

**FERNANDO HENRIQUE DE PAULA UZUELLI**

**METABOLISMO DE RADICAIS LIVRES DURANTE O CICLO ESTRAL DE  
RATAS**

BRASÍLIA

2006

**FERNANDO HENRIQUE DE PAULA UZUELLI**

**METABOLISMO DE RADICAIS LIVRES DURANTE O CICLO ESTRAL DE  
RATAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do Grau de Mestre em Ciências da  
Saúde pela Faculdade de Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.

Orientador

Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima

IB – UnB

BRASÍLIA – DF

2006

**FERNANDO HENRIQUE DE PAULA UZUELLI**

**METABOLISMO DE RADICAIS LIVRES DURANTE O CICLO ESTRAL DE  
RATAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do Grau de Mestre em Ciências da  
Saúde pela Faculdade de Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.

Orientador

Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima

IB – UnB

Brasília, 30 de maio de 2006.

**Banca Examinadora**

**PROF. DR. MARCELO HERMES-LIMA**

**IB – UnB**

**PROF<sup>A</sup> DR<sup>A</sup> LUCÍLIA DOMINGUES CASULARI DA MOTTA**

**FM – UnB**

**PROF<sup>A</sup> DR<sup>A</sup> ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA**

**IB – UnB**

**PROF<sup>A</sup> DR<sup>A</sup> SANDRA FERNANDES ARRUDA**

**IB – UnB**

## AGRADECIMENTOS

---

A conclusão desse trabalho foi o resultado de sete longos anos de pesquisa científica, envolvendo a participação de um grande número de pessoas.

Professor Doutor Marcelo Hermes Lima, como orientador e apoiador técnico científico, participou de minha formação científica de maneira ativa e cuja produção técnico-científica demonstra tamanha exigência e rigor nas solicitações que recebi.

Professora Lucília, colaboradora e orientadora na concepção desse projeto, no árduo trabalho da leitura das lâminas e na realização das correlações entre os achados e as variações hormonais.

Ricardo Gonçalves Oliveira, grande amigo e parceiro científico, foi colaborador na dura e laboriosa busca dos resultados.

Professora Doutora Gabriela Ramos, Professor Doutor Marcus Vinicius Ferreira, Valéria Patrícia Araújo, Daniel Prado Machado, e tantos outros colegas do Grupo de Pesquisa de Radicais de Oxigênio que participaram com apoio técnico e solidariedade diante dos resultados inesperados.

A Deus, princípio e fim de todas as coisas.

A meus pais e irmãos, que são a base do meu caráter e do meu desejo de ser excelente.

A minha esposa Alessandra, que pacientemente renunciou a muitas horas de nosso convívio para que eu pudesse estar diante da Banca Examinadora.

Finalizo, dirigindo-me, em especial, àqueles que deram razão para que projetos como esse sejam por nós abraçados e executados com entusiasmo e êxito.

A todos vocês, meu muito obrigado e os meus mais sinceros agradecimentos.

## EPÍGRAFE

---

**וּאתָה דַּנְיָאֵל סַתֵּם הַדְּבָרִים וְחַתַּם הַסֵּפֶר עַד עֵת קֵץ יִשְׁטְטוּ רַבִּים**

**תַּעֲדָה הַבְּרִית**

**Tu, porém, Daniel, encerra as palavras e sela o livro, até ao tempo do fim; muitos o esquadrinharão, e o saber se multiplicará. Daniel 12:4**

## RESUMO

---

As variações hormonais durante o ciclo estral trazem modificações morfológicas e funcionais em diferentes órgãos envolvidos no processo reprodutivo, dentre eles o ovário, a adrenal e o útero. A variação de hormônios como o estrogênio ( $E_2$ ) e o hormônio luteinizante (LH), que exercem influência sobre o metabolismo dos radicais livres, demonstram que essas espécies químicas também participam das alterações do ciclo reprodutivo. Assim, nossa investigação procurou identificar alterações no metabolismo dos radicais livres durante o ciclo estral. Utilizando ratas, como modelo experimental para o estudo do ciclo reprodutivo, realizou-se citologia vaginal diária para determinar-se a regularidade e a fase do ciclo em que cada animal se encontrava. Vinte e um dias após o início da análise citológica diária, os animais foram sacrificados e alocados em cada uma das 4 (quatro) fases do ciclo, constituindo-se quatro grupos: proestro (PE), estro (E), diestro I (D I), e diestro II (D II). No útero, ovário e adrenal, foram dosados os danos oxidativos em lipídios pelo método TBARS e alaranjado de xilenol, danos oxidativos em proteínas pelo método de proteína carbonilada, dosagem do antioxidante endógeno glutathiona (GSHeq) e da atividade de três enzimas antioxidantes GR, GPx e GST. Nossos resultados, em útero, demonstram um aumento de dano oxidativo em lipídeos e proteína no D II, o que foi acompanhado por um aumento dos níveis de GSHeq e da atividade da GST. No ovário verificou-se um aumento dos níveis de peroxidação lipídica no E, do dano oxidativo em proteínas no D II, juntamente com uma redução na relação GSHeq/GSSG e um aumento da atividade de GPx. Na adrenal não foram observadas mudanças ao longo do ciclo nos níveis de peroxidação lipídica e proteínas carboniladas, mas encontrou-se uma redução na relação GSHeq/GSSG na fase do diestro I. Os resultados obtidos mostram a presença de estresse oxidativo no útero nas fases do D I e D II, o que parece provocar no órgão uma resposta com o aumento da atividade de GST e GSHeq. Esse estresse oxidativo poderia estar relacionado às alterações inflamatórias que ocorrem no endométrio, nesse momento do ciclo estral. A peroxidação lipídica do ovário no estro mostra um dano oxidativo que pode ocorrer em membranas, o que poderia conduzir à ruptura folicular e à presença de estresse oxidativo, nas fases do diestro I e II representado pelos resultados de proteína carbonilada e pelos níveis de glutathiona que poderiam estar

associados ao fenômeno da luteólise. Na adrenal, a observação de estresse oxidativo ocorreu no D I. Assim, o aumento do estresse oxidativo no ovário, útero e adrenal parece ter um papel fisiológico junto a esses órgãos, nas fases do diestro I e II.

**Palavras-chave:** Ciclo estral, radicais livres, útero, ovário, adrenal.

## ABSTRACT

---

The hormones variations during the estral cycle bring morphologic and functional variations to different involved organs in the reproductive process, among them ovary, adrenal and uterus. The hormone variation as the  $E_2$  and the LH, that exert influence on the metabolism of the free radicals, also demonstrates that to these chemical species participation of the alterations of the reproductive cycle. Using rats as experimental models for the study of the reproductive cycle, daily vaginal smears was become fulfilled to determine its regularity and the phase of the cycle in each animal if it found, being sacrificed after 21 days, taking the ovary, uterus and adrenal, after the samples were divided in four groups according to the phase where the animals at the moment of the sacrifice met. The oxidative damage in uterus was quantified by the TBARs method and xylenol orange, carbonyl protein and the levels of the endogenous glutathione. Three enzymes of antioxidant system had activities determined by GR, GPx and GST in the three different tissues, adrenal, ovary and uterus. Our results demonstrate that to have an increase of oxidative damage in lipids and proteins in Diestro II, followed for an increase of the levels of GSHeq and the activity of the GST. In the ovary it exists together with an increase of the levels of lipid peroxidation in the Estrus and an increase of the oxidativo damage in proteins in diestro II with a reduction in the GSHeq/GSSG relation and an increase of the activity of GPx. In the adrenal changes throughout the cycle in the levels of lipid peroxidation and proteins it was observed a reduction in the relation of GSHeq/GSSG met in the phase of diestro I. The numbers show the presence of oxidative stress in the uterus in the second half of the reproductive cycle, which seems to provoke in the organ a reply with the increase in the activity of GST and the GSHeq levels, this oxidative stress could be related with the inflammatory alterations that occurs in the endometrium at this moment of the estrous cycle. In the ovary the lipid peroxidation in estrus shows an oxidative damage that can occur in membranes that could lead to a follicular rupture, and the presence of oxidative stress in the diestro I and II represented for the carbonyl protein results and the levels of glutathiona could be associated to the phenomenon of luteolise. In the adrenal occurs a oxidative stress in diestro I. Thus an increase of oxidative stress in the ovary, uterus and adrenal seems to have a physiological paper next to these organs.



**Key words:** Estrous cycle, free radicals, uterus, ovary, adrenal.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

---

**·OH** – Radical hidroxil

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Radical superóxido

**ACTH** – Hormônio adrenocorticotrófico

**ATP** – Adenosina trifosfato

**c-AMP** – Adenosina Mono Fosfato cíclico.

**DHEA** – Dihidroepiandrosterona

**DHLA** – ácido diidrolipóico

**DI** – Diestro I ou metaestro

**DII** – Diestro II

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico.

**DTNB** - Ácido 5,5' ditio-bis(2-nitrobenzóico)

**E** – Estro

**E<sub>2</sub> - 17 - β** – estradiol

**EDTA** – Ácido etileno diamino tetra acético.

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio.

**ERNs** – Espécies reativas de nitrogênio.

**FSH** – Hormônio folículo estimulante

**G6PDH** – Glicose-6-fosfodesidrogenase

**GnRH** – Hormônio liberador de gonadotrofina

**GPx** – Enzima glutationa peroxidase

**GR** – Enzima glutationa redutase.

**GSH** – Tripeptídeo glutationa ou reduzida.

**GSheq** – Glutationa equivalente a soma do total de glutaiona reduzida mais oxidada.

**GSSG** – Hexapeptídeo glutationa reduzida.

**GST** – Glutationa – S – transferase.

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**LH** – Hormônio luteinizante

**MDA** - Malonaldeído

**NADPH** – Nicotinamida dinucleotídeo fosfato hidrogenado

**NF-KB** – Fator de necrose kappa B.

**PE** – Pró – estro

**PGE<sub>2α</sub>** – Prostaglandina E 2α

**PKC** – Proteína Kinase C

**SOD** – Enzima Superóxido Dismutase

**Tampão A** - KPi 50mM pH 7,0 + EDTA a 0.5mM

**TBA** – Ácido tiobarbitúrico.

**TNB** – Ácido 5 – tio – 2 – nitrobenzóico

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 Os radicais livres.....	15
1.1.1 O papel fisiológico dos radicais livres.....	19
1.1.2 Regulação do metabolismo oxidativo.....	21
1.2 As variações morfofisiológicas durante o ciclo reprodutivo.....	26
1.2.1 Variação hormonal.....	27
1.2.2 Regulação neuro-hormonal.....	29
1.2.3 Variações morfológicas.....	31
1.3 O metabolismo oxidativo e as alterações do ciclo estral.....	33
1.5.1 O estradiol e os radicais livres.....	33
1.5.2 As alterações morfofisiológicas e os radicais livres.....	35
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Desenho experimental.....	37
3.1.1 Animais e acondicionamento.....	37
3.1.2 Observação e citologia vaginal.....	38
3.1.3 Sacrifício.....	39
3.2 Reagentes e preparo das soluções.....	39
3.3 Peroxidação lipídica.....	39
3.3.1 TBARS.....	40
3.3.2 Alaranjado de xilenol.....	41
3.4 Proteínas carboniladas.....	42
3.5 Dosagem de glutatona equivalente e oxidada.....	43

3.6 Medida da atividade de enzimas antioxidantes.....	45
3.6.1 Preparo dos extratos de tecido.....	45
3.6.2 Glutathione redutase – GR e Glutathione-S-transferase – GST .....	45
3.6.3 Atividade total de Glutathione Peroxidase – GPX .....	46
3.6.4 Superóxido Dismutase – SOD .....	47
3.6.5 Determinação de proteínas solúveis totais.....	47
3.7 Análise estatística.....	48
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
4.1 Metabolismo de radicais livres no útero de ratas durante ciclo estral.....	49
4.1.1 O útero e os radicais livres.....	49
4.1.2 Peroxidação lipídica no útero durante o ciclo estral.....	53
4.1.3 Proteína carbonilada no útero durante o ciclo estral.....	54
4.1.4 Glutathione total e oxidada no útero durante o ciclo estral.....	55
4.1.5 Atividade das enzimas antioxidantes no útero durante o ciclo estral.....	56
4.1.6 Discussão.....	57
4.2 Metabolismo de radicais livres no ovário de ratas durante ciclo estral.....	59
4.2.1 O ovário e os radicais livres.....	59
4.2.2 Peroxidação lipídica e danos em proteína no ovário durante o ciclo estral.....	60
4.2.3 Dosagem de glutathione equivalente e glutathione oxidada no ovário durante o ciclo estral.....	61
4.2.4 Atividade das enzimas antioxidantes no ovário durante o ciclo estral.....	62
4.2.5 Discussão.....	63
4.3 Metabolismo de radicais livres em adrenal de ratas durante ciclo estral.....	65
4.3.1 A adrenal e os radicais livres.....	65
4.3.2 Peroxidação lipídica e danos em proteína na adrenal durante o ciclo estral.....	66
4.3.3 Dosagem de glutathione total e glutathione oxidada na adrenal durante o ciclo estral.....	68
4.3.4 Atividade das enzimas antioxidantes na adrenal durante o ciclo estral.....	68
4.3.5 Discussão.....	69

<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	70
5.1 Estresse oxidativo no útero.....	70
5.2 Estresse oxidativo no ovário.....	72
5.3 Estresse oxidativo na adrenal.....	74
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
<b>GLOSSÁRIO</b> .....	89
<b>ANEXO A</b> .....	90
<b>ANEXO B</b> .....	99
<b>ANEXO C</b> .....	103
<b>ANEXO D</b> .....	104

# 1. INTRODUÇÃO

---

O estudo das vias metabólicas tem contribuído imensamente para os avanços do conhecimento na área das ciências da saúde, bem como para o progresso do tratamento de várias doenças da atualidade, tais como: câncer, distúrbios do metabolismo e doenças neurodegenerativas.

Um dos processos celulares que por meio de seu estudo tem acrescentado muito ao conhecimento médico é o da via do metabolismo oxidativo. Esse processo envolve a formação e destoxificação de espécies reativas como os radicais livres.

Os radicais livres atuam em diversos processos celulares, como por exemplo, na inflamação, onde participam da liberação de fatores inflamatórios do tipo fator de necrose kappa B (NF- $\kappa$ B), fundamental na quimiotaxia e transdução de sinais. Como sinalizadores celulares essas espécies reativas podem ter uma ação ainda mais ampla na medida que desencadeiam outras reações celulares, exercendo um papel de regulação dos mecanismos celulares.

No entanto, essas espécies químicas estão envolvidas em processos de danos celulares, tais como a oxidação de lipídeos, proteínas e o DNA. Esses danos podem conduzir às mais diversas situações, desde a apoptose até a carcinogênese (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Atualmente tem-se levantado um questionamento a respeito da interação entre os hormônios e a via do metabolismo oxidativo, uma vez que a participação na transdução de sinal desses grupos de espécies químicas tem promovido o estudo pela busca de interação, indução ou inibição nos quais um grupo de substâncias poderia influenciar o outro (Martin *et al*, 2006).

As variações periódicas dos hormônios sexuais, que ocorrem durante o ciclo reprodutivo, criam juntamente com a discussão da terapia hormonal um ambiente singular para o estudo da participação dos radicais livres nesse processo.

É sabido que o papel do estrogênio depende dos radicais livres de oxigênio tanto em doenças como em processos fisiológicos, a exemplo da ovulação e a nidadação (Fujji *et al*, 2005).

Assim, a investigação da ação dos radicais livres durante a variação hormonal no ciclo reprodutivo e a interação deste com o metabolismo oxidativo são os objetos da atual discussão.

## 1.1 Os radicais livres

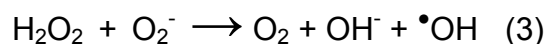
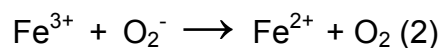
O metabolismo celular em mamíferos, como em toda célula aeróbia, promove um grande ganho energético, mas também resulta na produção de uma série de espécies químicas com potencial lesivo como os radicais livres e outras espécies reativas.

Radicais livres são conceituados como espécies químicas que possuem elétrons desemparelhados em seu orbital mais energético. Os radicais podem possuir carga positiva, negativa ou neutra (Halliwell & Gutteridge, 2000).

As espécies reativas podem ser divididas em: radicalares, espécies que possuem elétrons desemparelhados e podem ser formadas a partir da dissociação de ligações covalentes como a que ocorre na fissão homolítica da água; ou não radicalares, exercendo sua atividade através da troca de elétrons com outras moléculas (Halliwell & Gutteridge, 2000).

As espécies reativas podem ser formadas a partir do oxigênio (EROs), do nitrogênio (ERNs), do carbono (ERCs) ou do enxofre (EREs). Todavia, as que possuem maior relevância fisiológica são as EROs e as ERNs (Dormandy, 1980; Mattison *et al*, 1980).

As espécies reativas de oxigênio começaram a ser descritas no final do século XIX, por meio da reação de oxidação do ácido tartárico por peróxido de hidrogênio, descrita por Fenton em 1876 e que teve seu mecanismo detalhado por Haber e Weiss por volta de 1930, conforme o esquema representado abaixo (reações de 1 a 3).



No entanto, apenas no início dos anos 60 com a descoberta de uma enzima capaz de dismutar o radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ )<sup>1</sup>, as EROs passam a ter maior

---

<sup>1</sup> **Legenda:**  $\text{O}_2^-$  - radical superóxido,  $\bullet\text{OH}$  - radical hidroxil.

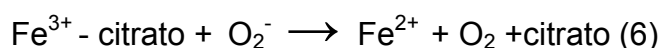
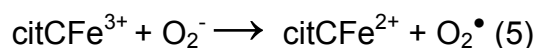
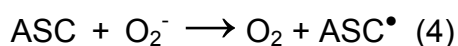


importância no estudo das ciências biológicas, uma vez que essa enzima está presente em grande parte dos tecidos vivos (McCord & Fridovich, 1969).

Hoje se sabe que cerca de 0,1 a 0,4% do oxigênio consumido na respiração celular forma espécies radicalares (Hermes-Lima, 2004). Tal fato deve-se principalmente à redução incompleta do oxigênio, que em maior parte é reduzido pela citocromo C oxidase nos complexos II e III da cadeia transportadora de elétrons.

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é convertido em água ( $H_2O$ ) na cadeia transportadora de elétrons, mas poderá receber apenas um elétron de cada vez, o que não permite a redução tetravalente em uma só etapa do processo, o que torna possível à formação do radical  $O_2^-$ . Outrossim, as situações de maior fluxo mitocondrial de oxigênio, como nos casos de reperfusão, favorece essa redução incompleta (Gille & Nohl, 2001).

Dentre as EROs de maior relevância temos o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ). O radical superóxido tem sua ação tanto oxidante, quando oxida o ascorbato<sup>2</sup> (reação 4), como redutora, quando age sobre a proteína hemínica do citocromo C e do complexo FeIII-citrato, cujo efeito biológico nas reações 5 e 6 é principal (Ginani, 2005; Gondar, 2005).



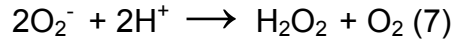
A velocidade de reação do  $O_2^-$  é relativa e depende do composto com qual está reagindo; no caso das biomoléculas é muito pequena (constante de reatividade  $< 0,3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Porém, a capacidade de  $O_2$  difundir-se através da membrana mitocondrial permite que ele possa alcançar outras estruturas celulares (Fridovich, 1998).

O superóxido pode sofrer dismutação espontânea ou através da ação da superóxido dismutase (SOD). Sofrendo dismutação, forma  $H_2O_2$  (reação 7) que, ao reagir com metais de transição como o ferro ou o cobre, (com uma constante de

---

<sup>2</sup> **Legenda:** ASC – ascorbato,  $ASC^{\bullet}$  - Ascorbil.

reatividade de  $10^2$  e  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente), pode levar à formação do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) (reação 1), que é altamente reativo (constante de reatividade está em torno de  $10^7$ -  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Halliwell & Gutteridge, 2000).



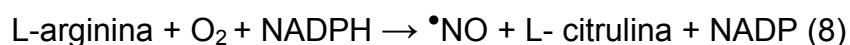
O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produzido na mitocôndria, e também pela enzima xantina – oxidase e por diversas outras peroxidases, possui uma ação oxidante fraca quando comparado as demais EROs. O potencial lesivo do peróxido de hidrogênio está associado à capacidade de difusão através de membranas celulares, permitindo que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido na mitocôndria possa alcançar outros compartimentos celulares como o núcleo (Halliwell & Gutteridge, 2000).

O radical hidroxil é entre as EROs, a que possui maior reatividade e relevância biológica, pois pode causar dano oxidativo em fosfolipídios de membrana, oxidar proteínas e o DNA tanto mitocondrial quanto nuclear (Hermes-Lima, 2004).

A formação do hidroxil em sistemas biológicos através da reação de Fenton, ocorre uma vez que o ambiente celular contém vários agentes redutores, que reduzem os metais de transição como o ferro e o cobre e os tornam disponíveis para reagirem com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fridovich, 1998). A geração de radicais hidroxil pode ocorrer ainda através da fissão homolítica da água, ou em reações envolvendo o superóxido e o ácido hipocloroso (Hogg *et al*, 1992).

Outras espécies reativas com grande importância para os sistemas vivos são as ERNs (espécies reativas de nitrogênio). Dentre as ERNs que possuem ação biológica, o óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) merece especial atenção. Essa espécie química está envolvida nos mais diversos processos fisiológicos, como segundo mensageiro ou até mesmo como neurotransmissor em alguns neurônios hipotalâmicos (Rubinek *et al*, 2005)

O  $\bullet\text{NO}$  é produzido a partir do aminoácido arginina em um sistema catalisado por um grupo de enzimas chamadas NO sintetase (reação 8).



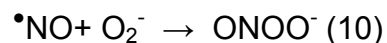
O grupo de enzimas NO sintetase (NOS) apresenta isoformas sendo as mais comuns a mitocondrial, a induzível ou inflamatória (presente nos tecidos

inflamatórios), e a constitutiva formada pela NOS própria de cada tecido (Jezek & Hlavata, 2005). Alguns tecidos como o útero, por exemplo, possuem tanto a forma constitutiva quanto a inflamatória (Huang *et al*, 1995).

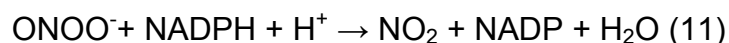
Esse grupo de enzimas é controlado por três diferentes genes. O gene NOS I controla a produção do NO utilizado como neurotransmissor, o NOS II controla a produção de NO sintetase inflamatória, responsável por boa parte da produção de NO envolvida em processos patológicos, e o NOS III está envolvido com a expressão de NO sintetase constitutiva, e pode sofrer controle hormonal como o que é exercido pelo hormônio luteinizante (LH) (Fujii *et al*, 2005).

A produção de  $\bullet\text{NO}$  regula a produção de superóxido e vice-versa. Isso se dá na medida em que o  $\bullet\text{NO}$  produzido na mitocôndria inibe de forma reversível e direta o citocromo C oxidase no complexo IV da cadeia respiratória da mitocôndria (Jezek & Hlavata, 2005).

O  $\bullet\text{NO}$  pode participar da formação de EROS e ERNs. Na presença do peróxido de hidrogênio (reação 9) pode levar a formação do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ); ou reagir com o superóxido formando o radical peróxido nitrito (reação 10), espécie reativa considerada responsável pela maior parte dos danos causados pelos radicais de nitrogênio (Keszler *et al*, 2005).



A destoxificação destas espécies reativas fica a cargo de um grupo de enzimas conhecido como nitrato redutase (NR), responsáveis por re-converter o peróxido nitrito a óxido nítrico (reações 11 e 12). E mais recentemente foi descoberto que a glutatona peroxidase (GPx) também é capaz de destoxificar o peróxido nitrito (reação 13) (Hermes-Lima, 2004).

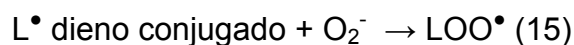
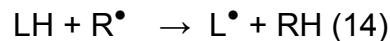


### 1.1.1 O papel fisiológico dos radicais livres

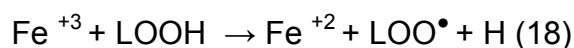
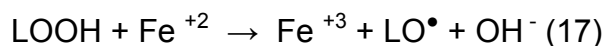
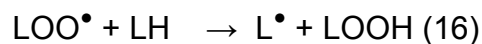
As espécies radicalares estão envolvidas em diversos processos celulares, como dano oxidativo. Os danos oxidativos podem ocorrer em fosfolipídios de membrana, proteínas, DNA, RNA e carboidratos.

O termo peroxidação lipídica representa um conjunto de reações oxidativas de lipídeos insaturados, que é um processo de reação em cadeia sendo assim capaz de amplificar o dano oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Pode-se dividir o processo da peroxidação lipídica em três etapas. A iniciação, que ocorre no momento da retirada de um hidrogênio de um grupo metileno, por meio de um agente oxidante (reação 14), leva à formação de um radical lipídico<sup>3</sup>, que após o rearranjo molecular forma um dieno conjugado. Este último forma um radical peroxil após reagir com o superóxido (reação 15).



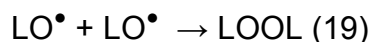
Após a formação do radical peroxil segue-se uma série de outras reações conhecida como propagação. Nesta etapa o peroxil formado passa a reagir com outros lipídeos polinsaturados, formando lipoperóxido (reação 16). O lipoperóxido por sua vez pode reagir com metais de transição, ferro e cobre, por exemplo, e formar o radical alcóxil e novamente o radical peroxil que reinicia o processo (reação 17 e 18).



<sup>3</sup> **Legenda:** R<sup>•</sup> – radical livre, L<sup>•</sup> – radical lipídico.

L<sup>•</sup> – O radical se estabiliza por ressonância formando o dieno conjugado

Por fim, dois radicais lipídicos podem reagir entre si (reação 19), ou com compostos fenólicos (reação 20) ou ainda se decomporem emalcones, isoprostanos ou aldeídos (reação 21), como o malonaldeído (MDA) que pode ser detectado pelo método das espécies reativas do ácido tiobarbiturico (TBARs). Estas reações são conhecidas como etapa da terminação da peroxidação lipídica.



A formação dos lipoperóxidos tem grande repercussão não só pelo fato de provocarem reação em cadeia potencializando o dano, mas também pelo fato dessas espécies reativas poderem interagir com outras biomoléculas, como o DNA e as proteínas, com as quais formam compostos conhecidos como proteínas carboniladas, a partir da formação de adutos com alguns aminoácidos do grupamento protéico (Sakaguchi *et al*, 1981). Os organismos aeróbios possuem enzimas responsáveis pela remoção desses peróxidos, como as aldose redutases, e as carbonil redutases (Maser, 2005).

Outras estruturas moleculares que podem ser alvo dos danos oxidativos são as proteínas. As proteínas podem ser danificadas por várias espécies radicalares, tais como superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, metabólitos do óxido nítrico e produtos da oxidação de lipídeos. Os sítios das proteínas em que estão aminoácidos, como a cisteína e metionina, são os mais suscetíveis oxidação (Halliwell & Gutteridge, 2000).

O dano oxidativo é capaz de desnaturar as proteínas através da oxidação dos grupos sulfidril e em alguns casos até mesmo clivando ligações peptídicas, o que altera a forma e conseqüentemente a função das mesmas, que são fundamentais à estrutura e ao metabolismo celular (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Durante algum tempo pensou-se que o dano em proteína seria algo irreversível. No entanto, trabalhos mais atuais descrevem a ação do proteassoma 20S como possível removedor dos produtos do dano oxidativo em proteínas (Davies & Shringarpure, 2006).

Um dos danos com maior repercussão biológica é o dano às moléculas de DNA, o que faz com que os sistemas biológicos apresentem vários mecanismos de defesa para conter o dano oxidativo e mantê-los em níveis funcionais (Hermes-Lima, 2004).

O dano oxidativo pode ocorrer tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial. A lesão pode ocorrer, por exemplo, no momento em que as espécies reativas, como o hidroxil e os produtos da peroxidação lipídica, quebram a dupla fita de DNA, através, por exemplo, da formação das duplas de timina; ou oxidam bases nitrogenadas como o que acontece na formação da 8-hidrodesoxiguanina, 5 hidrodesoxicitosina e 8 hidroxidesoxiadenina (Jezek & Hlavata, 2005).

O controle do dano oxidativo do DNA fica a cargo de enzimas como as endonucleases e a glicosidade que removem o trecho do DNA com a base alterada, enquanto a DNA polimerase complementa a seqüência com a ligase reintegrando essas bases a fita corrigida (Ginani, 2005 apud Lewin, 2000).

Entretanto, os radicais livres não possuem apenas uma atuação celular relacionada ao dano oxidativo, mas também como reguladores de vias do metabolismo celular.

Estas espécies químicas podem atuar em diferentes processos celulares, tais como: controle de transdução de sinal via segundo mensageiro, como o GMPc (do inglês *guanine mono phosphate cyclic* – GMPc), indução na expressão de genes de enzimas antioxidantes e proteínas, controle da produção de mediadores da inflamação como as prostaglandinas e fatores ativadores de macrófagos como Kapa B; estimulação do crescimento celular ou mesmo a apoptose, atuar na transmissão sináptica como neurotransmissores, como é conhecido o papel neuro endócrino do  $\bullet$ NO e ainda mimetizar o efeito de hormônios, como a insulina em células do tecido adiposo (Hermes-Lima, 2004).

### **1.1.2 Regulação do metabolismo oxidativo**

O controle do metabolismo oxidativo na célula tem por objetivo evitar que os danos oxidativos causados pelas espécies radicalares se sobreponham a capacidade do sistema de reparo ou antioxidante de revertê-los, uma vez que a capacidade de correção de danos celulares é finita (Halliwell & Gutteridge, 2000).

A regulação basicamente ocorre por meio do controle da produção, da destoxificação das espécies radicalares e dos danos oxidativos.

As células dos organismos aeróbios possuem basicamente quatro classes de sistemas de defesa, o sistema de defesa antioxidante primário e auxiliar, os quelantes e as proteínas ligantes de metais e o sistema de reparo enzimático (Ginani, 2005 apud Hermes-Lima, 2004). (Quadro 1).

**Quadro 1:** Sistemas de defesa antioxidante, adaptado de Hermes-Lima, 2004.

CLASSE	EXEMPLOS
PRIMÁRIO	As enzimas <b>SOD, catalase</b> , as peroxidases como a glutathiona peroxidase dependente de selênio ( <b>Se-GPx</b> ), <b>ascorbato peroxidase, citocromo c peroxidase, alquil peroxidase e tioredoxina peroxidase</b> . E os não enzimáticos como o <b>estrogênio</b> , o <b>ácido úrico</b> , a <b>melatonina</b> , o <b>ácido lipóico</b> , o <b>ácido úrico</b> , as <b>ubequinonas</b> e a <b>glutathiona</b> ; e os antioxidantes adquiridos pela dieta, o <b><math>\alpha</math> - tocoferol e o <math>\beta</math> - caroteno</b> .
AUXILIAR	Enzimático com a glutathiona redutase ( <b>GR</b> ) e a glicose-6-fosfato desidrogenase ( <b>G6PDH</b> ) e o não enzimático com o <b>ascorbato</b> .
QUELANTES E PROTEÍNAS LIGANTES DE METAL	Quelantes como <b>citrato, os flavonóides e os polifenóis</b> . E proteínas como <b>ferritina, transferrina, ceruloplsmina</b> .
SISTEMA DE REPARO	Enzima de reparo em lipídios – <b>carbonil redutase</b> e em DNA – <b>gliosidase</b> .

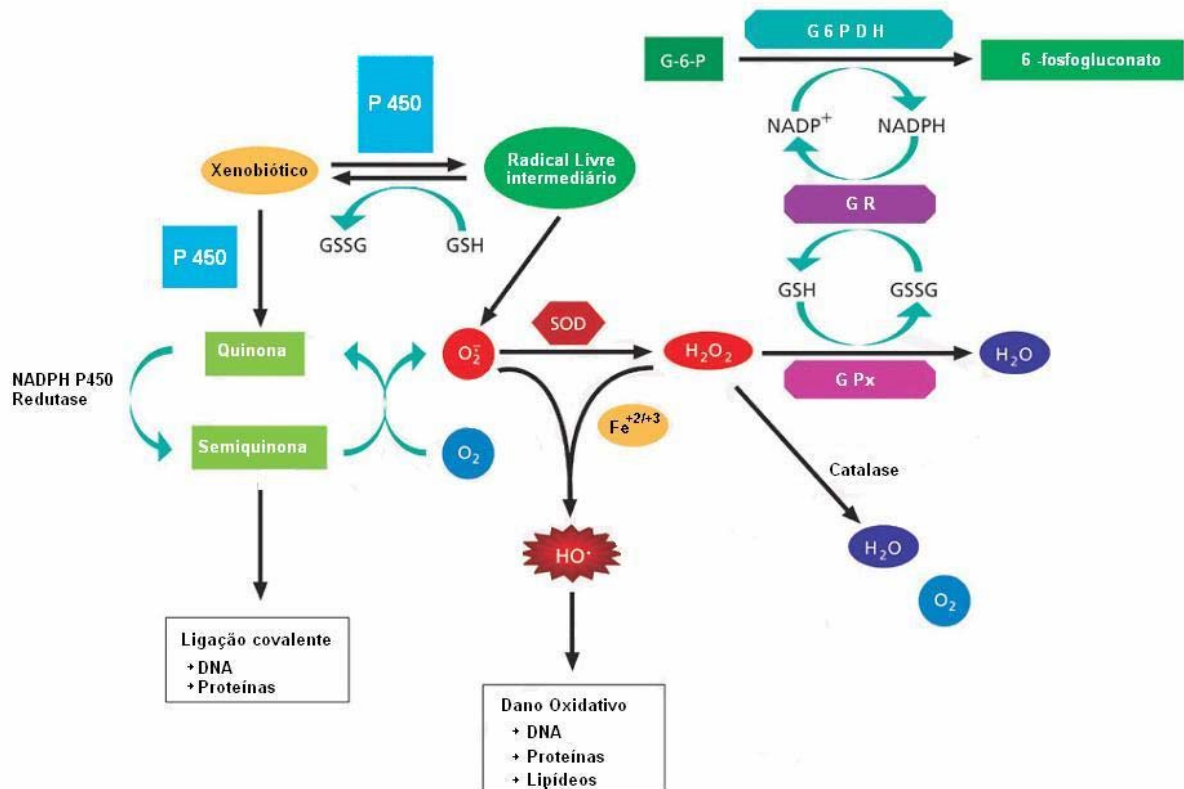
O sistema primário é aquele formado por elementos enzimáticos ou não, que destoxificam espécies radicalares reagindo diretamente com elas (Hermes-Lima, 2004).

O sistema de defesa antioxidante passa a ganhar vulto na década de 60 com a descoberta da SOD por Fridovich (McCord & Fridovich, 1969). Posteriormente foram descobertas outras enzimas que também foram integradas a essa classe.

A enzima superóxido dismutase, SOD, é responsável pela dismutação do  $O_2^-$ , como podemos ver na Figura 1. Esta enzima possui várias isoformas onde a

variação principal está em seu grupo prostético que pode possuir tipos diferentes de metais ligados, sendo os exemplos mais conhecidos a Mn-SOD e a CuZn-SOD (Fridovich, 1998).

A catalase e as peroxidases, como a GPx, estão associadas por mecanismos diferentes à transformação do peróxido de hidrogênio, como ilustrado na Figura 1.



**Figura 1:** Esquema de ação das enzimas antioxidantes e processos de detoxificação de espécies de radicais de oxigênio. Adaptado de [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Life\\_Science/Cell\\_Signaling/Scientific\\_Resources/Pathway\\_Slides\\_Charts/Oxidative\\_Stress.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides_Charts/Oxidative_Stress.html) por Daniel Prado Machado. Acesso em: 16 fev. 2006.

Os compostos que participam do sistema de defesa antioxidante primário não enzimático são em geral antioxidantes de baixo peso molecular, dentre os quais podemos citar os endógenos, como a melatonina, o ácido lipóico, o ácido úrico, as ubiquinonas e a glutatona; e os antioxidantes que podem ser adquiridos pela dieta, tais como o  $\alpha$  – tocoferol e o  $\beta$  – caroteno (Machlin & Bendich, 1987).

A melatonina tem sido descrita na literatura como antioxidante de ação direta, no entanto sabe-se que por ser usada experimentalmente em doses muito acima da



fisiológica é bem possível que seu papel de regulação antioxidante esteja envolvido na expressão dos genes de enzimas antioxidantes (Cardinali *et al*, 1997).

O ácido lipóico é outra substância endógena com reconhecido papel antioxidante. Esse ácido é parte do grupo prostético do complexo enzimático  $\alpha$ -cetoacido da mitocôndria, e na sua forma reduzida de ácido dihidrolipóico (DHLA) é um potente agente redutor, capaz de reagir com  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{HOCl}$ , reciclar glutathione, ascorbato e vitamina E. É encontrado nas células em concentrações muito baixas, e apesar de não ter uma ação antioxidante relevante, seu uso exógeno para tratamento de patologias que envolvem estresse oxidativo tais como, a intoxicação metálica e o envenenamento por tetra-clorocarbonados tem apresentado excelentes resultados (Jonas *et al*, 1987).

As ubiquinonas são moléculas conhecidas desde a década de 50 como importantes componentes da mitocôndria, tendo seu papel como antioxidante sido descrito na década de 70 (Land & Swallow, 1970), bem como diversos tipos de ubiquinonas, sendo a mais conhecida a ubiquinona 10. Sua ação antioxidante ocorre devido a perda de um elétron do ubiquinol que é convertido a semiubiquinona, a qual sofre outra oxidação e é convertido em ubiquinona. A ubiquinona pode ainda reduzir o ubiquinol e regular os níveis da relação ubiquinol/ubiquinona, mas que permaneçam dentro de níveis toleráveis (Karageuzyan, 2005). Assim, as ubiquinonas podem proteger contra os mais diversos tipos de dano oxidativo, tais como peroxidação lipídica e o dano oxidativo em proteínas e no DNA mitocondrial (Hermes-Lima, 2004).

O ácido úrico produzido a partir da xantina pelo sistema de xantina oxidase ou xantina desidrogenase, é capaz de reagir com radicais peroxil,  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{ONOO}^-$  formando o radical urato. Esse radical é reciclado pelo ascorbato formando alantoina, que é encontrada em diversos pacientes com doenças dependentes do estresse oxidativo, como a Doença de Wilson (de Bont & Pieters, 2004).

Como importante antioxidante endógeno, temos ainda a glutathione que estará em evidência no tópico de Material e Métodos.

Dos antioxidantes primários não enzimáticos de origem na dieta temos o  $\alpha$  – tocoferol e o  $\beta$  – caroteno, que são capazes, por exemplo, de interromper a reação em cadeia propagada pelos radicais peroxil que atacam as membranas biológicas. Atuam reagindo diretamente neutralizando o radical livre ou tomam para si o elétron

desemparelhado, exercendo a função que na literatura é conhecida por captor de radicais livres (Hermes-Lima, 2004).

O  $\alpha$  – tocoferol possui uma cauda apolar que possui maior afinidade pela membrana e um anel cromanol onde se encontra ligado o grupamento fenólico que tem características polares (portanto tendo maior afinidade por meio aquoso, não membranas). O  $\alpha$  – tocoferol é capaz de reagir com o peróxido de maneira a impedir o dano de membrana provocado na fase de propagação da peroxidação lipídica (Hermes-Lima, 2004). Contudo ele pode ser considerado um prooxidante, devido a sua capacidade de reduzir íons  $\text{Fe}^{3+}$ .

Os carotenóides, representados pelo  $\beta$  – caroteno, podem ser tanto doadores como aceptores de elétrons podendo exercer ação tanto antioxidante como prooxidante. Podem retirar átomos de hidrogênio de moléculas, transferir elétrons, ou formar adutos radicalares como o que acontece com o peróxido (Young & Lowe, 2001), participando dessa maneira da reciclagem do tocoferil a tocoferol, sendo considerado por isso um antioxidante secundário ou auxiliar.

No entanto, em altas concentrações de oxigênio o  $\beta$  – caroteno, podem reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  e ter assim também uma ação prooxidante.

O antioxidante auxiliar ou secundário, recebe esse nome por ter a função de auxiliar o sistema primário. É formado de enzimas como a glutatona redutase (GR) e glicose-6-fosfodesidrogenase (G6PDH), que agem reciclando GSH e NADPH, necessários ao sistema primário, como representado na Figura 1 (Halliwell & Gutteridge, 2000).

O ascorbato também compõe o sistema secundário, uma vez que pode recuperar o  $\alpha$  – tocoferol e o  $\beta$  – caroteno, formando o ascorbil um radical pouco reativo e que pode ser reciclado novamente pela ação da monodehidroascorbato redutase (MDHAR) ou da dehidroascorbato redutase (DHAR)(Halliwell & Gutteridge, 2000).

Temos ainda um outro grupo de substâncias antioxidantes que são os quelantes e as proteínas ligantes de metal. Os quelantes são espécies químicas de baixo peso molecular, que se ligam a metais como o ferro e o cobre impedindo que sejam oxidados através da reação de Fenton e assim participem de reações de geração de radicais livres. Podem ainda impedir a reação em cadeia atuando como bloqueadores de reação em cadeia ou até mesmo como captor de radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Os quelantes naturais são encontrados em bactérias, e em organismos superiores apenas quando administrados farmacologicamente. Dentre as substâncias com habilidade de se ligarem à metais de transição de forma a impedir que participem da reação de Fenton, temos a ferritina e a transferrina que se ligam habitualmente ao ferro; e a ceruplasmina, ao cobre(Hermes-Lima, 2004).

A proteção antioxidante e o sistema de reparos, assim garantem o equilíbrio durante a formação de espécies radicalares. Durante eventos fisiológicos ciclos, portanto, esses mecanismos têm um papel fundamental, uma vez que o acúmulo do dano oxidativo ou a falta de reparo levaria a níveis cada vez maiores e mais prejudiciais às estruturas celulares.

## **1.2 As variações morfofisiológicas durante ciclo reprodutivo.**

O ciclo reprodutivo é composto por uma série de alterações morfofisiológicas que ocorrem tanto no ovário para a produção dos gametas, quanto no útero para a formação de um ambiente favorável à implantação do embrião.

As variações ocorridas nos diferentes órgãos advêm das oscilações que têm início no hipotálamo. A partir da produção do LHRH, no hipotálamo, a hipófise é estimulada a produzir os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) que acionam o ovário a produzir o estradiol ( $E_2$ ) e a progesterona ( $P_4$ ), que levam o útero a sofrer alterações endometriais de maneira cíclicas e marcantes.

Tais alterações ocorrem acompanhando a flutuação dos níveis desses hormônios que variam em períodos cíclicos. O período de variação dos níveis hormonais é conhecido na maioria das espécies de mamíferos como ciclo estral, cuja duração varia segundo a espécie (Baird *et al*, 1975).

O ciclo estral de ratas tem a duração média de 4 a 5 dias. Esse ciclo pode ser dividido em quatro fases: proestro, estro, diestro I e o diestro II, tendo cada fase uma duração média de 24 horas.

Assim, participam das variações quatro hormônios principais: o estradiol ( $E_2$ ), a progesterona, o LH e o FSH. Da mesma forma, a prolactina também participa desse mecanismo com uma fina regulação da qual depende o controle do ciclo estral.

### 1.2.1 Variação hormonal

As variações hormonais bem como a regulação dos hormônios são típicas em cada fase do ciclo estral. Sendo o pico do hormônio folículo estimulante (FSH) o evento hormonal de maior repercussão sobre o ciclo estral, por provocar no ovário o recrutamento folicular.

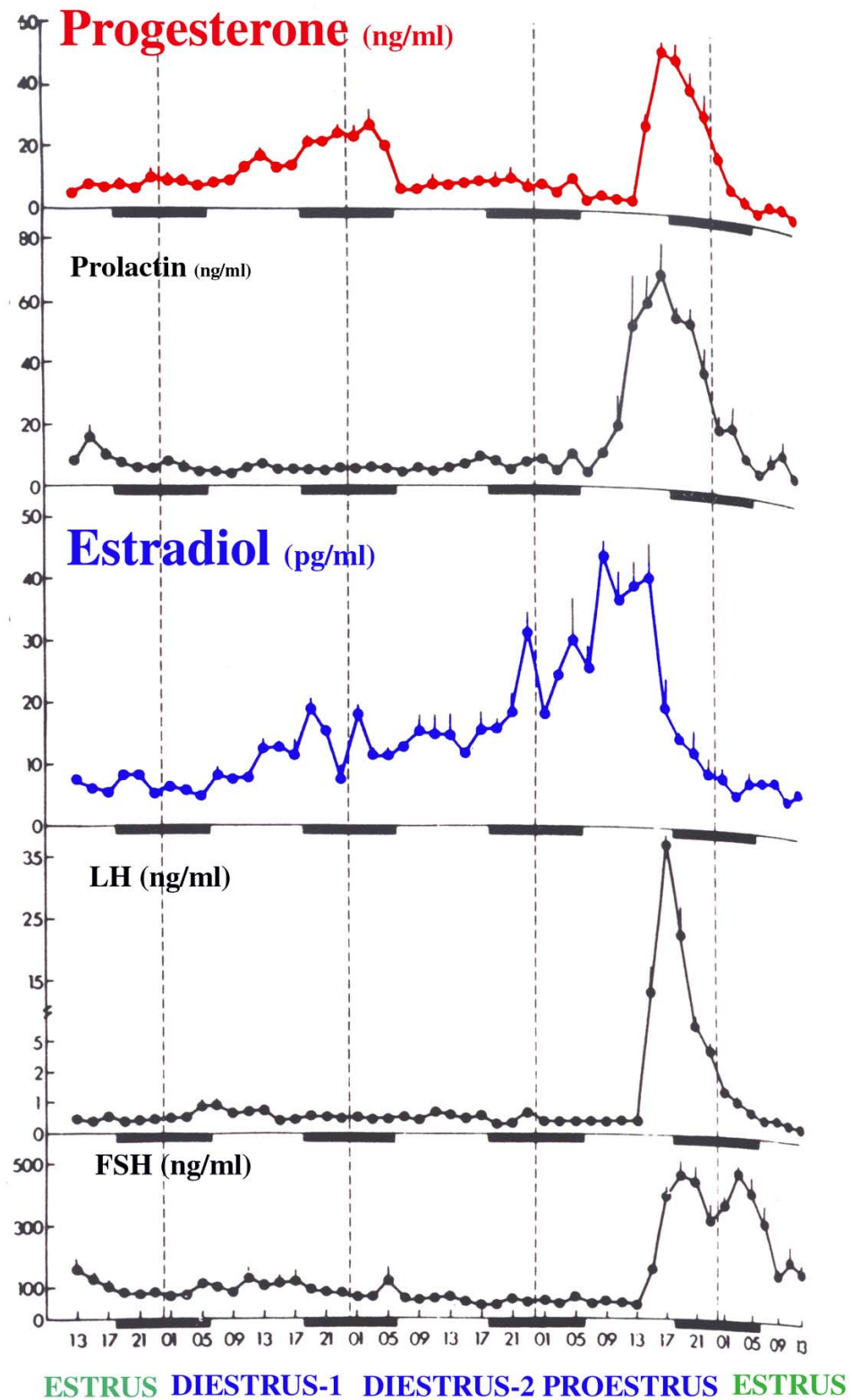
Na tarde do proestro ocorre o pico de LH, por volta das 17h00 (Figura 2). O pico de LH é acompanhado em horários muito próximos pelo primeiro pico do FSH e pelo pico de prolactina. Ademais, na tarde do proestro o pico de estradiol e de progesterona antecedem a esses eventos.

Da noite do proestro para a manhã do estro ocorre uma queda brusca dos níveis dos hormônios citados. Sendo que o FSH apresenta ainda um segundo pico por volta das 05h00 da manhã do estro, voltando a cair até atingir níveis basais na manhã do estro, como o que ocorrera outrora com os outros quatro hormônios.

Durante a fase do diestro I encontram-se em níveis basais os hormônios LH, FSH e prolactina, ao passo que o estradiol e a progesterona apresentam uma discreta ascensão ao longo do dia. Cabe lembrar no entanto, que o LH sofre variações pulsáteis ao longo das horas do diestro I enquanto o FSH e a prolactina permanecem em níveis praticamente constantes (Knobil & Neil, 1994).

Na noite do diestro I, começa a ocorrer uma queda dos níveis de progesterona da ordem 20 ng/ml, ao passo que o estradiol continua a elevar seus níveis, enquanto os níveis dos hormônios hipofisários permanecem semelhantes aos do estro. Temos assim, a progesterona, o LH, o FSH e prolactina em níveis basais durante a fase do diestro II.

Na manhã do proestro, os níveis de estradiol continuam a subir quando na tarde do proestro ocorre novamente o pico dos hormônios descritos anteriormente.



**Figura 2:** Curva de variação hormonal horária no sangue de ratas durante as fases do ciclo estral. Estão representados no gráfico as variações de prolactina, progesterona, estradiol, LH e FSH. Adaptado de Smith *et al*, 1975.

### 1.2.2 Regulação neuro-hormonal

Como dito anteriormente, a regulação do hormônio LH é exercida pelo hormônio hipotalâmico liberador de LH (LHRH – do inglês *Luteneanizing Hormone Releasing Hormone*) e pela ação dos esteróides sexuais. Os pulsos de baixa amplitude do LHRH estimulam a produção da subunidade beta do LH, enquanto os de grande amplitude elevam a produção das subunidades alfa e beta que compõem a estrutura desse hormônio (Knobil & Neil, 1994).

A ação regulatória feita pelos esteróides sexuais fica evidente quando experimentos com ratas ooforectomizadas mostraram que a falta de estradiol e progesterona levam a um aumento da secreção pulsátil do LH, enquanto a administração de progesterona parece potencializar a resposta do LH ao estradiol (Aiyer MS, Fink G, 1974).

O estradiol, através do controle dos estímulos neuronais e da hipófise, interfere na amplitude e frequência dos pulsos de LH (Blake, 2005), sendo responsável pelos baixos níveis do LH no estro tardio e no começo do proestro. O estradiol também regula a produção de LH, na medida em que atua sobre a banda diagonal da área de Broca, o complexo septal, área preoptica e núcleo para ventricular inibindo o LHRH, interferindo assim na amplitude dos pulsos de LH.

No entanto, não se pode afirmar que o estradiol mantenha os níveis basais do LH excitando os neurônios inibitórios ou se inibindo os excitatórios (van der Beek, 1996).

Os níveis crescentes de estradiol e progesterona secretados durante o diestro I e II são responsáveis por conduzir o eixo hipotálamo – hipófise a uma readaptação, que também depende de um controle neural circadiano.

Outro fator que também está relacionado com a secreção de LH é o NO, uma vez que a produção de NO na iminência medial, coincide com o pico de produção de LH e LHRH na fase do proestro (Knauf *et al*, 2001).

Integrado ao metabolismo do LH está o hormônio FSH, não só devido a sua semelhança molecular, mas também porque a secreção do FSH depende em parte do LHRH, o que pode ser notado, por exemplo, na ocorrência de interpulsos maiores na secreção do primeiro hormônio (Knobil & Neil, 1994).

O aparecimento do primeiro pico do FSH é estimulado pela produção de LHRH, que induz um aumento da transcrição do RNAm da subunidade  $\alpha$  semelhante ao LH e ao FSH. Por outro lado, o segundo pico do FSH ocorre por meio de sua subunidade (beta) do hormônio e, portanto, não depende do LHRH. A sua secreção inicial é decorrente da diminuição da produção de inibina após a ovulação. É importante dizer que os pulsos de baixa amplitude do LHRH induzem a produção apenas da subunidade beta enquanto os de grandes amplitudes elevam as subunidades alfa e beta, o que faz com que o segundo pico, composto pela subunidade  $\beta$  de FSH não dependa do LHRH.

O FSH tem a sua primeira queda após o pico da noite do proestro devido a inibição do estradiol, o que ocorre por *feed – back* negativo: e a ocorrência do segundo pico de FSH, durante o ciclo reprodutivo, deve-se não apenas à brusca queda da inibina, mas também ao aumento da progesterona, da testosterona e dos androgênios (Kumanov et al, 2005).

Assim a inibição do FSH pode ocorrer tanto por gonadostatinas como por fatores não esteroidais. E dentre esses elementos não esteroidais envolvidos no controle do FSH, tem-se a inibina e ativina (Knobil & Neil, 1994).

A inibina está envolvida na redução da transcrição de RNAm do FSH. A inibina produzida pelas células foliculares aumenta na medida em que avança o desenvolvimento folicular e diminui logo após a ovulação atingindo os níveis máximos na manhã do proestro. A partir da noite do estro passa a ocorrer um novo aumento devido ao recrutamento folicular.

A ativina atua estimulando a secreção pulsátil de FSH, que é responsável pelo aumento do estradiol mesmo sem o estímulo central (Hirshfield, 1991).

Já o controle neuronal da liberação do FSH, ainda não é totalmente compreendido, uma vez que neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos estão envolvidos na liberação de gonadotrofinas estimulando o LH, mas não o FSH (Knobil & Neil, 1994).

A prolactina tem um padrão de secreção semelhante ao LH. Tendo os níveis de RNAm da prolactina um aumento às 23h00 do estro (chegando a 80 ng/ml) e as 8h00 do diestro I as 17h00 – 20h00 do diestro II (em torno de 20 ng/ml) com a presença de um pico em tempo semelhante ao LH. Porém alguns trabalhos mostram a existência de picos secundários desse hormônio durante o estro (Knobil & Neil, 1994).

No ciclo estral a prolactina é estimulada pelo estradiol e pelo hormônio liberador de tirotrófina (do inglês *tirotrrophine release hormone* – TRH) e é inibida pela dopamina.

O estradiol estimula a secreção de prolactina por inibir os neurônios da via dopaminérgica. Isso ocorre no momento em que o estradiol estimula o gene NOS III nas áreas pré-óptica e do núcleo medial do hipotálamo, levando portanto à produção de NO e inibindo assim a produção de dopamina na região tuberoinfundibular dopaminérgica – TIDA, na tarde do proestro conduzindo assim a um aumento de prolactina nesse momento do ciclo (Yen & Pan, 1999). A progesterona por sua vez, inibe essa ação do estrogênio sobre a prolactina, sem, no entanto ter ação alguma sobre a prolactina isoladamente.

O pico da prolactina ocorre próximo ao pico do LH, o qual induz a ovulação, e é nesse momento que encontramos no sistema porta hipofisário os menores níveis de dopamina e o aumento do TRH. Contudo, o aumento do TRH não provoca aqui um aumento concomitante de TSH, mas graças a uma densidade maior de receptores lactotrofos do que tireotrofos na hipófise a ação desse hormônio passa a ser mais efetiva (Knobil & Neil, 1994).

A ação da prolactina está envolvida desde do controle hormonal do ciclo, com a inibição da síntese de estradiol e o aumento de receptores de LHRH no proestro; quanto na alteração de comportamento como é o caso da lordose durante o estro e o resgate do corpo lúteo após a estimulação cervical.

### **1.2.3 Variações morfológicas**

Os órgãos do sistema reprodutor sofrem diversas alterações morfológicas durante o ciclo estral, é importante citar a foliculogênese, a atresia e a dominância folicular, a ovulação, e as alterações do tamanho da adrenal e do endométrio.

A foliculogênese é um processo de desenvolvimento de uma estrutura ovariana que contém um ovócito. Esse processo tem início no segundo pico de FSH, quando alguns folículos começam seu desenvolvimento a partir do recrutamento folicular.

Assim, a partir do segundo pico de FSH, são recrutados em média 300 folículos a cada ciclo nos ovários das ratas. Durante o recrutamento folicular se inicia



o crescimento do folículo que é responsável pelo aumento progressivo dos níveis de estradiol durante do ciclo estral das ratas.

O desenvolvimento folicular ocorre ao longo de duas ondas hormonais, ou seja, os folículos que iniciaram seu desenvolvimento em um determinado ciclo só estarão aptos a liberar o ovócito no ciclo seguinte.

No entanto, apenas 12 dos 300 folículos que iniciaram seu desenvolvimento continuam a se desenvolver sendo que os demais seguem para degeneração. A permanência dos 12 folículos é conhecida por dominância, enquanto a degeneração dos demais é conhecida como atresia folicular.

Uma das hipóteses na literatura para tal fato é a de que os folículos dominantes permanecem funcionando por possuírem uma capacidade maior de resposta antioxidante frente às alterações de isquemia e reperfusão ocorridas no ovário decorrentes das alterações de irrigação desse órgão durante o ciclo estral (Agarwal *et al*, 2005).

A ovulação, processo de liberação do ovócito, ocorre entre a noite do proestro e a manhã do estro, no período de 21h00 – 03h00. Esse evento é marcado não só pela alteração morfológica no órgão, mas pela variação hormonal, ocorrendo aí os pico de LH e estradiol. O LH atinge nesse momento valores de 35 ng/ml e o estradiol de 40 pg/ml (Knobil & Neil JD, 1994).

Os ciclos curtos dos roedores, que ocorrem graças à queda dos níveis de progesterona na fase lútea, podem, em caso de estimulação cervical como o que ocorre na cópula, ser mantidos por até 14 dias (Knobil & Neil JD, 1994).

O aumento dos níveis de estradiol pode conduzir na adrenal a alterações micro anatômicas que ocorrem com o aumento da adrenal pelo aumento no estímulo da produção de CBG (do inglês *cortisol binding protein* – CBG).

As alterações encontradas no útero durante o ciclo estral ocorrem de maneira mais visível no endométrio. O endométrio sofre um aumento da proliferação celular durante a fase do diestro I e diestro II, que em caso de não fecundação são seguidos por uma fase de intensa apoptose no estro (Mendoza-Rodrigues *et al*, 2003).

### 1.3 O Metabolismo oxidativo e as alterações do ciclo estral.

A variação dos hormônios durante o ciclo reprodutivo pode levar a alterações no metabolismo oxidativo, a partir do momento que esses hormônios possuem comprovada ação sobre enzimas antioxidantes e sobre a formação de radicais de oxigênio e nitrogênio (Duran *et al*, 1998).

#### 1.3.1 O estradiol e os radicais livres

Trabalhos da literatura demonstram a interferência dos hormônios do ciclo reprodutivo no metabolismo de radicais livres, como a prolactina e o cortisol, que em situações de estresse reduzem a produção de EROs em um ritmo circadiano nas células do sistema imune (Atanackovic *et al*, 2002).

A literatura traz hoje o estradiol ao lado do LH como os hormônios mais relacionados a mudanças oxidativas que ocorrem nos órgãos chave do ciclo reprodutivo (Zirkin & Chen , 2000).

No entanto o estradiol é o hormônio que possui mais clara influência sobre o metabolismo oxidativo. Há trabalhos que mostram sua ação sobre a lipoproteína de baixa densidade (do inglês *Low Density Lipoprotein* – LDL), e prevenção de demências, além de sua participação na gênese de alguns cânceres. Sua flutuação durante o ciclo reprodutivo e suas respectivas interações com os radicais livres tornam o estradiol foco da discussão sobre essas interações.

O estradiol tem sido considerado como possível controlador nas mais diferentes fases do metabolismo oxidativo. Esse controle poderia ocorrer através da ação direta, com seus metabólitos gerando radicais, tendo assim um papel prooxidante, ou através do controle das vias de transdução de sinal onde exerceria o controle genômico de enzimas antioxidantes e da síntese de antioxidantes endógenos (Liehr, 2000).

Mais recentemente, a descoberta de receptores do E<sub>2</sub> no DNA mitocondrial demonstraram que o E<sub>2</sub> poderia também exercer o controle sobre metabolismo mitocondrial, organela onde controla a etapa oxidativa da respiração celular, sendo assim o local de maior gênese radicais de oxigênio (Yang *et al*. 2004).

A potencial ação prooxidante atribuída ao estradiol deve-se a sua transformação durante o metabolismo.

A síntese do estradiol depende da oxidação do colesterol, que é feita a partir do oxigênio. Dessa maneira, as células produtoras de E<sub>2</sub>, por possuírem uma grande quantidade de lipídeos insaturados, estão susceptíveis ao dano oxidativo, uma vez que poderiam ser atingidas radicais livres formados durante a biossíntese dos esteróides, tais como o superóxido e o radical hidroxil que levariam à peroxidação de lipídeos (Mendelsohn *et al*, 1999 apud Hornsby *et al*, 1983).

Dentro da célula ele pode ainda sofrer a ação da NADPH oxidase e ser levado a catecol estrogênio que por ação da citocromo P-450 redutase forma uma semiquinona que se transforma em quinona; ou então reage com metais de transição, podendo formar radicais livres (Tsai *et al*, 1998). No entanto esses dados provêm de experimentos que foram realizados em condições onde as concentrações de estradiol são em ordem de grandeza muito superior as fisiológicas, o que só foi possível, talvez, em micro-ambientes como na mitocôndria, por exemplo.

O papel prooxidante do estradiol está associado ao potencial genotóxico observado pelo E<sub>2</sub> nos diversos cânceres, sendo que a discussão na literatura envolve sua atuação não só na ativação dos receptores mediadores da vias do metabolismo oncogênico, mas como também na alteração o metabolismo de radicais livres provocando a oxidação do íon ferroso, como observado em modelos que utilizam análogos sintéticos do estradiol. A produção de radicais livres poderia assim ocasionar danos diretos ao DNA, os quais são medidos pela formação de 8-deoxi-guanosina (Liehr, 2000).

Alguns trabalhos corroboram com a ação prooxidante do estradiol mostrando que os produtos de esteróides tornariam inativo o sistema de enzimas P-450, por serem utilizados como pseudo-substratos por esse sistema aumentando assim a geração de radicais de oxigênio, sem demonstrar, no entanto nenhuma correlação entre a ação mediada por receptores deste hormônio (Quinn & Payne, 1985).

Por outro lado, tem-se atribuído o fator protetor do estradiol, contra algumas doenças, ao seu papel antioxidante. Idéia essa que vem cada vez mais se consolidando na literatura, na medida em que o estradiol tem mostrado através de vários trabalhos o seu papel como agente fisiológico antioxidante.

A baixa incidência de doenças ditas neurodegenerativas nos grupos femininos, tais como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson, parece sugerir que elas têm na sua fisiopatologia o envolvimento do metabolismo de espécies reativas de oxigênio; e, no fator sexo, um efeito protetor sobre o tecido

nervoso (Markides *et al*, 1998). Esse fator protetor poderia ser causa da hipossideremia relativa que livraria as mulheres que menstruam de uma sobrecarga de ferro geradora de radicais. Outra hipótese seria o efeito protetor do estradiol.

Dados da literatura demonstram também que em sua estrutura o estradiol possui uma ação de inibição da produção de superóxido pelo mecanismo da xantina oxidase, a qual ocorre principalmente devido a porção delta 9 de seu carbono 17 (Inazu *et al*, 1995).

Ensaio com colesterol demonstram o efeito antioxidante do estradiol na medida em que ele impede a oxidação do LDL da placa, evitando assim a formação de corpúsculos brancos nos macrófagos e retardando o desenvolvimento da placa de aterosclerose (Zirkin & Chen, 2000), o que foi durante muito tempo um forte argumento para a indicação de terapia hormonal.

O benefício do estradiol era atribuído considerando mesmo sua atuação na via como prooxidante, pois a oxidação das partículas de LDL no plasma aumentaria sua depuração no fígado (Shwaery *et al*, 1997). No entanto esses efeitos não foram observados em estudos de longo prazo (Newton *et al*, 2005).

### **1.3.2 As alterações morfofisiológicas e os radicais livres**

Há muito tempo observa-se na literatura variações do ciclo estral associadas às alterações do metabolismo oxidativo, como é o caso da variação das enzimas GPx e GR no fígado, onde no diestro II a GPX tem o seu nadir; e, a GR, o seu pico (Pinto & Bartley, 1969).

Estudos com humanos demonstram haver uma correlação positiva entre as variações hormonais ocorridas na fase lútea tardia (que em nosso modelo equivale a manhã do proestro) e a atividade da enzima GPx, sendo que os hormônios que estão se elevando nessa fase, como o estradiol, poderiam induzir a atividade dessa enzima (Massafra *et al*, 1998).

Tais estudos ocorreram, assim, no intuito de se encontrar pontos de regulação e interação entre esses dois fenômenos biológicos, a formação de radicais livres e as alterações morfológicas do ciclo reprodutivo.

A descoberta da dependência da ação mediada das EROs, em alguns eventos do ciclo reprodutivo, como no caso da ovulação e da nidadação, fizeram com

que a investigação das interações entre esses dois processos ganhasse maior notabilidade.

Dentre alguns destes resultados podemos citar o aumento de cinco vezes na produção de  $O_2^-$  mediada pela proteína kinase C (PKC), via prostaglandinas mediada por ATP que ocorre em células da granulosa em vivo induzido pelo pico de LH que antecede à ovulação (Kodaman & Behrman, 2001).

A nidação é outro evento fisiológico que depende das EROS, onde a fusão das membranas, que é uma etapa crucial do processo só ocorre graças ao aumento da permeabilidade da membrana gerada em boa parte pela peroxidação de lipídeos locais, o que é fruto da ação de radicais livres, como superóxido. E tal como a fusão de membranas a vasculogênese que acontece no endométrio na fase secretora é dependente dos radicais livres (Chaves *et al*, 1993).

Assim, a fisiologia do ovário é um processo dependente do fino controle das espécies radicalares. E como exemplo, podemos citar ainda a presença das concentrações em níveis baixos de lipoperóxidos no ovário que, dessa maneira, preserva a atividade das cicloxigenases, que são importantes na gênese de superóxido e conseqüentemente na lise das células da granulosa do folículo e liberação do ovócito (Jozwik *et al*, 1999). Além disso temos ainda o LH que ao mesmo tempo que é capaz de aumentar a produção de superóxido, exerce uma ação protetora sobre a esteroidogênese em meios com grande concentração de peróxido de hidrogênio (Behrman & Aten, 1991).

E da mesma forma que a implantação adequada depende dos radicais livres de oxigênio, eventos patológicos podem ocorrer devido a um desequilíbrio na formação de superóxido, como o que ocorre na redução da formação de óxido nítrico, e que pode conduzir a patologias como a pré-eclâmpsia (Chaves *et al*, 1993).

## 2. OBJETIVO

---

Estudar as alterações do metabolismo de radicais livres, tais como o dano oxidativo em lipídeos pelos níveis de peroxidação lipídica, dano em proteína pela análise dos níveis de proteína carbonilada, o status de glutathiona; e também a atividade das enzimas antioxidantes durante as fases do ciclo reprodutivo de ratas em três diferentes órgãos, ovário, útero e adrenal.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3.1 Desenho experimental

O experimento foi conduzido em três etapas, no período de dois anos, sendo que cada uma ocorreu em épocas semelhantes de anos diferentes, como representado abaixo.

FASE I – 08.04.1999 – 03.06.1999 - experimento conduzido com 40 ratas distribuídas em 7 gaiolas expostas a um ciclo de luz e escuro de 14/10, em uma temperatura média de 26° C, por 35 dias.

FASE II – 19.07.2000 – 23.08.2000 - experimento conduzido com 34 ratas distribuídas em 6 gaiolas expostas a um ciclo de luz e escuro de 14/10, em uma temperatura média de 26° C, por 35 dias.

FASE III – 03.07.2001 – 07.08.2001 - experimento conduzido com 39 ratas distribuídas em 7 gaiolas expostas a um ciclo de luz e escuro de 14/10, em uma temperatura média de 26° C, por 35 dias.

#### 3.1.1 Animais e acondicionamento

Foram utilizados ao todo 123 ratas fêmeas adultas virgens, da cepa Wistar, adquiridas junto ao Biotério central da UnB, e acondicionadas no biotério da Faculdade de Saúde. As ratas apresentavam no primeiro dia do experimento uma massa corpórea em torno de  $216 \pm 16,7$  gramas (anexo C).

As ratas foram submetidas à uma dieta composta de ração comercial (Labina<sup>®</sup>) e água tratada potável em regime *ad libitum*.

Durante as três fases os animais foram expostos a um mesmo ciclo de luz e escuro, com mesmas variações de temperatura e umidade do ar, não havendo entre uma fase e outra do experimento variações sazonais. As fases do experimento foram realizadas no período da seca entre as estações do outono e inverno como pode ser observado no anexo B.

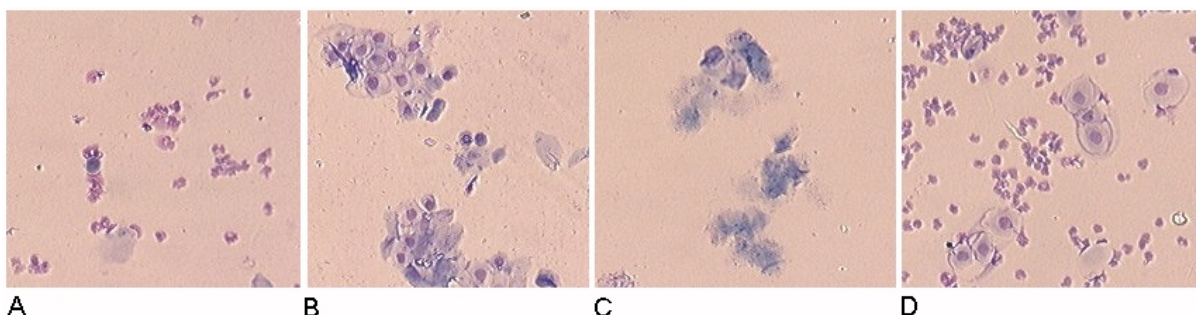
### 3.1.2 Observação e citologia vaginal

A coleta do esfregaço vaginal era feita sempre entre 9h00 e 12h00 da manhã, diariamente, por um período inicial de três semanas após as semanas de adaptação.

O esfregaço vaginal diário foi obtido por meio de um bastão de algodão embebido em solução fisiológica 0,9% introduzido na vagina do animal e girado delicadamente, sendo que o material colhido do interior da vagina era posteriormente transferido para uma lâmina onde era feita observação a fresco em microscópio óptico Zeiss®.

As fases do ciclo foram determinadas segundo os padrões representados na Figura 3. De acordo com a presença e número de células epiteliais nucleadas, queratinizadas e de leucócitos, determinou-se a fase em que se encontrava o animal (Schaberg *et al*, 1992).

As lâminas contendo o conteúdo do esfregaço vaginal, sempre foram lidas por uma mesma examinadora e divulgadas ao aluno apenas no momento do sacrifício para a identificação por grupos das fases do ciclo.



**Figura 3:** Citologia laminar coradas pelo método Papanicolau (Stockard & Papanicolaou, 1917), mostrando a variação celular no esfregaço vaginal em quatro diferentes fases do ciclo. As figuras A e D mostram as variações ocorridas no Diestro I e II onde vemos a presença de leucócitos entre poucas células epiteliais nucleadas ou células escamosas. Na lâmina B vemos o Pro-Estro com células epiteliais nucleadas e, a seguir, na lâmina C vemos as células queratinizadas de revestimento em aspecto de "tijolos", típicos da fase do Estro. Adaptado de <<http://137.222.110.150/calnet/Ovarian/page2.htm>> Acesso em: 16 fev. 2006.

Foram selecionadas para o sacrifício aquelas ratas que apresentavam, ao final de 21 dias de citologia vaginal diária, ciclos regulares de quatro ou cinco dias.

### **3.1.3 Sacrifício**

Os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina manual, tendo em seguida seus órgãos extraídos por dissecação; congelados em nitrogênio líquido e conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O sacrifício foi realizado em 4 dias consecutivos, de maneira que houvesse uma distribuição equitativa para as quatro fases.

Foram separados para a análise os cornos uterinos, e para o ovário e a, adrenal o órgão total.

### **3.2 Reagentes e preparo das soluções**

Foram utilizados os seguintes reagentes: 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNFH), Fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF), ácido 5,5' ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB), ácido tiobarbitúrico (TBA), butilato de hidroxitolueno (BHT), SOD de fígado bovino, Baker's yeast glutationa redutase (GR), 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB), glutationa reduzida (GSH), GSSG, NADPH, EDTA) obtidos junto a Sigma Chemical USA.

As soluções cujo preparo deveria ser realizado à temperatura ambiente foram confeccionadas em nosso laboratório a  $25^{\circ}\text{C}$ , seguindo os protocolos descritos a seguir.

### **3.3 Peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica pode ser quantificada através de diversos métodos dentre os quais selecionamos dois. O método que quantifica substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que mede o produto final da peroxidação lipídica e o método do alaranjado de xilenol, que quantifica produtos iniciais da ação dos lipoperóxidos. Sendo o TBARS um método clássico já bem estabelecido na literatura e o alaranjado de xilenol um método padronizado em nosso laboratório, que tem apresentado boa aceitação no meio científico para a dosagem de lipoperóxidos.



### 3.3.1 TBARS

O método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico é a muito tempo conhecido como método de quantificação de processos oxidativos principalmente em lipídeos, tendo seu emprego inicial ocorrido na indústria alimentícia.

O malonaldeído (MDA) é um complexo fruto da decomposição de hidroperóxidos, sendo que ao reagir com o TBA poderá formar o complexo TBA-MDA-TBA que possui seu pico máximo de fluorescência a 532 nm. E através da diferença de leitura espectrofotométrica a 532nm e 600nm é possível quantificar a presença do complexo formado pelo MDA e outros produtos da peroxidação lipídica da amostra (Bird & Draper , 1984).

Trata-se, portanto, de um método de quantificação de diversos produtos dos lipoperóxidos, mais de grande relevância científica.

A análise começava com a homogeneização do tecido em ácido fosfórico 1,1%, à 0°C. A diluição utilizada para o ovário e a adrenal foi de 1/80 e para o útero de 1/20.

Após a homogeneização eram separadas duas alíquotas de 400 µL, sendo uma para o teste e outra para o controle – branco. À amostra do teste era acrescentado 400 µL de uma solução de TBA 1% NaOH 50mM e ao branco mesmo volume de uma solução de HCl 3mM. A seguir, 200 µL de ácido fosfórico 7% foi acrescentado em cada uma das duas amostras.

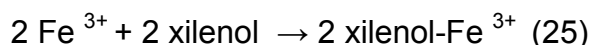
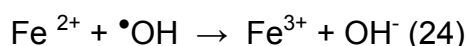
Os tubos contendo as amostras eram levados a seguir ao banho-maria em temperatura de 98°C por 15 minutos. Retirando e deixando as amostras a temperatura ambiente por 10 minutos e então acrescentados 1,5 mL de butanol ao recipiente do experimento e agitado em um vortex por 40 segundos.

As amostras eram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm e retiradas em seguida a fase orgânica, que seguia para leitura no espectrofotômetro HITACHI 1000. Lidas contra o branco, as amostras apresentavam duas leituras: uma a 532nm e outra a 600nm. O valor considerado para o cálculo era a subtração destes dois valores. Foi considerado para o cálculo final do teste o equivalente de extinção molar de 156mM<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Alaranjado de xilenol

Devido à importância da peroxidação lipídica e suas repercussões nas funções celulares durante o estresse oxidativo, tem-se a convicção de que a quantificação desse dano torna-se muito relevante e deve ser analisada pelo maior número de métodos disponíveis.

O método do alaranjado de xilenol é usado para quantificar a formação de  $H_2O_2$  em sistemas simples ou a observação de hidroperóxido na preparação de membranas (Jiang *et al*, 1992). No entanto a autooxidação do ferro promovida pelos peróxidos (reações de 23 – 25) também poderia ocorrer a partir de um hidroperóxido, o que torna possível assim observar a variação quantitativa desse evento e estabelecer uma relação com a concentração de liperóxidos presente em uma determinada amostra biológica.



O método baseado na formação do complexo xilenol-FeIII, que é induzida por peróxidos, lipoperóxidos, em pH ácido, é capaz de determinar a peroxidação lipídica no sistema, uma vez que o complexo xilenol-FeIII pode ser lido a 580 nm (Hermes-Lima *et al*, 1995). Essa medida, no entanto, não se baseia em valores exatos, mas na observação de um sinal amplificado através a adição do hidroperóxido de cumeno ao sistema.

O tecido foi homogeneizado em uma solução de metanol a 100% na proporção de 1:20, e seqüencialmente centrifugado por 5 minutos.

Em seguida, era preparada uma solução de 1mL contendo: 500  $\mu$ L de água, 250  $\mu$ L de solução de  $FeSO_4$  1mM, 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico 250mM, 100  $\mu$ L de solução de alaranjado de xilenol 1mM e ao final 50  $\mu$ L do homogenato centrifugado da amostra. A solução para a leitura era então incubada por 12 horas a temperatura ambiente e então lida a 580nm.

O valor da alíquota e do período de incubação foram definidos anteriormente de acordo com a construção de uma curva padrão, para definir-se um ponto mais adequado para quantidade de absorbância e estabilidade do complexo para a leitura.

Logo após a primeira leitura, era adicionada a cada amostra 5 $\mu$ L de solução de hidroperóxido de cumeno a 1mM e feita uma segunda leitura após 40 minutos. O valor de equivalentes de cumeno encontrado na amostra é obtido a partir de comparação da amplificação do sinal em relação ao acréscimo a quantidade de cumeno.

### **3.4 Proteínas carboniladas**

As proteínas em geral são um grupo de biomoléculas que sofrem os danos oxidativos através da oxidação de cadeias laterais principalmente aquelas ricas em metionina e cisteína, levando a formação de grupos fenólicos.

Para a dosagem dos níveis de danos em proteínas foi escolhido o método de proteínas carboniladas no qual observa-se a formação do complexo dinitro fenilhidrazina com os grupos protéicos formados a partir da ação do radical hidroxila ( $\cdot$ OH) nas moléculas. Tal composto reage com os grupos protéicos levando a formação de um composto amarelado que poderá ser lido por uma varredura entre 200 e 700nm com definição do pico de leitura quando comparado ao branco sem DNFH, de amostras lidas em triplicata (Fields & Dixon, 1975).

A amostras então eram homogeneizadas em ácido sulfasalícilico 5% em uma diluição de 1 parte de tecido para 19 partes de ácido. Após homogeneizado eram separadas duas alíquotas sendo uma para o teste e outra para o branco, no valor de 500 $\mu$ l cada.

As alíquotas eram então centrifugados por 5 min a 13,000 g e, após descartado o sobrenadante, eram acrescentados 500 $\mu$ l de HCl 2mM ao branco e 500 $\mu$ l de DNFH 10Mm ao teste. Agitando-se por 1 hora em intervalos de 10 min, era acrescentado ainda 500 $\mu$ l de ácido tricloroacético a 20% e centrifugada as amostras por mais 3 min a 5,000 g.

Descartava-se novamente o sobrenadante e lavava-se o pellet com acetato de etila/etanol na proporção de 1:1 e centrifugando a seguir, sendo esse processo

repetido por três vezes. Descartando-se o sobrenadante e acrescentando ao pellet Guanidina – HCl 6M, e aquecendo a 37° C por 15 min.

Por fim, centrifuga-se a amostra durante 5 minutos a 13,000 g e realiza-se uma leitura espectrofotométrica do sobrenadante, variando-se o comprimento de onda de 200 à 700 nm. Sendo que o maior número encontrado, foi aquele utilizado para o cálculo da concentração de proteínas carboniladas na amostra.

O cálculo da concentração de proteína carbonilada foi feito considerando o coeficiente de extinção molar de  $22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **3.5 Dosagem de glutathiona equivalente e oxidada.**

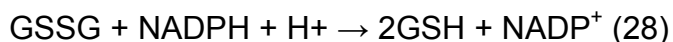
A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado pelo L-ácido glutâmico, a L-cisteína e a glicina. Pode atuar como antioxidante, ajudando a reduzir espécie radicalares através da ação da GPx (Figura1), além de ser co-fator de enzimas e auxiliar no transporte transmembrana de aminoácidos.

A ação antioxidante da GSH deve-se ao fato de que a oxidação do seu grupo tiol, que forma entre outros compostos a glutathiona dissulfeto (GSSG), é capaz de reduzir espécies radicalares. E mais recentemente, atribui-se ao estresse oxidativo um fenômeno chamado de glutathionação de proteínas, onde a glutathiona ligaria-se a resíduos de cisteína de grupamentos protéicos (Niture *et al*, 2005).

A glutathiona pode ter uma produção local ou ser exportada para outros órgãos, sendo que o consumo de GSH pelos processos de destoxificação locais leva a um aumento da GSSG.

Assim o índice GSHeq/GSSG é capaz de indicar o consumo de GSH pelos processos de destoxificação de radicais livres, sendo então um excelente indicador de estresse oxidativo.

A glutathiona pode reagir com o composto DTNB, formando o Ácido 5 – tio-2-nitrobenzoico (TNB), um composto amarelo que pode ser lido a 412 nm, reações 26 e 27, e através desse principio é possível quantificar a glutathiona total no sistema (Griffith, 1980).



No entanto para medir-se a quantidade de GSSG no sistema é necessário a pré-incubação com a 2-vinilpiridina. Esse composto liga-se ao grupo tiol da glutatona e impede que a glutatona reduzida reaja com o DTNB, sem, no entanto inibir a ação da glutatona redutase (GR) o que garante que a reação GSH - DTNB só ocorreria a partir da glutatona dissulfeto existente no sistema reduzida pela ação da GR (reação 28).

Por fim a velocidade de formação do complexo é comparado a uma curva padrão com concentrações conhecidas de GSH e GSSG, para o cálculo da concentração na amostra.

A dosagem do antioxidante endógeno, glutatona, foi feita utilizando-se amostras de tecido congelado homogenizadas em ácido sulfasalicílico 5% em uma proporção de uma parte de tecido para nove de ácido. Em seguida o homogenato foi borbulhado em N<sub>2</sub> gasoso 100% por 20 minutos e centrifugados por 5 minutos a 5,000g. O sobrenadante foi utilizado para as análises.

As amostras em seguida foram separadas em duas alíquotas, uma para dosagem de GSHeq ou total e outra para a GSSG ou glutatona dissulfeto.

A primeira alíquota, com cerca de 10 µl, foi utilizada para a dosagem de GSHeq ou glutatona total e foi misturada a uma solução de GR (1 U / ml), tampão Kpi 100mM (pH 7,0), 0.25 mM NADPH, e DTNB a 0.6mM, e o coeficiente da reta comparado a uma curva padrão, sendo assim determinado os valores de glutatona da amostra. A outra alíquota com 50 µl da amostra foi tratada com 40 µl de 2-vinil piridina 0.5 M por 1 hora a temperatura ambiente e o pH ajustado em torno de 7.0 com NaOH, recebendo em seguida uma solução de GR (1 U / ml), tampão Kpi 100mM (pH 7,0), 0.25 mM NADPH, e DTNB a 0.6mM, onde o coeficiente da reta foi comparado a uma curva padrão para determinação dos valores de glutatona oxidada da amostra .

### **3.6 Medida da atividade das enzimas antioxidantes.**

#### **3.6.1 Preparo dos extratos de tecido.**

As amostra congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , foram pesadas e imediatamente após a retirada do congelador, foram acondicionadas em nitrogênio líquido, de onde foram retiradas para ser homogenizadas, a temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$ , em tampão fosfato 50mM e EDTA 0.5mM, em uma diluição de 1:20 contendo 1% de PMSF 0.5mM.

O homogeneizado foi centrifugado a 18,000 g por 5 minutos a uma temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi removido e utilizado para os ensaios enzimáticos.

#### **3.6.2 Glutaciona reductase - GR e glutaciona-S-transferase - GST**

A GSH tem seus níveis mantidos pela ação de 2 enzimas que participam de seu processo de síntese a  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase e a glutaciona sintetase pela via de novo e através da reciclagem da GSSG o que é feito pelo enzima glutaciona reductase (GR) (Hermes-Lima, 2004).

Assim, a GR é responsável pela reciclagem de produtos da oxidação do tripeptídeo glutaciona, transformando, por exemplo, uma molécula de GSSG em duas outras de GSH com o consumo de duas moléculas de NADPH, como ilustrado na Figura 1. Assim a atividade da GR pode ser medida observando-se a oxidação do NADPH.

Então, a partir deste princípio, foi adicionada uma alíquota de 0.25mM de NADPH em um meio contendo GSSG 0.4mM e 20 $\mu\text{l}$  de extrato de tecido fresco (contendo a enzima) em meio tamponado com tampão A (KPi 50mM pH 7,0 com EDTA 0,5mM); tudo em um volume final de 1 ml (Kum-Tatt *et al*, 1975).

Sendo o coeficiente de extinção molar do NADPH é de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , e considerando que uma mili-unidade é a quantidade de enzima que capaz de reduzir 1 nmol por minuto do complexo de glutaciona oxidada, consumindo para isso 1 nmol de NADPH por minuto; podemos assim definir a quantidade de GR na amostra, considerando nos cálculos os fatores já mencionados e as diluições que amostra sofreu até a leitura.

A enzima GST é capaz de destoxificar peróxidos, dentre os quais alguns lipoperóxidos. Sua atividade medida através de uma leitura espectrofométrica à 340 nm, da conjugação do GSH 1mM com CDNB 1mM ocorrida pelo acréscimo de 20 µl do extrato em uma solução final de 1ml; sendo tudo realizado em meio tamponado com tampão A (Kraus, 1980).

O valor real da atividade da GST foi encontrado considerando que uma mili-unidade é a quantidade de enzima que capaz de formar 1 nmol por minuto do complexo de glutatona oxidada, que no ensaio é percebido pela formação do complexo GSH – CDNB. Sabendo que o produto formado da conjugação do CDNB com GSH tem um coeficiente de extinção molar de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , podemos assim definir a quantidade de GST na amostra.

### **3.6.3 Atividade total de glutatona peroxidase (GPx).**

A GPx pertence ao grupo das enzimas conhecidas como peroxidases responsáveis pela destoxificação de espécies radicalares, reduzindo a GSH para a destoxificação de peróxidos em especial, do peróxido de hidrogênio, como visto na Figura 1. A GPx pode ter várias isoformas, sendo uma das mais conhecidas a selênio dependente Se-GPx, que está amplamente distribuída em vários tecidos (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002).

A dosagem da atividade da GPx foi feita considerando a atividade total de glutatona peroxidase, por ser um método mais abrangente de dosagem da atividade deste grupo de enzimas.

A medida da atividade foi realizada através da observação da degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e por ter em seu mecanismo a dependência da reciclagem da GSH para a manutenção de seu sistema de reação, esse ensaio é feito com uma reação casada envolvendo a GR e NADPH 0.25mM. E por exercer ainda uma atividade que é compartilhada por outras enzimas, sendo a principal delas a SOD, é necessário utilizar um inibidor enzimático que aqui foi feito pela ázida sódica. Assim, foi observado inicialmente o consumo basal de NADPH 0.25mM em uma solução tamponada com tampão A contendo Azida sódica 2mM, GSH 5mM, 1.5U GR e 20µl da amostra; em seguida acrescentado 20µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em uma concentração final de 0.2mM, sendo observado o consumo do NADPH como substrato da reação (Flohe & Brand, 1969).

O cálculo da concentração de GPx foi efetuado considerando que uma miliu- unidade é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 nmol por minuto do de NADPH. Sabendo-se que a oxidação do NADPH ocorre com um coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pode-se assim definir a quantidade de GPx na amostra.

#### **3.6.4 Superóxido dismutase – SOD**

A SOD é uma das enzimas responsáveis pela dismutação do superóxido. Como discutido anteriormente, isso ocorre através da redução de uma molécula da NADH. Assim, sua atividade pode ser medida através do consumo de NADH. Para isso, no entanto, é necessário um ambiente controlado onde se tenha certeza que o consumo ocorre em razão apenas da dismutação do  $\text{O}_2^-$ , e de que esta esteja ocorrendo em razão exclusiva da ação da SOD. O método usado foi descrito por Paoletti e colaboradores (Paoletti *et al*, 1990).

A produção de superóxido no sistema é induzida a partir do mercaptoetanol que, na reação de seu grupo disulfeto com o oxigênio molecular, doa a esse um elétron, levando-o a formar um radical superóxido. Esse radical alimenta o sistema que através da ação da SOD dismuta o  $\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumindo para isso duas moléculas de NADH.

Dessa maneira, a medida da atividade da SOD é feita a partir da leitura da formação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em uma amostra contendo uma mistura de 300  $\mu\text{l}$  de uma solução com EDTA 5mM,  $\text{MnSO}_4$  2.5mM e 2 – mercaptoetanol 4mM; 100  $\mu\text{l}$  de NADH 0.25mM; e 50  $\mu\text{l}$  de amostra do homogeneizado de tecido fresco.

#### **3.6.5 Determinação de proteínas solúveis totais**

Todas as enzimas tiveram seus valores de atividade calculados em U/mg de proteína. Para isso o valor do coeficiente da reta foi multiplicado pela diluição da amostra, pelo coeficiente de redução molar da enzima e pela concentração de proteínas no tecido.



Sendo necessária assim, a medida da concentração de proteínas da amostra. A medida foi feita do sobrenadante dos homogenizados utilizados na dosagem da atividade enzimática. O sobrenadante foi levado a uma reação com um corante de proteínas e comparado posteriormente com uma curva padrão de soro de albumina bovina seguindo o método de Bradford, como já descrito na literatura (Bradford, 1976).

### **3.7 Análise estatística.**

A análise estatística foi realizada com o programa MYNOVA utilizando-se o teste de análise de variância ANOVA e SNK (pós -anova), para comparação entre múltiplos grupos. Foram considerados a média e o erro padrão para cada fase em cada análise. A diferença de estatística foi considerada significativa quando  $p < 0,05$  e como tendência os valores que nos testes apresentavam  $p < 0,1$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

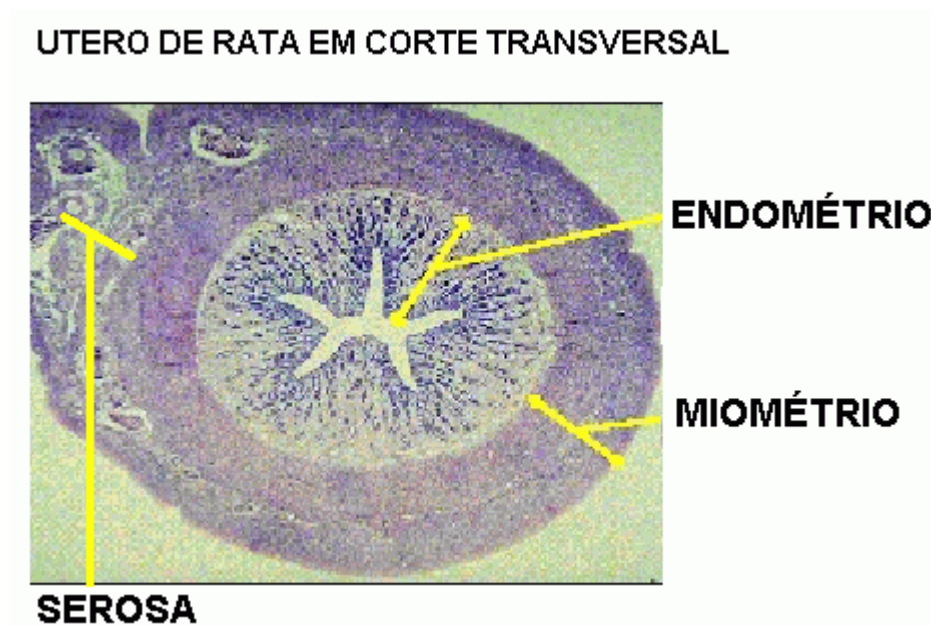
---

### 4.1 Metabolismo de radicais livres no útero de ratas durante ciclo estral.

#### 4.1.1 O útero e os radicais livres

O útero é um órgão muscular presente em todos os mamíferos e apresenta, nos mamíferos placentários, alterações morfofuncionais cíclicas que acompanham as flutuações dos hormônios sexuais.

Possuem uma camada externa de tecido conjuntivo de revestimento chamado serosa, uma camada muscular intermediária chamada miométrio e uma camada mais interna conhecida por endométrio. Figura 4.



**FIGURA 4:** Microscopia com coloração em Hematoxilina e Eosina. Amostra de útero de rata na fase do Estro corte transversal mostrando as três camadas, serosa, miométrio e endométrio. Adaptado de <http://www.uoquelpb.cazoologydevobiosplab9sld005.html> Acesso em :20 jan. 2006.

O útero de ratas é um útero bicornio pela fusão incompleta dos ductos mülerianos que ocorre nessa espécie. A parte inferior do útero estende-se desde o ístimo do útero até a vagina e é dividido em uma parte supravaginal e outra vaginal.

As modificações decorrentes no miométrio e principalmente no endométrio durante o ciclo reprodutivo e suas relações com as alterações oxidativas, levaram-nos a investigar a presença de danos oxidativos e a atividade de enzimas antioxidantes nesse órgão.

É importante lembrar ainda algumas peculiaridades que envolvem o útero e o metabolismo oxidativo, como é o caso da presença de NO sintetase induzida (iNOS), uma enzima que está presente em tecidos inflamatórios. No útero, a sua ação colabora com a manutenção dos níveis de NO altos durante a gestação. Essa enzima, que está presente nos leucócitos, pode ser encontrada também no endométrio, no músculo miometrial e no endotélio uterino de forma inesperada, uma vez que essa isoforma da NO sintetase só é encontrada em tecidos inflamatórios.

A inibição da enzima NO sintetase constitutiva (cNOS), durante o pico de estrogênio, é um outro fato que estimula a investigação dos radicais livres durante o ciclo estral, dado que a ação dessa enzima está estreitamente ligada ao metabolismo oxidativo, e sua atividade varia durante o ciclo estral (Huang *et al*, 1995).

Dessa maneira, a queda do estrogênio possibilita um aumento da atividade da iNOS e cNOS o que conduz a um aumento de NO na fase secretória, provocando assim um miorelaxamento da musculatura uterina e preparando o útero para a nidificação (Chaves *et al*, 1993). No entanto, estes processos ocorrem graças à ação parácrina e autócrina, que se verifica por meio da liberação de produtos da inflamação nas células do miométrio e endotélio, e não pelo controle gênico dos hormônios esteróides.

As mudanças devidas ao metabolismo oxidativo no útero podem ser tanto patológicas quanto fisiológicas. Nas patologias uterinas, temos, por exemplo, doenças como a endometriose e a adenomiose que em estudos recentes demonstram que a super expressão de SOD e a presença da GPx com atividade elevada poderiam levar a uma produção anormal de hidroxil, que associada a uma produção excessiva de NO, no tecido endometrial, seria responsável pela manutenção da doença (Ota *et al*, 2000).

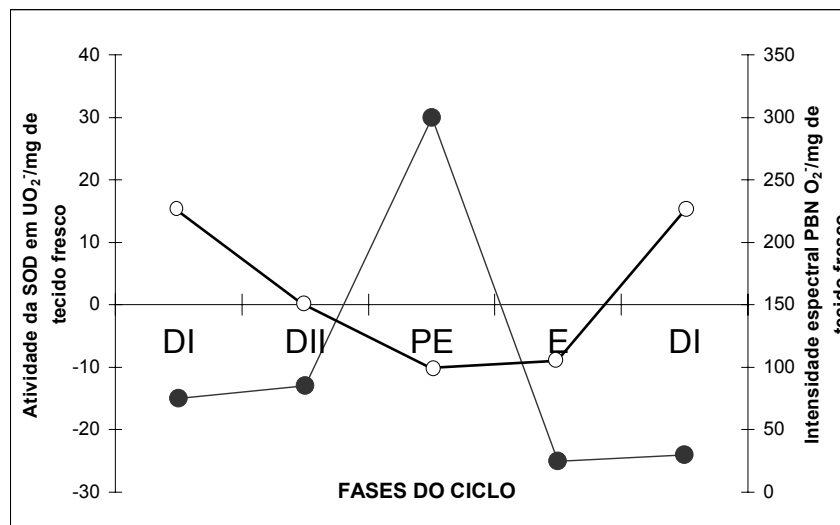
Na adenomiose e no câncer de endométrio, a atividade aumentada da GPx parece contribuir para o desenvolvimento da doença uma vez que tal alteração pode auxiliar o tecido doente a escapar da ação dos mecanismos imunológicos que as levariam à resolução. Contudo, estas mesmas variações na atividade da GPx estão

associadas a um bom prognóstico no tratamento do câncer de endométrio (Ohwada *et al*, 1996).

Eventos fisiológicos, como o edema que ocorre no endométrio durante a fase proliferativa do ciclo reprodutivo (que vão desde a manhã do diestro I até à manhã do proestro), teriam como um de seus mecanismos de gênese o aumento do GMPc, conhecido fator de controle do crescimento celular, devido aos níveis aumentados da enzima guanilil ciclase, sendo a atividade desta enzima regulada pelos níveis de superóxido (Laloraya *et al*, 1991).

Na fase secretora do ciclo, quando temos a queda do nível de estrogênio, existe um aumento da atividade da SOD em camundongo que leva a uma redução dos níveis de superóxido e a interrupção da fase proliferativa (Brown & Setchell, 2001 e Jain *et al*, 1999).

Encontramos dados na literatura que associam a queda da SOD no tecido uterino ao aumento de superóxido na fase do proestro como demonstrado no Gráfico 1.



**Gráfico 1:** Variação dos níveis de atividade de (o) SOD e de produção de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), representado por (●) durante as fases do ciclo estral. Adaptado de Laloraya *et al*, 1991.

Na literatura bio-médica, existem alguns trabalhos que somam esforços para obter uma maior compressão do metabolismo de radicais livres durante o ciclo estral/menstrual no útero, dentre os quais citamos:

**Quadro 2:** Evidências na literatura sobre ação dos radicais livres no útero.

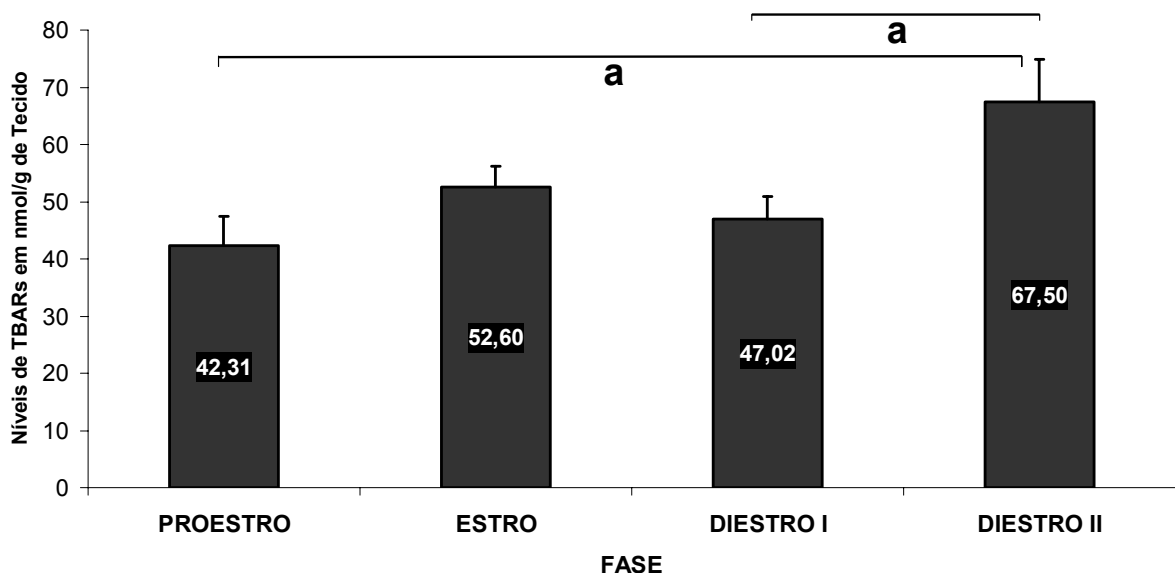
DADO	FONTE	ANIMAL
Níveis em homogenato de útero de: SOD – 9.26 U/ mg de proteína GSH – 0.93µg / mg de proteína NADPH citocromo c redutase – 13.25 U/mg de proteína	Devasagayam, 1986.	RATO
SOD em útero de ratas, com valores em torno de 30 U/mg de tecido fresco, apresenta uma queda do D I para o D II e do D II para o pró – Estro sendo a queda acompanhada por uma ascensão dos níveis de superóxido nos mesmos períodos	Laloraya <i>et al</i> , 1991.	RATO
GPx apresenta uma atividade maior em ratas ooforectomizadas que recebem E <sub>2</sub> (142 mU/mg de proteína) do que em ratas que receberam apenas progesterona (78 mU/mg de proteína).	Ohwada <i>et al</i> , 1992.	RATO
A GPx apresenta atividade maior em tecido com câncer endometriais (97 mU/mg de proteína) do que em tecidos endometriais normais (50 mU/mg de proteína)		HOMEM
Aumento nos níveis de MDA de 20 mM/mg de tecido fresco / min para cerca de 55 do DI para o PE em útero de camundongos	Jain <i>et al</i> , 1993.	CAMUNDONGOS
Existe um aumento da expressão do gene da iNOS no Diestro que diminui com o aumento dos níveis de Estrogênio.	Huang <i>et al</i> , 1995.	HOMEM
Valores de purificação de GST no útero mostram atividade em torno de 20 mU/mg de proteína	Singhal <i>et al</i> , 1996.	RATO
Aumento da atividade da NADPH oxidase, o que indica aumento na formação de superóxido da fase do D I para o D II e do DII para o Proestro em útero de camundongos.	Jain <i>et al</i> , 2000.	CAMUNDONGOS
GPx em tecido humano de adenomiose e endometriose aumentada na fase secretória em torno de 100% quando comparada ao normal	Ota <i>et al</i> , 2000.	HOMEM
GR aumenta no Diestro I ou Meta Estro quando comparado as outras fases do ciclo.	Kaneko <i>et al</i> , 2001.	RATO
Administração de E <sub>2</sub> diminui a produção de *NO Mediada por guanilil ciclase	Krumenacker <i>et al</i> , 2001.	RATO
Existe aumento na quantidade de MDA e na atividade da catalase por ocasião de TRH em ratas ooforectomizadas.	Gómez-Zubeldia <i>et al</i> , 2002.	RATO

Dessa maneira, o estudo do metabolismo de radicais livres no útero tem avançado de maneira pontual; necessitando, portanto, de um trabalho descritivo mais abrangente, de modo a tornar evidente a integração entre as diferentes etapas do metabolismo radicalar nesse órgão.

#### 4.1.2 Peroxidação lipídica no útero durante o ciclo estral de ratas.

Os resultados de peroxidação lipídica foram obtidos a partir da dosagem dos aldeídos a partir de dois métodos distintos: TBARS e alaranjado de xilenol.

Na dosagem dos níveis de TBARS, observamos um aumento dos níveis de produtos da peroxidação lipídica da ordem de 43% do diestro II, quando comparado ao diestro I e de 59% quando comparado o diestro II ao proestro. Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação das demais fases entre si (Gráfico 2).

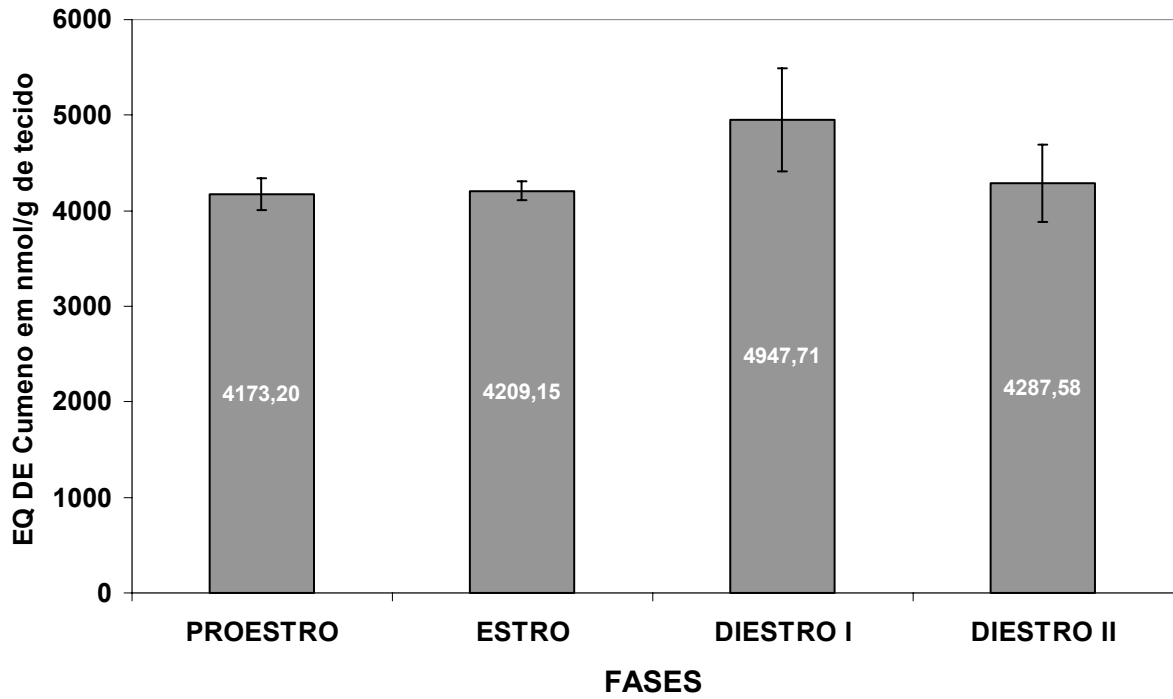


**Gráfico 2:** Variação dos níveis de TBARS em útero de ratas em quatro fases do ciclo estral de ratas. Os grupos em cada uma das fases do pró – estro e estro possuem  $n = 11$ , diestro I  $n = 10$  e diestro II  $n = 8$ . As amostras da análise vieram dos animais da FASE I do experimento. O teste revelou  $p < 0,025$  pelo ANOVA SNK e entre os grupos foi encontrado  $p < 0,05$  para (a).

Na formação de equivalentes de cumeno pelo método alaranjado de xilenol, não foram observadas variações estatisticamente significativas ao longo das fases do ciclo estral, como pode ser observado no Gráfico 3.

As discrepâncias entre os números de TBARS e do alaranjado de xilenol podem ocorrer, pois estes métodos quantificam produtos diferentes da peroxidação

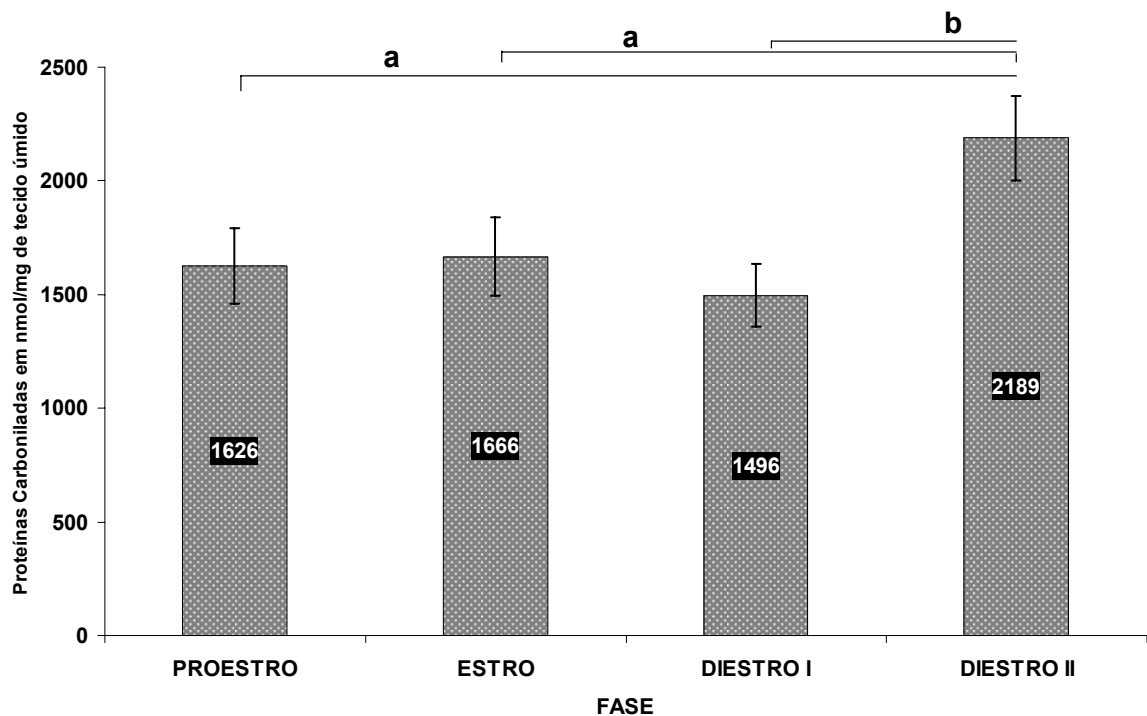
lipídica. O TBARS quantifica produtos finais em geral aldeídos; ao passo que o xilenol detecta produtos intermediários que são os peróxidos.



**Gráfico 3:** Variações nas medidas de equivalentes de cumeno em útero de ratas pelo método do alaranjado de xilenol. Todos os grupos com  $n = 6$  de amostras da FASE III do experimento. Não houve diferença estatística significativa entre as fases.

#### 4.1.3 Proteína carbonilada no útero durante o ciclo estral de ratas.

Os valores de danos oxidativos em proteínas, no útero de ratas, revelam um aumento significativo nos níveis de proteínas carboniladas na fase do diestro II, quando comparados as demais fases.



**Gráfico 4:** Concentração de proteínas carboniladas em útero de ratas nas quatro diferentes fases do ciclo estral. Com n igual a 9 para o Estro e 8 para as demais grupos, as amostras utilizadas foram obtidas dos animais da FASE I do experimento. Pelo teste ANOVA SNK, existe diferença entre o Diestro II e as demais fases do ciclo reprodutivo sendo (a) para  $p < 0,01$  e (b) para  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Glutathiona total e oxidada no útero durante o ciclo estral de ratas.

Os níveis totais do antioxidante endógeno glutathiona (GSHeq), no útero, apresentam um aumento a partir da fase do proestro (PE) em relação às demais fases. Contudo, não foram observadas diferenças nos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) nas diferentes fases do ciclo.

O índice calculado entre a razão de glutathiona total e glutathiona oxidada (GSHeq/GSSG), que é um indicador preciso de estresse oxidativo (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002), mostra uma tendência de aumento ( $p < 0,1$ ) da fase do proestro para a do diestro II, o que demonstra ocorrer, nesse momento do ciclo, um aumento do dano oxidativo.



**Tabela 1** – Níveis de glutatona em útero de ratas durante as fases do ciclo estral.

FASE	Glutaciona em nmol / g de tecido úmido			n
	GSHeq	GSSG <sup>2</sup>	GSHeq/GSSG <sup>2</sup>	
<b>PROESTRO</b>	559,5 ± 65,0 <sup>1</sup>	4,18± 0,51	20,61 ± 15,55	5
<b>ESTRO</b>	1201,5 ± 196,3	4,54 ± 0,73	27,36 ± 15,65	5
<b>DIESTRO I</b>	1586,5 ± 146,3	4,8 ± 1,08	33,19 ± 14,62	5
<b>DIESTRO II</b>	1283,6 ± 240,2	4,85± 0,74	38,45 ± 20,39	4

Animais obtidos na FASE III do experimento.

1: Valores diferentes significativamente das demais fases,  $p < 0,025$ , teste Anova SNK.

2: Não há diferenças significativas entre as quatro fases para GSSG e GSH/GSSG.

#### 4.1.5 Atividade das enzimas antioxidantes no útero durante o ciclo reprodutivo

A atividade da GST mostra-se aumentada em 108%, no diestro II, em relação ao proestro; de 150% em relação ao estro e de 11%, em relação ao diestro I. Um aumento da atividade dessa enzima também foi encontrado quando comparada à fase do diestro I com o proestro (60%) e o estro (93%).

Os valores encontrados em nossos experimentos estão em conformidade com os já descritos na literatura para GST (Singhal *et al*, 1996), considerado aqui valores pequenos, quando comparados a níveis encontrados em outros tecidos biológicos (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002).

A atividade da GR mostra uma tendência ( $p < 0.1$ ) de queda no proestro em relação às demais fases do ciclo estral.

A atividade da glutatona peroxidase (GPx) não mostrou diferenças quando determinada nas três primeiras fases; não se observou a atividade em Diestro II por insuficiência de material. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) variou entre 56,2 e 107,9 mU/mg de proteína, resultados muito próximos aos já descritos anteriormente para atividade dessa enzima neste tecido (Laloraya *et al*, 1991).

**Tabela 2** – Flutuação da atividade das enzimas antioxidantes em útero de ratas durante o ciclo estral.

FASE/ENZIMA	GST (mU/mg ptn)	GR <sup>3</sup> (mU/mg ptn)	GPX (mU/mg ptn)	SOD (U/mg ptn)
<b>PROESTRO</b>	22,9 ± 1,4 (4) <sup>1,2</sup>	92,2 ± 24 (3)	203,5 ± 173,1 (3)	73,35 ± 7,81 (2)
<b>ESTRO</b>	19,0 ± 0,9 (3) <sup>1,2</sup>	209 ± 47 (3)	173,2 ± 84,2 (3)	107,9 ± 19,8 (2)
<b>DIESTRO I</b>	36,7 ± 4,3 (4) <sup>1,2</sup>	78,7 ± 14 (3)	246,9 ± 100,1(3)	56,21 ± 28,9 (2)
<b>DIESTRO II</b>	47,6 ± 2,9 (4) <sup>1</sup>	144,3 ± 31 (3)	nd	95,5 ± 34,8 (2)

Os números representam a média e o erro padrão, sendo os valores de n representados entre parênteses.

1: Variação significativa na atividade de GST com  $p < 0,005$ , ANOVA SNK.

2: Variação significativa na atividade de GST com  $p < 0,01$ , ANOVA SNK.

3: Variação da atividade da GR mostrando discreta tendência,  $p < 0,1$ , ANOVA SNK.

nd: não determinado

#### 4.1.6 Discussão

Na fase do diestro I e diestro II ocorre no útero a resolução da apoptose iniciada no estro e uma intensa fase proliferativa. Tal evento deve-se ao fato de nessa etapa do ciclo estral haver um intenso crescimento celular com síntese de DNA promovido pelos níveis crescentes de estradiol; o que demanda, por sua vez, um grande consumo de oxigênio, podendo assim ocasionar a formação de radicais livres nesse órgão (Quarmby & Korach, 1984). Somado-se a isso temos a migração de neutrofilos e macrófagos, bem como a sua desgranulação, que ocorre no tecido endometrial durante a fase do edema são estimuladas pelo estradiol e reguladas de maneira negativa pela progesterona, o que sugere o estresse oxidativo também no diestro II. (Tibbetts et al, 1999).

Dados da literatura mostram que em útero de camundongos existe um aumento crescente dos níveis de TBARS e dos níveis de superóxido, com uma queda da atividade da SOD nas fases do diestro I e II (Jain *et al*, 1993; Laloraya *et al* 1991). Somado-se a esse fato, observa-se o aumento dos níveis de estrogênio produzido por meio da reposição hormonal em ratas ooforectomizadas causa um aumento da peroxidação lipídica e a uma redução da atividade da catalase (Gómez-Zubélia *et al*, 2001), o que nos faz pensar que a ascensão dos níveis de estrogênio durante o diestro I e II poderia ser responsável por um aumento no dano oxidativo no útero.

Temos ainda que as semiquinonas, produtos da degradação dos estrogênios, são responsáveis por dano em proteína e que sua produção pode ser catalisada por

uma reação dependente de glutathione (Lauren & Gautam, 1998). (vide obs orientador)

Mediante o exposto, nossos resultados demonstram um aumento dos níveis de peroxidação lipídica e nos danos oxidativos em proteína durante a fase do diestro II. Estes fatos somam-se aos dados da literatura, na observação de estresse oxidativo durante essa etapa do ciclo.

A proteína carbonilada, por ser uma molécula mais estável e formar complexos insolúveis, necessita da ação de proteases intracelulares para sua destoxificação (Hermes-Lima, 2004). Sua presença em altos valores é, portanto, um dos melhores marcadores de danos oxidativos 'mais antigos' ou de envelhecimento. Isso nos leva a crer que o dano oxidativo acumulado ao longo das quatro fases é removido após a fase do diestro II, à semelhança do que ocorre com a queda da peroxidação lipídica observada no útero do diestro II para o proestro (pode ser devido aos aldeídos desidrogenases) (Zusterzeel *et al*, 1999).

O aumento da atividade da GST no diestro II e sua posterior queda no proestro sugerem uma resposta ou sinal de regulação redox, uma vez que sua atividade não é alta o suficiente para que ela exerça seu papel de destoxificação de aldeídos e peróxidos. A GR, por sua vez, apresenta um aumento na fase do diestro I ou meta-estro descrito na literatura (Kaneko *et al*, 2001), que pode ser considerado como um *preparo para o estresse oxidativo* no diestro II, assim como o aumento na síntese de glutathione total do proestro para o estro. A glutathione do útero também pode ser exportada para os fluidos do trato reprodutivo, o que é vital para a sobrevivência do blastocisto (Salmen *et al*, 2005).

A glutathionação de proteínas pode ser uma outra explicação para a queda que ocorre na glutathione total do diestro II para o proestro, fenômeno esse decorrente de estresse oxidativo que levaria a uma perda das junções do tipo gap entre as células miométriais (Caruso *et al*, 2005), fundamental às alterações fisiológicas do útero durante o ciclo estral.

As alterações endometriais ocorridas na fase do diestro I e II encontram em nossos resultados uma sugestão para a regulação do balanço redox do útero durante o processo proliferativo endometrial, uma vez que nessa fase temos um aumento do RNAm de proteínas reguladoras de genes que estimulam a proliferação endometrial como o *c-fos* que tem seus níveis aumentados no diestro I e permanece alto no diestro II, quando então passa a cair (Mendoza-Rodrigues *et al*,

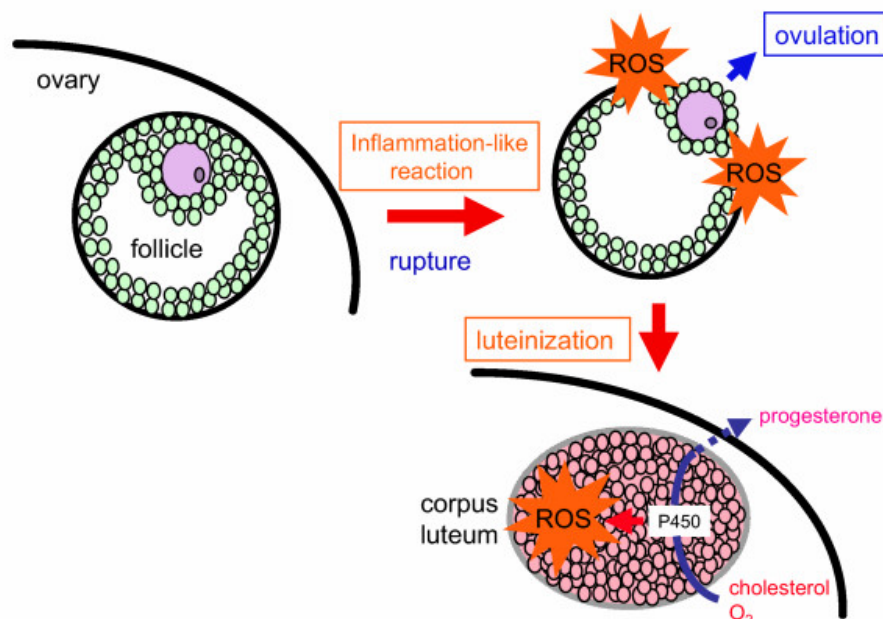
2003). E como dito anteriormente, os níveis de proliferação podem conduzir a um estresse oxidativo.

## 4.2 Metabolismo de radicais livres no ovário de ratas durante ciclo estral

### 4.2.1 O ovário e os radicais livres

O entendimento dos processos metabólicos do ovário avançou enormemente nos últimos tempos, graças às recentes descobertas envolvendo a pesquisa de radicais livres.

A ruptura folicular e a luteólise, são eventos fisiológicos do ovário com uma estreita relação com as EROs (Fujii *et al*, 2005). Por serem eventos inflamatórios e que envolvem ruptura celular, a ação dos radicais livres tem sido proposta como parte elementar no dano oxidativo de membranas destes processos ovarianos.



**FIGURA 3:** Participação das espécies reativas de oxigênio durante a ovulação e esteroidogênese no corpo lúteo. Adaptado de Fujii *et al*, 2005.

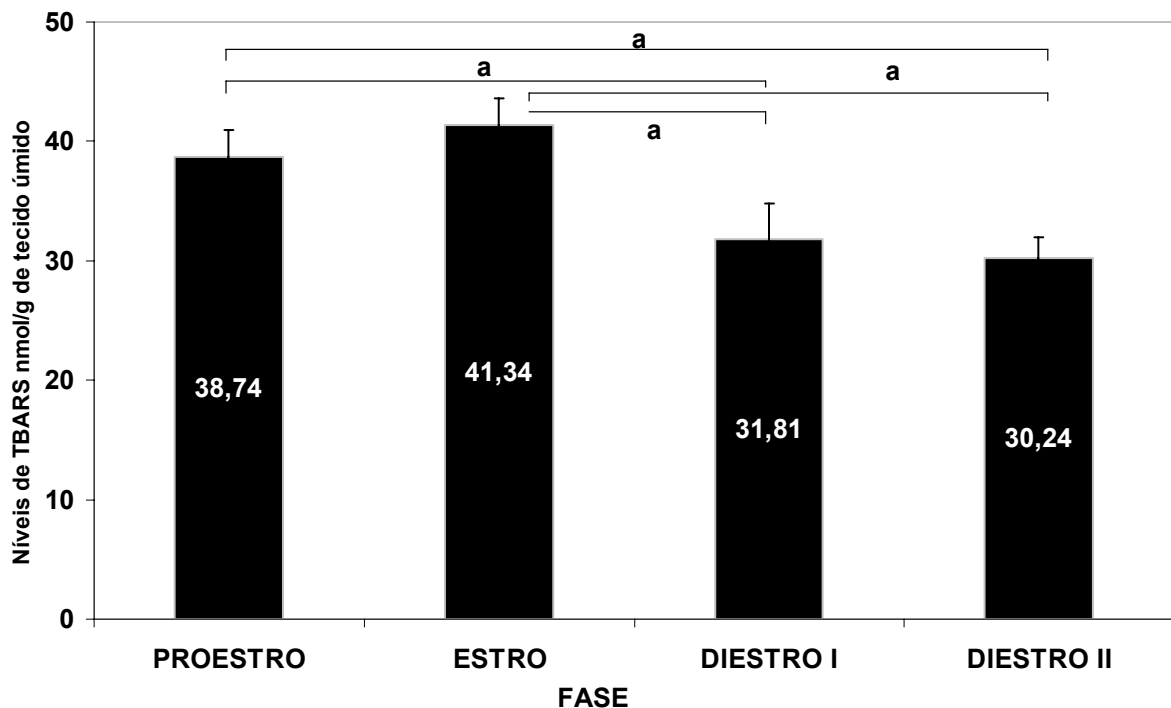
A esteroidogênese tem sido descrita como um fenômeno dependente da ação efetiva das espécies radicalares, como acontece na formação da progesterona no

ovário que ocorre, via citocromo P450, com a participação de radicais livres. No entanto, a produção dos esteróides pode também ser inibida pelo excesso de radicais livres; uma vez a alta produção destas espécies químicas levaria à formação de lipoperóxidos, os quais diminuem a sensibilidade dos receptores de LH e FSH dependentes de AMP cíclico no ovário (Margolin *et al*, 2001). Dessa maneira, um fino controle deve ser exercido para que o bom desempenho dos processos fisiológicos no ovário seja garantido.

As mudanças celulares que podem advir das variações hormonais do ciclo reprodutivo, no ovário, tornam-se assim objeto da nossa investigação.

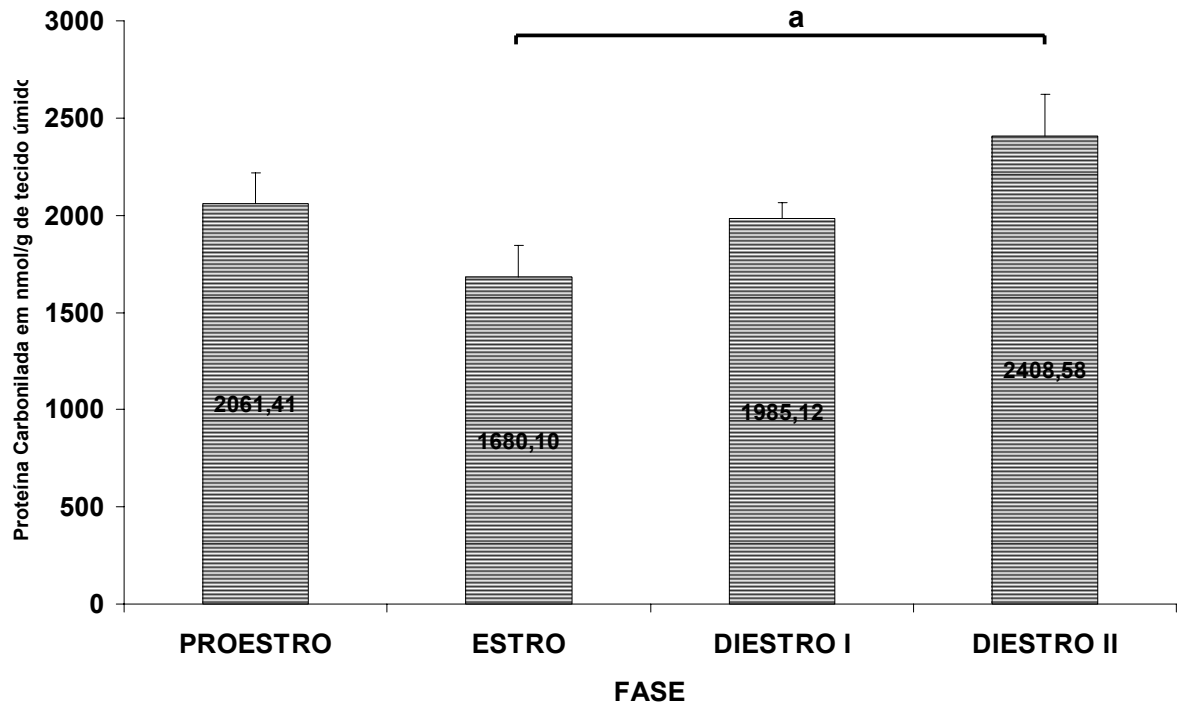
#### 4.2.2 Peroxidação lipídica e danos oxidativos em proteínas do ovário durante o ciclo estral de ratas.

Ao analisarmos as amostras pelo método do TBARS, observamos um aumento dos níveis de peroxidação nas fases do proestro e estro, quando comparada às fases do diestro I e do diestro II (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Dosagem de produtos da peroxidação lipídica em ovário de ratas durante o ciclo estral. Os grupos são formados por animais vindos da FASE III do experimento e cada grupo é formado por um n = 6 a menos do Diestro I, que foi analisado a partir de um n = 4, onde (a) significa diferença com p < 0,05.

Foi constatado ainda um aumento de 43% nos níveis de proteína carbonilada na fase do diestro II em relação ao estro.



**Gráfico 6:** Dosagem de proteínas carboniladas em ovário de ratas nas quatro diferentes fases do ciclo estral. Com n igual 9 para o estro e diestro II de 11 para o proestro e 8 para o diestro I, as amostras utilizadas foram obtidas dos animais da FASE I do experimento. Pelo teste ANOVA SNK existe diferença entre o diestro II e estro sendo (a) para  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3 Dosagem de glutathiona total equivalente e glutathiona oxidada em ovário durante o ciclo estral de ratas.

Ao dosar os níveis de glutathiona total encontramos uma queda dos valores na fase do diestro II para o proestro de 63%. Tal redução é acompanhada de um aumento dos números de GSSG na fase do diestro II de 6 vezes em relação ao proestro e de 5 vezes em relação ao diestro I.

A análise da relação GSHeq/GSSG demonstrou uma queda dessa razão no diestro II quando comparado ao proestro (89%), ao estro (82%), e ao diestro I (88%).

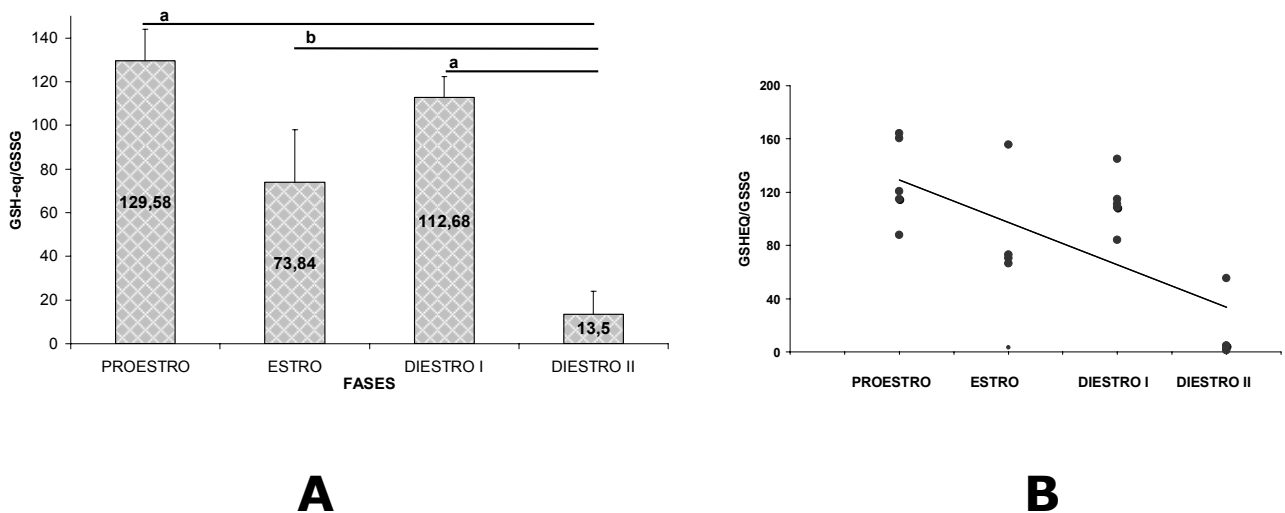
Quando comparadas entre si, as demais fases não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 3** – Níveis de glutatona em ovário de ratas durante o ciclo estral de ratas.

Glutaciona em nmol / mg de tecido úmido			
FASE	GSH-eq	GSSG	n
<b>PROESTRO</b>	795,32 ± 130,22 <sup>1</sup>	6,95 ± 0,87 <sup>2</sup>	6
<b>ESTRO</b>	415,17 ± 125,07	27,80 ± 9,15	6
<b>DIESTRO I</b>	822,92 ± 189,83	8,06 ± 1,05 <sup>3</sup>	6
<b>DIESTRO II</b>	293,54 ± 90,19 <sup>1</sup>	48,27 ± 10,48 <sup>3,2</sup>	6

1: Valores diferentes significativamente entre os valores de GSHeq,  $p < 0,05$ , teste Anova SNK.

2 e 3: Valores diferentes significativamente entre os valores de GSSG,  $p < 0,01$ , teste Anova SNK.



**Gráfico 7:** Relação **GSHeq/GSSG** em ovário de ratas. A parte **A** mostra a representação da média e do desvio padrão entre as fases onde **(a)** representa diferença estatística pelo ANOVA SNK com  $p < 0,005$  e **(b)** para o  $p < 0,05$ . A parte **B** representa a dispersão dos pontos que levaram a média nos diferentes grupos.

#### 4.2.4 Atividade das enzimas antioxidantes em ovário durante o ciclo estral de ratas.

As atividades das enzimas GR e GST não apresentaram diferença nas quatro fases do ciclo reprodutivo. Na análise da atividade da enzima GPx houve um aumento da atividade dessa enzima na fase do diestro II, quando comparado ao

diestro I, de 6,7 vezes, aproximadamente, e de 1,8 vezes quando comparado ao Estro.

**Tabela 4** – Atividade de enzimas antioxidantes em ovário de ratas durante o ciclo estral de ratas.

<b>FASE/ENZIMA</b>	<b>GST (<math>\mu\text{m}/\text{mg ptn}</math>)</b>	<b>GR (<math>\text{mU}/\text{mg ptn}</math>)</b>	<b>GPX (<math>\text{mU}/\text{mg ptn}</math>)</b>
<b>PROESTRO</b>	22,88 $\pm$ 1,43 (4)	25,9 $\pm$ 5,4 (11)	795,4 $\pm$ 257,3 (12)
<b>ESTRO</b>	19,03 $\pm$ 0,87 (3)	27,6 $\pm$ 8,8 (5)	460,7 $\pm$ 160,1 (9) <sup>2</sup>
<b>DIESTRO I</b>	36,74 $\pm$ 4,31 (4)	28,7 $\pm$ 8,6 (8)	171 $\pm$ 35,4 (9) <sup>1</sup>
<b>DIESTRO II</b>	47,65 $\pm$ 2,87 (4)	26,9 $\pm$ 6,7 (10)	1314,6 $\pm$ 317 <sup>1</sup> (10) <sup>1,2</sup>

Experimento em duplicata com amostras obtidas nas fases II e III do experimento.

Os números representam a média e o erro padrão sendo o valor de n representado entre parênteses.

1 e 2: Variações na atividade de GPx diferença estatística entre os grupos, com  $p < 0,05$  pelo ANOVA SNK.

#### 4.2.5 Discussão

A ruptura folicular é um processo com características inflamatórias, envolvendo a liberação de EROs. A participação dos radicais livres de oxigênio nesse processo fica evidente com dados da literatura demonstrando que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD e a catalase, é capaz de inibir este processo, sem afetar a maturidade folicular ou a degeneração do ovócito (Miyazaki *et al*, 1991).

O aumento da peroxidação lipídica no ovário encontrada nas fases do proestro e estro, podem ser entendidas como uma alteração decorrente do processo de ruptura folicular. Isto porque o dano oxidativo em lipídios promove um aumento da permeabilidade das membranas celulares, facilitando o rompimento do folículo.

O aumento de GSHeq no proestro apresentado em nossos resultados, corrobora com dados da literatura, nos quais surgem que o pico de LH (responsável pela ovulação na noite do proestro) induz a liberação de GSH do ovário (Kodaman *et al*, 1994).

No entanto, os resultados de GSSG e da relação GSHeq/GSSG, juntamente com os valores de proteína carbonilada, indicam que na fase do diestro II ocorre um aumento do estresse oxidativo no ovário.



É importante salientar, que os danos oxidativos em lipídios e proteínas podem ser transitórios, enquanto que o aumento da produção de GSSG e a redução da sua relação com a GSHeq são marcadores fiéis de estresse oxidativo.

Assim, a queda da GSHeq no Diestro II e o aumento de GSSG sugerem que a GSH do sistema estaria sendo usada como antioxidante, que ocorre durante a destoxificação de  $H_2O_2$  produzido nessa etapa. A GSH, por sua vez, é oxidada à GSSG pela ação, a exemplo da GPx.

Após a ovulação, o ovário tem como um dos seus eventos mais importantes a luteólise. Esse evento é provocado pela infiltração tecidual de neutrófilos e também pela liberação de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) que é responsável por induzir a produção neutrofílica de  $O_2^-$  no tecido ovariano. O aumento da produção de  $H_2O_2$  e a depleção de ascorbato nas células do corpo lúteo de ratas (Riley & Behrman, 1991), também são importantes para evidenciar a participação dos radicais livres na luteólise.

Assim, esse fenômeno justifica o aumento dos níveis de proteína carbonilada e as alterações nos níveis de GSSG e da relação GSHeq/GSSG nas fases do diestro I e II.

Outrossim, os altos valores encontrados em proteína carbonilada no ovário são justificados pela luteólise, uma vez que esse fenômeno envolve a participação de radicais livres. Como esse processo ocorre ao final de cada ciclo estral e de maneira cíclica ao longo do tempo, o dano oxidativo em proteínas torna-se um excelente marcador de envelhecimento do ovário.

O ovário sofre uma grande alteração durante as fases do diestro I e II, devido ao aumento de sua vascularização (Knobil & Neil, 1994). Tal fato poderia ser responsável por um aumento do dano oxidativo nessas fases do ciclo, uma vez que a presença do ferro advindo da hemoglobina poderia levar a formação de EROS.

A enzima GPx tem sido apontada como um dos elementos antioxidantes, chave na resposta aos radicais livres em diversas espécies, demonstrando papel central na resposta a fenômenos de intenso estresse oxidativo, como a hibernação, a isquemia e a reperfusão (Ferreira *et al*, 2003). A alta da atividade de GPx, na fase do diestro II, pode demonstrar uma resposta ao dano intenso ocorrido nessa fase.

O aumento da GPx seria uma adaptação antioxidante do órgão que poderia minimizar a oxidação de proteínas e conter a amplificação do dano oxidativo, o qual

poderia conduzir à oxidação de bases de DNA, fato extremamente prejudicial a células germinativas.

A semelhança do útero, as fases do diestro I do diestro II parecem concentrar uma maior quantidade de danos oxidativos, o que sugere a existência, no momento do ciclo estral, de um estado de estresse oxidativo fisiológico no ovário.

### **4.3 Metabolismo de radicais livres em adrenal de ratas durante ciclo estral.**

---

#### **4.3.1 A adrenal e os radicais livres**

Há décadas é conhecido o papel da adrenal na produção de esteróides e sua participação na fisiologia do ciclo reprodutivo. As variações morfofisiológicas ocorridas durante o ciclo nos chamam a atenção para uma investigação de variações nesse órgão durante o ciclo estral. Somando-se a isso, dados recentes da literatura demonstram a interação de alguns hormônios adrenais com o metabolismo de radicais livres, dentre eles a di-hidro-epiandrosterona (DHEA), o glicocorticóide e o adrenocorticotrófico (ACTH) (Mohn *et al*, 2005 e Khan , 2005).

Apesar de não sofrer variação em seus níveis durante o ciclo reprodutivo, o DHEA é um hormônio presente em grande quantidade na adrenal. Este hormônio tem sido considerado como potente agente antioxidante, por ser responsável pela proliferação de peroxissomos em células de roedores, por isso considerado agente protetor em muitas patologias decorrentes de danos oxidativos como o câncer e as demências, por exemplo (Aragno *et al*, 2000).

Contudo, trabalhos com cultura de células demonstram que doses suplementares a fisiológica podem levar a um aumento inicial na atividade da catalase, da quantidade de ubiquinona-9 e da peroxidação lipídica, o que posteriormente evoluiria com redução da atividade da catalase a níveis basais e redução dos níveis de ubiquinona-10 (Khan, 2005). Acresça-se a isso a hipótese de ação prooxidante do DHEA, que usado em doses complementares a fisiológica seria responsável por um aumento no dano oxidativo em lipídios de membranas em alguns órgãos (Swierczynski *et al*, 1996).

Além do DHEA, outro hormônio adrenal que vem ganhando importância no estudo dos radicais livres é o glicocorticóide. Sua ação reguladora sobre o processo

inflamatório, que notadamente depende das EROs e sua capacidade de aumentar os níveis de glutathione durante o estresse oxidativo na córtex renal de ratos (Ogasawara *et al*, 1999), tornam-no um hormônio importante para o metabolismo de radicais livres nesse órgão.

Além do papel direto de alguns hormônios no metabolismo oxidativo, há informações na literatura que deixam claro também a participação de espécies radicalares na fisiologia da adrenal, como é o caso do controle da secreção do ACTH, que é regulado pela produção de óxido nítrico. O óxido nítrico está envolvido ainda na síntese de esteróides na adrenal uma vez que participa da oxidação da pregnolona via citocromo P-450 e do controle da cicloxigenase (Mohn *et al*, 2005).

Dentre as variações no metabolismo oxidativo da adrenal já descritas na literatura encontramos dados que indicam haver uma redução dos mecanismos e defesas antioxidantes na adrenal em decorrência do envelhecimento de ratos (Azhar *et al*, 1995), fenômeno esse que tem implicações diretas com o ciclo reprodutivo.

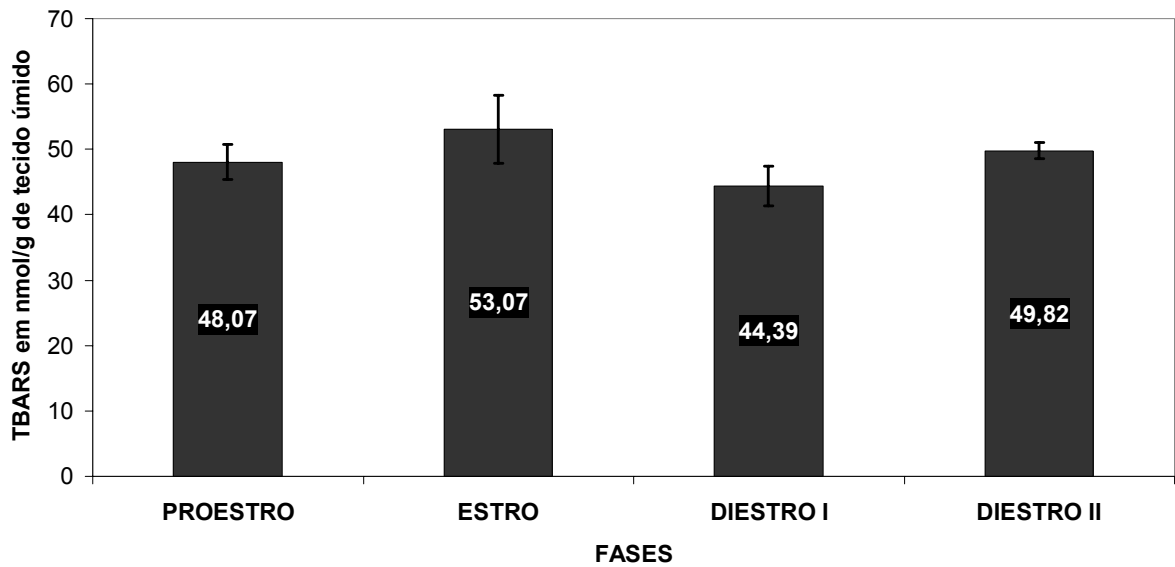
No entanto os trabalhos já existentes não fazem menção sobre diferenças no metabolismo de radicais livres quando comparados sexos diferentes ou mesmo alterações naturais dos hormônios do ciclo reprodutivo.

Além das alterações microanatômicas que ocorrem com o aumento da adrenal pela alta na produção de CBG, a adrenal durante o ciclo estral participa ainda da síntese de esteróides durante o ciclo estral, e as alterações na defesa antioxidante da adrenal ao longo do tempo, são justificativas relevantes à investigação da existência de alterações no metabolismo oxidativo da adrenal durante o ciclo estral.

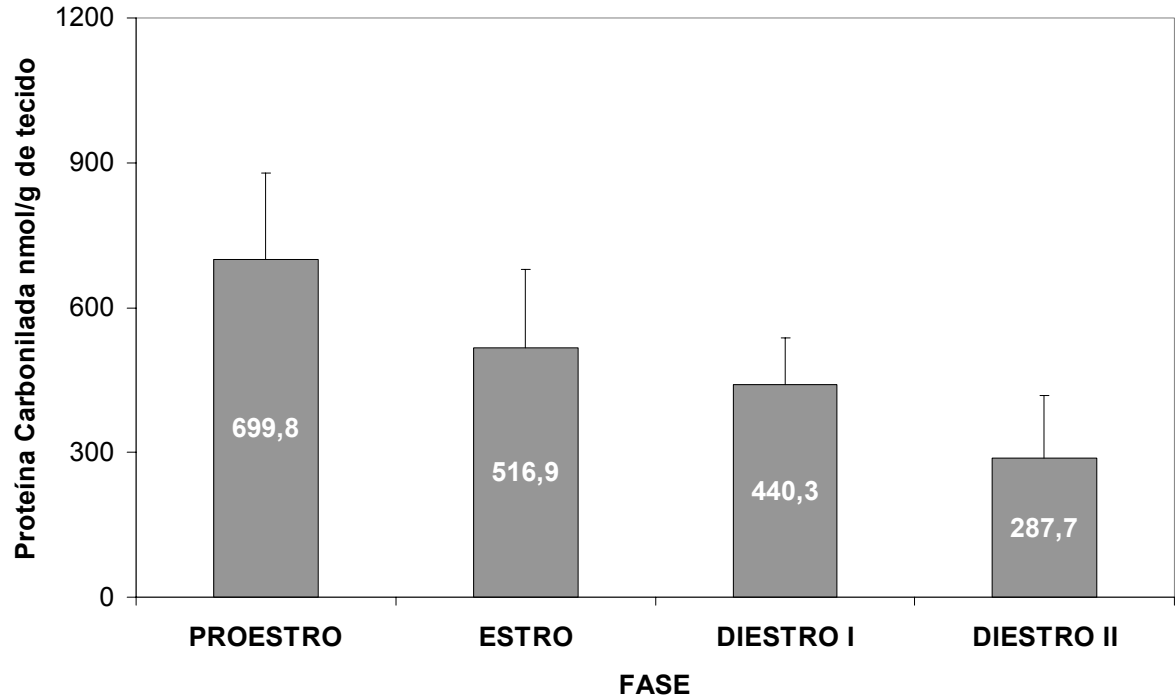
#### **4.3.2 Peroxidação lipídica e dano oxidativo em proteína na adrenal durante o ciclo estral de ratas.**

Os Níveis de TBARS não mostraram na adrenal uma diferença significativa quando comparada às fases ao longo do ciclo como mostra o Gráfico 8.

Quanto aos danos oxidativos em proteína na adrenal, não há diferença significativa entre as fases do ciclo reprodutivo de ratas (Gráfico 9).



**Gráfico 8:** Variações nas concentrações de equivalentes de TBARS em adrenal nas quatro fases do ciclo estral de ratas. Para as análises foram utilizados animais da fase II do experimento. Não houve diferença significativa entre as fases do ciclo estral pelo ANOVA SNK. Para um n de PE = 11, E = 10, DI = 12, DII = 11. O experimento foi repetido duas vezes.



**Gráfico 9:** Dosagem dos níveis de proteínas carboniladas em adrenal nas quatro fases do ciclo estral de ratas. Para as análises foram utilizados animais da fase I do experimento. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Para n de PE = 4, E = 6, DI = 5, DII = 3.

### 4.3.3 Dosagem de glutatona total e oxidada em adrenal durante o ciclo estral de ratas.

Ao observar os níveis de GSHeq, nota-se uma queda na fase do diestro I em relação ao proestro (47%), estro (46%) e diestro II (42%). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as fases do ciclo estral quando comparado os seus valores de GSSG.

A razão GSH-eq/GSSG demonstrou uma queda na fase do diestro I em relação ao proestro de 57%.

**Tabela 5** – Níveis de glutatona em adrenal de ratas nas quatro fases do ciclo estral

FASE	Glutaciona em nmol / g de tecido úmido			n
	GSH-eq	GSSG <sup>2</sup>	GSH-eq/GSSG	
<b>PROESTRO</b>	1578,5 ± 146,8	48,93 ± 2,9	36,0 ± 4,9 <sup>3</sup>	5
<b>ESTRO</b>	1550,9 ± 121,4	49,11 ± 1,5	30,5 ± 3,5	5
<b>DIESTRO I</b>	838,9 ± 139,4 <sup>1</sup>	53,0 ± 5,6	15,6 ± 1,0 <sup>3</sup>	3
<b>DIESTRO II</b>	1441,1 ± 139,3	61,93 ± 5,8	21,4 ± 2,4	4

Os números representam a média, o erro padrão e o valor de n. E os números em sobrescrito, as diferenças entre as fases.

Foram utilizados para a análise os animais da fase III do experimento.

1: Valores significativamente diferentes das demais fases para GSHeq, com  $p < 0,025$ , teste Anova SNK.

2: Não houve diferença estatística entre os grupos.

3: Valores significativamente diferentes de GSH/GSSG, com  $p < 0,05$ , teste Anova SNK.

### 4.3.4 Atividade de enzimas antioxidantes em adrenal durante o ciclo estral de ratas.

Ocorre na adrenal um aumento significativo na atividade da GR no diestro II quando comparada ao estro (144%) e ao diestro I (126%); já com relação ao estro houve uma queda significativa quando comparado ao proestro (56%) e ao diestro I (52%).

**Tabela 6** – Atividade de enzimas antioxidantes em adrenal de ratas durante o ciclo estral de ratas.

FASE/ENZIMA	Atividade de enzimas em mU/mg de proteína		
	GST <sup>1</sup>	GR	GPX <sup>1</sup>
<b>PROESTRO</b>	455,7 ± 50,1 (6)	2415,7 ± 120 <sup>2,3</sup> (4)	1375,4 ± 204,7 (6)
<b>ESTRO</b>	501,2 ± 13,0 (6)	1058,2 ± 141 <sup>2,4</sup> (4)	1334,6 ± 203,6 (6)
<b>DIESTRO I</b>	448,5 ± 24,6 (5)	1140,4 ± 160 <sup>3,5</sup> (4)	1720,8 ± 147,0 (6)
<b>DIESTRO II</b>	384,9 ± 93,2 (5)	2586,8 ± 480 <sup>4,5</sup> (4)	1551,5 ± 213,0 (5)

Os números representam os valores da média e do desvio padrão, estando o valor do n entre parênteses.

Foram utilizados para a análise os animais da fase III do experimento.

1: Não houve diferença estatística significativa

2: Variações na atividade de GR diferença estatística entre os grupos, com  $p < 0,05$  pelo ANOVA SNK.

3, 4 e 5: Variações na atividade de GR diferença estatística entre os grupos, com  $p < 0,01$  pelo ANOVA SNK.

Não foram observadas variações na atividade das outras duas enzimas, GST e GPx, ao longo do ciclo estral em adrenal de ratas.

#### 4.3.5 Discussão

Não foram observadas diferenças nos níveis de danos oxidativos em adrenal pelas dosagens mais usuais que quantificam dano em proteína e em lipídios. No entanto, nossos resultados de peroxidação lipídica encontram-se próximos aos descritos em útero de ratas, sendo em torno de 20 mmol de MDA por grama de tecido úmido (Azhar *et al*, 1995).

Já os números obtidos na dosagem de glutathiona mostram um aumento do estresse oxidativo na fase do diestro I. Tal afirmação é baseada na observação da queda dos níveis de GSHeq e da relação GSHeq/GSSG nessa fase.

O aumento da atividade da GR na fase do diestro II pode ser entendido, como um aumento da proteção antioxidante oriundo de uma resposta celular frente à queda da GSHeq no diestro I.

A literatura traz dados que indicam uma redução na atividade da carbonil redutase, uma importante enzima de destoxificação de produtos da peroxidação lipídica, nas fases com maiores concentrações de estradiol, no caso o proestro/estro (Inazu *et al*, 1995). Isso nos leva a crer que níveis crescentes de estrogênio encontrados a partir do diestro I na adrenal poderiam conduzir esse órgão a um estado pro-oxidante.

## 5. CONCLUSÕES

---

As alterações observadas nos três órgãos durante o ciclo estral demonstram que as variações fisiológicas envolvem mudanças no metabolismo dos radicais livres.

### 5.1 Estresse oxidativo no útero.

Pensava-se inicialmente que pelo fato do útero ser um órgão envolvido com a embriogênese ele seria dotado de um baixo potencial oxidante, principalmente no que se referia aos lipídeos de membranas (Devasagayam, 1986). No entanto trabalhos posteriores demonstraram que a peroxidação lipídica no útero não seria algo meramente estático, mas poderia variar durante o ciclo estral e até mesmo durante a gestação (Jain *et al*, 2000).

O útero é capaz de responder ao estradiol e de criar um ambiente endometrial favorável à nidação, onde a síntese de NO levaria a vasculogênese do estroma, que com o aumento do status oxidativo das membranas do ovo e do local de implantação facilitaria a implantação da mórula, garantindo assim o êxito do processo reprodutivo (Jain *et al*, 1993).

Os resultados de útero, descritos no atual trabalho, demonstram que ocorre um aumento dos níveis de peroxidação lipídica e proteína carbonilada na fase do diestro II, que são acompanhados por uma alta da atividade de GST e dos níveis de GSHeq. Esse conjunto de dados evidencia a existência de estresse oxidativo e sua resposta compensatória na fase do diestro II no útero de ratas.

A resposta ao estresse oxidativo, percebida aqui pelo aumento da atividade da GST e dos níveis de GSHeq no diestro II, acontece, no entanto, em uma escala insuficiente para coibir o dano oxidativo, que parece ter um papel fisiológico dentro do contexto de proliferação celular que ocorre no endométrio durante o diestro I e se mantém no diestro II.

As fases do diestro I e II, na ausência de um processo embrionário, são caracterizadas no útero por um intenso *turn-over* celular. Tal fenômeno é ocasionado pela diminuição de fatores indutores de proliferação celular e de um aumento da taxa de apoptose das células epiteliais endometriais. Neste sentido, sendo assim o

processo inflamatório e da proliferação celular que se inicia no diestro I, a partir do aumento da expressão de proteínas de proto-oncogenes como c-fos (Mendoza-Rodrigues et al, 2003), pode ser considerado um dos responsáveis pelo estresse oxidativo encontrado no útero no diestro tardio.

A apoptose ocorre por meio de um processo inflamatório que tem como elementos centrais o NF- $\kappa$ B, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e algumas proteases aspartato específicas como as caspases, os quais sofrem regulação por radicais livres (Vaskivuo *et al*, 2002).

As caspases, um grupo de proteases que induzem à apoptose, podem sofrer uma regulação positiva através da liberação mitocondrial de fatores, como a Smac/DIABLO, ou negativa como a exercida pelo ligante inibidor de proteases da apoptose -X (*do inglês X-linked inhibitor of apoptosis protein - XIAP*) (Vaskivuo *et al*, 2002). Em experimentos com útero de ratas, foi observado uma queda dos níveis do XIAP, da fase do estro para o diestro I e II, acompanhada por uma alta do Smac/DIABLO no estro. Além disso, verificou-se que em animais ooforectomizadas, a reposição de 17 $\beta$ -estradiol mostrou resultados semelhantes aos observados no estro (Leblanc *et al*, 2005).

O NF- $\kappa$ B é uma citocina capaz de ativar genes da apoptose. O NF- $\kappa$ B é regulado positivamente e negativamente por uma serie de intermediários. Sendo produzido no citoplasma, o NF- $\kappa$ B só consegue exercer a sua ação sobre o receptor nuclear se o seu inibidor (fator inibidor  $\kappa$ B - I- $\kappa$ B) não se ligar a ele, fato esse que é regulado por radicais livres, que atuam bloqueando o I- $\kappa$ B. Trabalhos com endométrio humano indicam que o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) estimula a produção de NF- $\kappa$ B via fator inibidor da migração de macrófago (*do inglês macrophage migration inhibitory factor - MIF*). Isso diminui os níveis intracelulares de I $\kappa$ B durante a fase luteal tardia (Cao *et al*, 2006).

No entanto, experimentos com o NF- $\kappa$ B em endométrio indicam não haver variação durante o ciclo estral da expressão do NF- $\kappa$ B, nem do fator inibidor  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) e nem de sua fosforilação, que permitiria a ativação do NF- $\kappa$ B (Leblanc *et al*, 2003). Contudo, trabalhos mais recentes sugerem que a queda da progesterona na presença do estrogênio poderia ativar o NF- $\kappa$ B via cicloxigenase-2 (COX-2) e PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Sugino et al. 2004). À luz dos dados aqui expostos sugere o estresse oxidativo como um possível mecanismo para a alteração endometrial que ocorre nas fases do diestro II.



A partir disso conclui-se que as fases do diestro I e II estão associadas a um estímulo de proliferação e apoptose celular que, portanto, justificam o estresse oxidativo como de natureza fisiológico.

## 5.2 Estresse oxidativo no ovário.

O ovário possui em sua fisiologia diversos eventos que estão envolvidos com o metabolismo de radicais livres, tais como: o desenvolvimento do ovócito, a maturação, a atresia folicular, o funcionamento do corpo lúteo e a luteólise (Agarwa *et al*, 2005).

No presente trabalho, os valores obtidos no ovário para peroxidação lipídica mostram níveis discretos ao longo das quatro fases do ciclo, com um aumento nas fases do proestro e estro. Atribuímos os resultados encontrados à ocorrência da ruptura folicular entre a noite do PE e a manhã do E. Essa hipótese encontra apoio na literatura, uma vez sob o estímulo do LH, ocorre a depleção de ascorbato nas células da granulosa e um concomitante aumento de  $H_2O_2$ , tanto microsomal quanto mitocondrial, (Guarnaccia *et al*, 2000). Isso poderia levar à produção de EROs no folículo no momento do pico de LH, o qual ocorre na ruptura folicular.

Os relativamente baixos níveis de peroxidação lipídica encontrados no ovário (Devasagayam, 1986), seriam responsáveis, assim, por um dano oxidativo fisiológico, o que não os afetaria, no entanto, uma vez que altos níveis de lipoperóxidos e de aldeídos produzidos pela peroxidação lipídica inibem a esteroidogênese ovariana (Fujii *et al*, 2005).

Os níveis de proteína carbonilada aumentados no diestro II, bem como a redução da relação GSHeq/GSSG, são entendidos como indicativos de estresse oxidativo nessa fase do ciclo estral. Tais resultados indicam que o aumento da atividade da GPx no diestro II seria uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo nesta fase.

Os altos índices de proteína carbonilada observados no ovário durante o D II devem-se possivelmente às alterações cíclicas decorrentes de eventos como a ovulação, que provoca em um curto intervalo repetido a cada quatro dias, uma intensa alteração no metabolismo oxidativo. O ovário torna-se, portanto um dos órgãos que mais claramente estaria envelhecendo. Esse fato é expresso por um

acúmulo de produtos de dano oxidativo como a proteína carbonilada, que é um indicador de “dano oxidativo antigo” e, portanto de envelhecimento (deve ter em vista que proteínas carboniladas são indicadores de envelhecimento celular (Hermes-Lima, 2004)). Neste sentido, estes altos níveis de danos oxidativos em proteínas podem trazer uma nova explicação para a falência ovariana.

A presença de um mecanismo celular capaz de remover aldeídos, de origem peroxidativa, como o grupo das enzimas aldeído desidrogenases (Hermes-Lima, 2004), e a ação deletéria dos lipo-peróxidos na esteroidogênese, poderiam justificar a remoção do dano oxidativo em lipídeos entre as fases do PE/E e D I/D II. Portanto, a não percepção do aumento desse indicador de estresse oxidativo no ovário, na segunda metade do ciclo estral. Desta feita, apesar de não terem sido observados danos oxidativos em lipídeos no final do ciclo reprodutivo, essa fase é marcada pela ocorrência de estresse oxidativo, que estaria associado à fenômenos como apoptose celular, como a que ocorre na atresia folicular e na luteólise, por exemplo (Manabe N, et al 2004).

Após a ovulação, o corpo lúteo pode seguir a via da degradação, caso não ocorra a fecundação. Em caso de cópula, o corpo lúteo poderá permanecer funcionando por cerca de até 14 dias, e isso ocorre devido a um aumento da prolactina gerado por estimulação cervical durante a cópula. A manutenção do corpo lúteo garante assim a síntese de progesterona durante esse período (Knobil & Neil, 1994).

A luteólise é fruto da infiltração tecidual de neutrófilos no corpo lúteo, o que, graças a produção de  $O_2^-$ , conduz as células do corpo lúteo à apoptose (Manabe N, et al 2004). Dados da literatura demonstram que alguns fatores, como NF- $\kappa$ B e a caspase-3, apresentam um aumento na fase luteal tardia em células de corpo lúteo humano (Vaskivuo et al. 2002), o que se soma a outras evidências, como as realizadas em ovário bovino que revelam que o corpo lúteo poderia ser conduzido à luteólise por um aumento do TNF $\alpha$  e do NO, na fase luteal tardia de bovinos.

O TNF $\alpha$  conduz essas células a apoptose por induzir a fragmentação do DNA em células luteais (Okano *et al*, 2006). O NO, por sua vez, poderia causar a apoptose celular por estimular a produção de PGF $_2\alpha$  e de leucotrienos. Além disso, o TNF $\alpha$  e o NO poