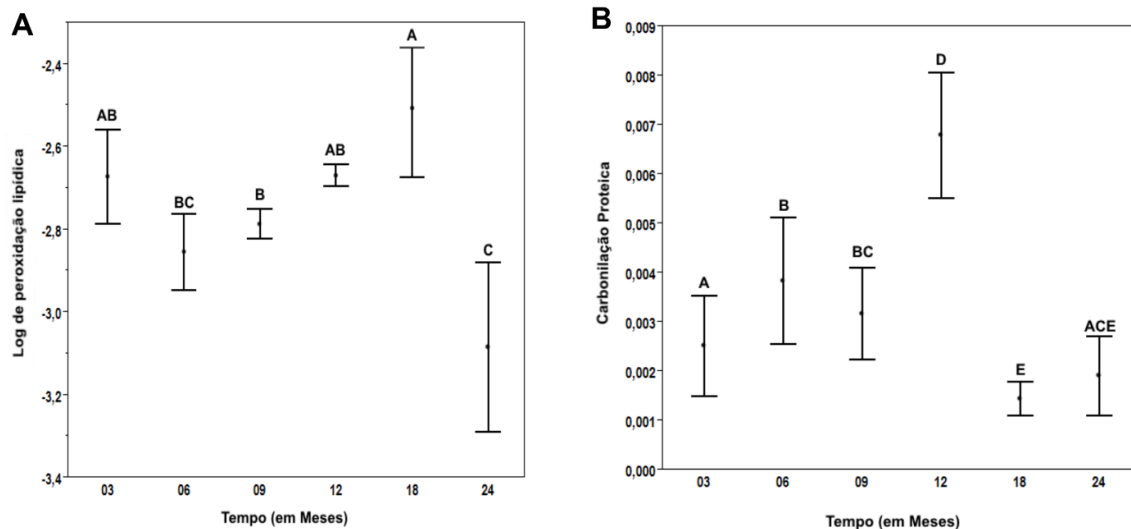


FIGURA 8: A) ANÁLISE DOS VALORES DO LOG DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (EM $\mu\text{MOLS DE HIDROPEROXIDOS/MG DE PROTEÍNA}$) PELO TEMPO. B) ANÁLISE DOS VALORES DE CARBONILAÇÃO PROTEICA PELO TEMPO (EM $\mu\text{MOLS DE CARBONILAS/MG DE PROTEÍNA}$). * VALORES QUE NÃO ESTÃO CONECTADOS PELA MESMA LETRA POSSUEM DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA, COM UM $P < 0,05$.

4.4 FATORES ANTI-OXIDANTES.

Para dosagem da atividade de Catalase e Superóxido Dismutase, a análise por meio do teste pareado de Tukey revelou, uma tendência de estabilidade dos valores durante a maior parte da vida do animal, sem diferença estatisticamente significativa nesses grupos, com uma queda importante entre os grupos 18 e 24 meses, de 34% para atividade da CAT e 21% para atividade da SOD, com significância estatística. (Figura 9 A e B).

Para a análise de Tióis não proteicos, encontramos uma ascensão no grupo de 12 meses de 21% em relação ao de 9 meses, com significância estatística e que manteve-se nos grupos seguintes, sem apresentar significância estatística entre os grupos 12,18 e 24 meses (Figura 9 - C).

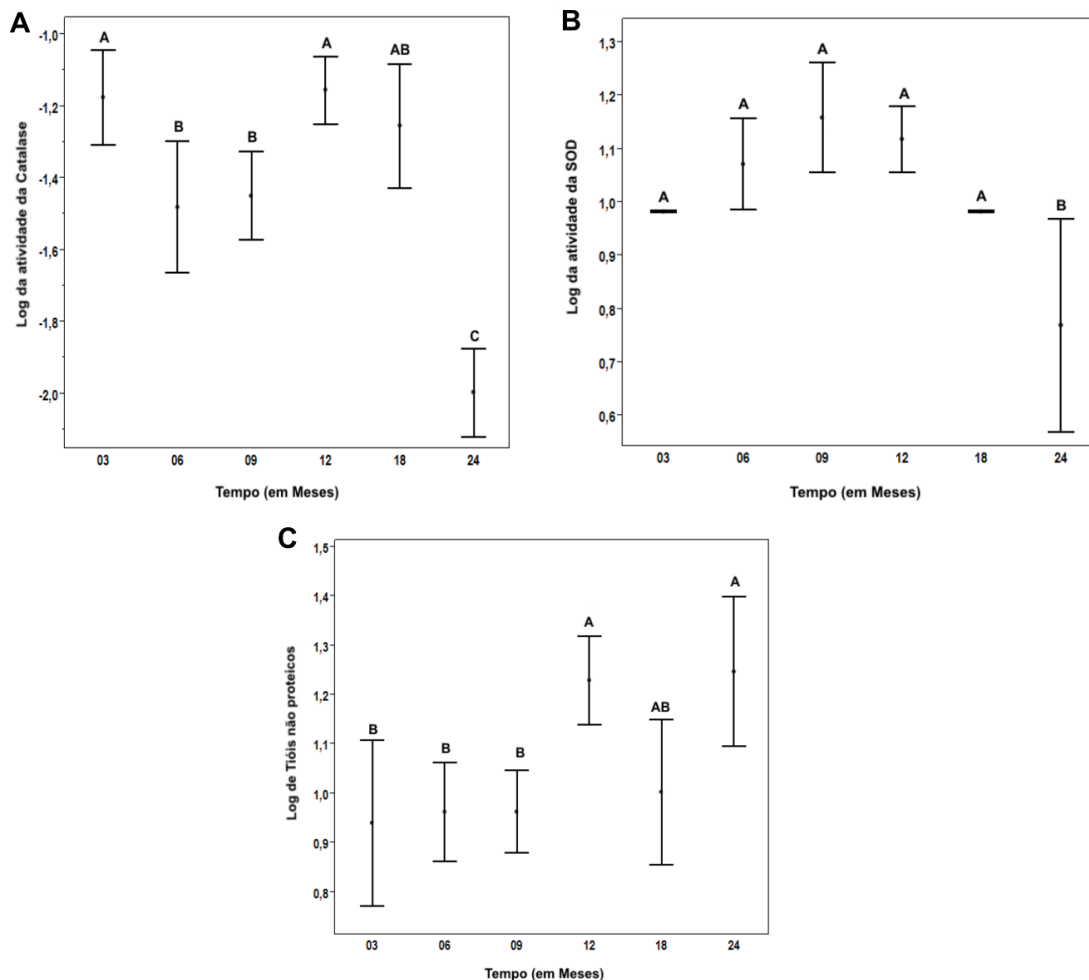


FIGURA 9) A) ANÁLISE DA ATIVIDADE DE CATALASE (EM $\mu\text{MOLS DE H}_2\text{O}_2$ DEGRADADO. MIN^{-1} /MG DE PROTEÍNA) PELO TEMPO. B) ANÁLISE DA ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (EM UNIDADES DE ATIVIDADE/MG DE PROTEÍNA) PELO TEMPO. C) ANÁLISE DOS VALORES DE TIÓIS NÃO PROTEICOS (EM $\mu\text{MOLS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS/MG DE PROTEÍNA}$) PELO TEMPO. * VALORES QUE NÃO ESTÃO CONECTADOS PELA MESMA LETRA POSSUEM DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA, COM UM $P < 0,05$.

A análise estatística e os valores absolutos obtidos para média e desvio padrão estão disponíveis na (TABELA 2).

TABELA 2: MÉDIA, DESVIO PADRÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS NO EXPERIMENTO

Log de Peroxidação Lipídica			
Tempo	Média pós Log	Desvio Padrão	Análise estatística*
3 meses	-2,6718	0,177886	AB
6 meses	-2,8542	0,145034	BC
9 meses	-2,7857	0,057664	B
12 meses	-2,6679	0,041507	AB
18 meses	-2,5054	0,261962	A
24 meses	-3,0828	0,322433	C
Log de Tióis não proteicos			
Tempo	Média pós Log	Desvio Padrão	Análise estatística*
3 meses	0,89864	0,231764	B
6 meses	0,96239	0,148812	B
9 meses	0,96310	0,131704	B
12 meses	1,22985	0,141068	A
18 meses	1,04113	0,247691	AB
24 meses	1,24783	0,225731	A
Log de Atividade de Catalase			
Tempo	Média pós Log	Desvio Padrão	Análise estatística*
3 meses	-1,1756	0,208082	A
6 meses	-1,4804	0,288764	B
9 meses	-1,4486	0,192308	B
12 meses	-1,1553	0,139034	A
18 meses	-1,3042	0,210972	AB
24 meses	-1,9969	0,192640	C
Log de Atividade de Superóxido Dismutase			
Tempo	Média pós Log	Desvio Padrão	Análise estatística*
3 meses	0,98323	0,001735	A
6 meses	1,07183	0,134508	A
9 meses	1,15918	0,161258	A

12 meses	1,11831	0,097757	A
18 meses	0,98318	0,001655	A
24 meses	0,77005	0,314862	B
Carbonilação Proteica			
Tempo	Média pós Log	Desvio Padrão	Análise estatística**
3 meses	0,002523813	0,00160804	A
6 meses	0,00384028	0,002023706	B
9 meses	0,0031744	0,001464544	BC
12 meses	0,006800574	0,002006254	D
18 meses	0,001451213	0,000552041	E
24 meses	0,001912907	0,001274212	ACE

FONTE: O AUTOR

NOTAS:*VALORES QUE NÃO ESTÃO CONECTADOS PELA MESMA LETRA APRESENTAM RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA, CONSIDERANDO-SE UM $P < 0,05$ POR MEIO DO TESTE DE TUKEY.
 **VALORES QUE NÃO ESTÃO CONECTADOS PELA MESMA LETRA APRESENTAM RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA, CONSIDERANDO-SE UM $P < 0,05$ POR MEIO DO TESTE DE WILCOXON

5. DISCUSSÃO

Os animais do último grupo chegaram ao término do estudo com 720 dias de vida, assim, com base no seu ciclo de vida, podemos considerá-los ratos idosos (Quinn, 2005). O desenvolvimento dos animais pelo seu peso foi considerado adequado em relação as curvas-padrão encontradas na literatura (Cossio-Bolaños *et al.*, 2013).

Na análise da peroxidação lipídica não foi possível encontrar um padrão claro de evolução. Quando realizamos uma análise mais simples e comparamos apenas o grupo mais jovem com o grupo mais velho, encontramos uma redução significativa desse marcador no grupo mais velho, com significância estatística. Sawada e Carlson (1987) e Cand e Verdeti (1989) realizaram estudos similares e encontraram uma tendência de redução, mas sem significância estatística, no entanto, utilizaram menos grupos e um menor número de animais por grupo. Farooqui, Day e Zamorano (1987) realizaram um estudo similar usando ratos Sprague-Dawley e encontraram uma tendência ascendente na peroxidação lipídica cardíaca, porém, sem significância estatística. Davydov e Shvets (2001) utilizaram um modelo experimental pra avaliar o impacto da imobilização na peroxidação lipídica do coração de ratos jovens e velhos, quando removemos o grupo submetido à imobilização nesse estudo e mantemos apenas os controles observamos que não foram encontradas diferenças. Nossos achados podem ser explicados pelo fato de o metabolismo cardíaco reduzir-se muito em idades avançadas, levando a um menor consumo miocárdico de oxigênio e menor produção de EROs, gerando menos dano oxidativo (Dyck e Sung, 2011).

Quando analisamos as curvas de carbonilação proteica, encontramos uma redução significativa nos grupos mais velhos. Esse fenômeno pode ser explicado pelo menor consumo miocárdico de oxigênio em idosos por uma redução da quantidade total de proteína que ocorre no coração durante o envelhecimento, onde cardiomiócitos são progressivamente substituídos por tecido fibroso (Aguila, Mandarin-De-Lacerda e Apfel, 1998).

Ao analisar as atividades de Superóxido Dismutase, Catalase e os níveis de Tióis não-proteicos, cujo principal representante é a glutathiona reduzida (GSH), notamos que os três principais fatores antioxidantes mantêm-se estáveis durante quase toda a vida do animal, exceto por uma redução significativa da atividade de

catalase e superóxido dismutase no grupo mais velho e uma discreta elevação de tióis não proteicos que se inicia no grupo 12 meses e mantém-se nos grupos 18 e 24 meses. Estudos prévios não encontraram diferenças nesses sistemas. Cand e Verdeti (1989) encontraram uma discreta elevação de CAT e uma redução de SOD e GSH no coração de ratos velhos, mas sem relevância estatística. Farooqui, Day e Zamorano (1987) estudaram apenas os níveis de GSH e encontrou uma tendência descendente, também sem significância estatística. Reiss e Gershon (1976) realizaram um estudo apenas analisando a atividade da SOD no coração de ratos e camundongos e também não encontraram significância estatística. Apesar de a análise de correlação não mostrar a existência de uma relação linear entre os fatores antioxidantes, podemos inferir que o que ocorreu foi uma elevação dos Tióis não-proteicos para compensar a queda de SOD e CAT, essa ideia é corroborada quando vemos que mesmo com a redução em duas das principais vias antioxidantes não ocorreu aumento dos marcadores de dano oxidativo (LPO e PCO) no grupo mais velho, inclusive com uma redução destes.

Percebendo que os ratos Wistar apresentam redução na atividade em duas das três principais vias de combate ao estresse oxidativo e extrapolando esse achado para os humanos podemos elaborar mais uma hipótese para auxiliar a compreensão do porquê doenças relacionadas ao dano oxidativo serem mais prevalentes em indivíduos idosos. Sabemos que a doença coronariana e a insuficiência cardíaca são as duas doenças do aparelho cardiovascular mais relacionadas com o dano oxidativo e possuem fatores de risco em comum (Dhalla, Temsah e Netticadan, 2000; Grieve e Shah, 2003; Vassalle *et al.*, 2004). Dentre esses fatores os mais frequentes são o diabetes e o tabagismo. Em 2011 Sekhar *et al* demonstrou que indivíduos diabéticos possuem uma deficiência na síntese de glutathione (Sekhar *et al.*, 2011). O tabagismo também já foi relacionado com uma redução dos níveis séricos de glutathione, além de aumentar marcadores diretos de dano oxidativo (Solak *et al.*, 2005). Assim sendo, esses fatores de risco afetariam a única das principais vias que estaria preservada no indivíduo idoso. Esses dados tornam-se mais relevantes quando analisamos os resultados de Kedziora-Kornatowska *et al* (2004), que encontrou em indivíduos idosos e hipertensos uma redução na atividade da SOD e CAT e um aumento na atividade da via da glutathione.

Apesar da compreensão de que o processo de saúde e doença no indivíduo idoso é complexo e multifatorial, esses achados nos ajudam entender um pouco sobre como o dano oxidativo pode agir durante o envelhecimento. No entanto, não podemos afirmar que ele seja a causa do envelhecimento celular.

6.CONCLUSÃO

1. Ocorre uma redução na peroxidação lipídica cardíaca do grupo mais idoso, o que pode ser explicado por um menor consumo miocárdio de oxigênio na idade avançada. Também ocorre uma redução importante nos níveis de carbonilação proteica que estaria relacionada a perda da massa miocárdica no envelhecimento.
2. Há uma redução significativa na atividade de SOD e CAT em relação aos grupos jovens com um discreto aumento nos níveis de tióis não proteicos nos grupos mais velhos.
3. Não é possível relacionar diretamente o estresse oxidativo como causa do processo fisiológico de envelhecimento cardíaco.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. D. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 749-756, 2008. ISSN 1415-5273.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> >.

AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; APFEL, M. I. [Stereology of the myocardium in young and aged rats]. **Arq Bras Cardiol**, v. 70, n. 2, p. 105-9, Feb 1998. ISSN 0066-782X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659717> >.

AMERICAN FEDERATION FOR AGING RESEARCH. Infoaging Guide to Animal Models in Aging Research. <http://www.afar.org/infoaging/biology-of-aging/animal-models/>, 2011.

BABUSIKOVA, E. *et al.* Oxidative alternations in rat heart homogenate and mitochondria during ageing. **Gen Physiol Biophys**, v. 27, n. 2, p. 115-20, Jun 2008. ISSN 0231-5882. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645226> >.

BANDAY, A. A.; LAU, Y. S.; LOKHANDWALA, M. F. Oxidative stress causes renal dopamine D1 receptor dysfunction and salt-sensitive hypertension in Sprague-Dawley rats. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 367-75, Feb 2008. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18158345> >.

BOLLI, R. *et al.* Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 12, p. 4695-9, Jun 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2543984> >.

CAND, F.; VERDETTI, J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. **Free Radic Biol Med**, v. 7, n. 1, p. 59-63, 1989. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2753396> >.

COSSIO-BOLAÑOS, M. *et al.* [Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats]. **Nutr Hosp**, v. 28, n. 6, p. 2151-6, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 1699-5198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506395> >.

CROUCH, R. K. *et al.* The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235-41, Mar 1981. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6451462> >.

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **J Signal Transduct**, v. 2012, p. 646354, 2012. ISSN 2090-1747. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21977319> >.

DAVIDOVIC, M. *et al.* Old age as a privilege of the "selfish ones". **Aging Dis**, v. 1, n. 2, p. 139-46, Oct 2010. ISSN 2152-5250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396861> >.

DAVYDOV, V. V.; SHVETS, V. N. Lipid peroxidation in the heart of adult and old rats during immobilization stress. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 7, p. 1155-60, Jul 2001. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404056> >.

DEVASAGAYAM, T. P. *et al.* Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **J Assoc Physicians India**, v. 52, p. 794-804, Oct 2004. ISSN 0004-5772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15909857> >.

DHALLA, A. K.; HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 28, n. 2, p. 506-14, Aug 1996. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8800132> >.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J Hypertens**, v. 18, n. 6, p. 655-73, Jun 2000. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872549> >.

DYCK, J. R. B.; SUNG, M. M. Y. **Energy metabolism in the aging heart**. *Heart Metab.* 52: 3-7 p. 2011.

FAROOQUI, M. Y.; DAY, W. W.; ZAMORANO, D. M. Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. **Comp Biochem Physiol B**, v. 88, n. 1, p. 177-80, 1987. ISSN 0305-0491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3677596> >.

FERRARI, R. *et al.* Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart. **Circulation**, v. 81, n. 1, p. 201-11, Jan 1990. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2297827> >.

GARINIS, G. A. *et al.* DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 11, p. 1241-7, Nov 2008. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978832> >.

GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **J Clin Invest**, v. 115, n. 3, p. 500-8, Mar 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15765131> >.

GRIEVE, D. J.; SHAH, A. M. Oxidative stress in heart failure. More than just damage. **Eur Heart J**, v. 24, n. 24, p. 2161-3, Dec 2003. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14659766> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. Oxford University Press, 2007.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298-300, Jul 1956. ISSN 0022-1422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13332224> >.

HARRISON, D. *et al.* Role of oxidative stress in atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 3, Supplement, p. 7-11, 2/6/ 2003. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002914902031442> >.

HARRISON, D. G.; GONGORA, M. C. Oxidative stress and hypertension. **Med Clin North Am**, v. 93, n. 3, p. 621-35, May 2009. ISSN 1557-9859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427495> >.

HAYFLICK, L. How and why we age. **Exp Gerontol**, v. 33, n. 7-8, p. 639-53, 1998 Nov-Dec 1998. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9951612> >.

HAZELTON, G. A.; LANG, C. A. Glutathione contents of tissues in the aging mouse. **Biochem J**, v. 188, n. 1, p. 25-30, Apr 1980. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7406884> >.

JENNER, P.; OLANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, n. 6 Suppl 3, p. S161-70, Dec 1996. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8959985> >.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal Biochem**, v. 202, n. 2, p. 384-9, May 1992. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1519766> >.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-6, Oct 1991. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1795606> >.

JIN, K. Modern Biological Theories of Aging. **Aging Dis**, v. 1, n. 2, p. 72-74, Oct 2010. ISSN 2152-5250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21132086> >.

KEDZIORA-KORNATOWSKA, K. *et al.* The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. **Cell Mol Biol Lett**, v. 9, n. 4A, p. 635-41, 2004. ISSN 1425-8153. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647786> >.

LAKATTA, E. G.; SOLLOTT, S. J. Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 132, n. 4, p. 699-721, Aug 2002. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095857> >.

LEVINE, R. L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-57, 1994. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015469> >.

LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. Saúde pública e envelhecimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 700-701, 2003. ISSN 0102-311X.

LIMPERT, E.; STAHEL, W. A. Problems with using the normal distribution--and ways to improve quality and efficiency of data analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21403, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779325> >.

LOCATELLI, F. *et al.* Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 7, p. 1272-80, Jul 2003. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808161> >.

MARKESBERY, W. R. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 1, p. 134-147, // 1997. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584996006296> >.

MOLINA, H.; GARCÍA, M. Enzymatic defenses of the rat heart against lipid peroxidation. **Mech Ageing Dev**, v. 97, n. 1, p. 1-7, Jul 1997. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223121> >.

MURPHY, S. L.; XU, J.; KOCHANNEK, K. D. **Deaths: Final Data for 2010.** STATISTICS., N. C. F. H. National Vital Statistics Reports: National Center for Health Statistics. 61 2013.

NAKAMURA, K. *et al.* Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. **Circulation**, v. 98, n. 8, p. 794-9, Aug 1998. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727550> >.

NAKAZONO, K. *et al.* Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 22, p. 10045-8, Nov 1991. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1658794> >.

NÚÑEZ, M. E.; HALL, D. B.; BARTON, J. K. Long-range oxidative damage to DNA: Effects of distance and sequence. **Chemistry & Biology**, v. 6, n. 2, p. 85-97, 2// 1999. ISSN 1074-5521. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552199800052> >.

PRATA, P. R. A transição epidemiológica no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 8, p. 168-175, 1992. ISSN 0102-311X.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-7, Jun 2005. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925305> >.

RAHMAN, I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. **Treat Respir Med**, v. 4, n. 3, p. 175-200, 2005. ISSN 1176-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987234> >.

REISS, U.; GERSHON, D. Comparison of cytoplasmic superoxide dismutase in liver, heart and brain of aging rats and mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 73, n. 2, p. 255-62, Nov 1976. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/826252> >.

RIKANS, L. E.; HORN BROOK, K. R. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. **Biochim Biophys Acta**, v. 1362, n. 2-3, p. 116-27, Dec 1997. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9540842> >.

ROZEMULLER, A. J.; VAN GOOL, W. A.; EIKELBOOM, P. The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 4, n. 3, p. 223-33, Jun 2005. ISSN 1568-007X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975026> >.

SAWADA, M.; CARLSON, J. C. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. **Mech Ageing Dev**, v. 41, n. 1-2, p. 125-37, Nov 1987. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2828774> >.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, Oct 1968. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4973948> >.

SEKHAR, R. V. *et al.* Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. 162-7, Jan 2011. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20929994> >.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **Int J Prev Med**, v. 4, n. 6, p. 624-30, Jun 2013. ISSN 2008-7802. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930179> >.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v. 82, n. 2, p. 291-5, Mar 1997. ISSN 0958-0670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129943> >.

SINGAL, P. K. *et al.* The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. **Cardiovasc Res**, v. 40, n. 3, p. 426-32, Dec 1998. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070480> >.

SOLAK, Z. A. *et al.* Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. **Clin Exp Med**, v. 5, n. 3, p. 99-105, Oct 2005. ISSN 1591-8890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284731> >.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Free Radic Res**, v. 40, n. 12, p. 1250-8, Dec 2006. ISSN 1071-5762. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17090414> >.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1381-478, Oct 2004. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383655> >.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 3, p. 323-5, Mar 2010. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19743917> >.

VAN HEEMST, D. Insulin, IGF-1 and longevity. **Aging Dis**, v. 1, n. 2, p. 147-57, Oct 2010. ISSN 2152-5250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396862> >.

VAN ZUTPHEN, L. F. Use of animals in research: a science - society controversy? The European perspective. **ALTEX**, v. 19, n. 3, p. 140-4, 2002. ISSN 1868-596X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165817> >.

VASSALLE, C. *et al.* Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors. **J Intern Med**, v. 256, n. 4, p. 308-15, Oct 2004. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367173> >.

VICHOVA, T.; MOTOVSKA, Z. Oxidative stress: Predictive marker for coronary artery disease. **Exp Clin Cardiol**, v. 18, n. 2, p. e88-91, 2013. ISSN 1205-6626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940453> >.

VON HARSDORF, R.; LI, P. F.; DIETZ, R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. **Circulation**, v. 99, n. 22, p. 2934-41, Jun 1999. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359739> >.

WEBER, D. S. *et al.* Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 1, p. H37-42, Jan 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345488> >.

WONG, L. L. R.; CARVALHO, J. A. O rápido processo de envelhecimento populacional do Brasil: sérios desafios para as políticas públicas. **Revista Brasileira de Estudos de População**, v. 23, p. 5-26, 2006. ISSN 0102-3098.

APENDICES

APENDICE I – Resultados Brutos.

N°	Tempo (em Meses)	LPO	PCO	Tióis Não Proteicos	Atividade da SOD	Atividade da CAT
1	3	0,00159	0,00701	9,23101	9,65993	0,08514
2	3	0,00096	0,00122	5,96870	9,64114	0,06613
3	3	0,00215	0,00363	10,41948	9,62177	0,12583
4	3	0,00125	0,00139	4,58631	9,61408	0,05376
5	3	0,00158	0,00123	6,09867	9,59971	0,05346
6	3	0,00287	0,00216	12,09332	9,55042	0,10513
7	3	0,00358	0,00276	13,89328	9,57019	0,10335
8	3	0,00268	0,00297	2,50740	9,61894	0,02838
9	3	0,00214	0,00121	6,91211	9,64193	0,02955
10	3	0,00325	0,00219	25,02321	9,60348	0,05752
11	3	0,00318	0,00239	12,27937	9,64074	0,09653
12	3	0,00220	0,00213	13,36456	9,69256	0,07594
13	6	0,00163	0,00470	8,06846	11,49055	0,03503
14	6	0,00179	0,00727	23,33431	16,69702	0,08360
15	6	0,00117	0,00433	18,43759	18,40524	0,05198
16	6	0,00241	0,00704	13,65175	14,35371	0,08938
17	6	0,00196	0,00228	8,78015	13,44718	0,02720
18	6	0,00130	0,00239	8,77385	11,23599	0,03652
19	6	0,00192	0,00200	7,35640	12,41010	0,03902
20	6	0,00138	0,00334	9,90126	12,56195	0,04210
21	6	0,00086	0,00144	6,86528	10,68012	0,01106
22	6	0,00128	0,00609	12,36291	12,71589	0,03551
23	6	0,00115	0,00272	6,51267	7,31538	0,01415
24	6	0,00080	0,00249	6,12308	6,13465	0,01393
25	9	0,00190	0,00461	10,94917	10,57969	0,04578
26	9	0,00174	0,00064	11,62271	12,69377	0,04349
27	9	0,00178	0,00126	8,72892	14,78097	0,02900
28	9	0,00192	0,00370	12,33999	19,31635	0,05652
29	9	0,00177	0,00295	6,93345	16,77369	0,01858
30	9	0,00160	0,00522	9,19168	21,03395	0,04196
31	9	0,00145	0,00374	6,05898	18,84468	0,01800
32	9	0,00141	0,00324	12,65841	26,41641	0,03100
33	9	0,00190	0,00422	8,66044	12,43167	0,05300
34	9	0,00154	0,00459	14,62346	14,58492	0,07410
35	9	0,00152	0,00250	7,30806	9,47076	0,03049
36	9	0,00128	0,00142	5,81777	7,03069	0,02436
37	12	0,00232	0,00454	9,78134	13,00740	0,24109
38	12	0,00214	0,00481	16,46695	14,80734	0,06492
39	12	0,00223	0,00792	23,27327	14,32829	0,10534
40	12	0,00210	0,00817	26,29901	16,48466	0,07450
41	12	0,00199	0,00514	14,93022	15,47158	0,06249

42	12	0,00223	0,00855	16,93376	15,31939	0,04924
43	12	0,00181	0,00465	12,15548	15,75304	0,04223
44	12	0,00211	0,00534	14,99850	14,76780	0,06557
45	12	0,00193	0,00525	12,05031	7,64975	0,05596
46	12	0,00250	0,00951	21,48108	11,89432	0,09658
47	12	0,00206	0,00808	17,44757	11,13010	0,06905
48	12	0,00247	0,00965	27,92006	10,34614	0,12084
49	18	0,00524	0,00115	14,82805	9,69334	0,04898
50	18	0,00258	0,00044	15,93816	9,66076	0,01918
51	18	0,00143	0,00086	4,47294	9,56063	0,04303
52	18	0,00365	0,00151	6,03642	9,58689	0,07120
53	18	0,00223	0,00134	15,09744	9,59451	0,05295
54	18	0,00415	0,00114	6,63907	9,61423	0,03194
55	18	0,00713	0,00231	29,17637	9,61653	0,17365
56	18	0,00110	0,00109	5,03048	9,62515	0,03464
57	18	0,00247	0,00207	13,79173	9,58207	0,07914
58	18	0,00258	0,00206	10,69554	9,62760	0,07731
59	18	0,00310	0,00167	13,63016	9,63157	0,08794
60	18	0,00852	0,00177	16,50734	9,64818	0,81498
61	24	0,00045	0,00498	20,07020	0,82709	0,00722
62	24	0,00034	0,00177	7,36950	13,03385	0,00837
63	24	0,00049	0,00098	9,64326	11,66433	0,00660
64	24	0,00029	0,00222	11,40506	8,29051	0,00708
65	24	0,00080	0,00104	26,63754	4,26040	0,02029
66	24	0,00106	0,00254	21,89272	10,60329	0,01494
67	24	0,00262	0,00163	95,15202	7,43595	0,00894
68	24	0,00052	0,00337	20,58070	6,36894	0,01402
69	24	0,00236	0,00147	42,04632	5,47141	0,01226
70	24	0,00165	0,00067	24,72084	6,10125	0,00478
71	24	0,00146	0,00190	22,98279	6,16312	0,01819
72	24	0,00071	0,00038	11,41227	3,79285	0,00952

ANEXOS

Anexo I – Aprovação na comissão de ética no uso de animais



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 732

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

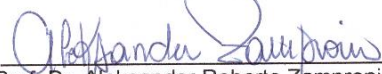
PROCESSO: 23075.031142/2013-73

APROVADO: 25/09/2013 – R.O. 08/2013

TÍTULO: Avaliação anatomo-fisiológica do envelhecimento cardiovascular: estudo experimental com ratos

AUTORES: Ronaldo da Rocha Loures Bueno, Gustavo Lenci Marques, Rogério de Fraga, Djanira Aparecida da Luz Veronez, Miguel Ibraim Abboud Hanna Sobrinho

DEPARTAMENTO: Clínica Médica (Setor de Ciências da Saúde, UFPR)


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA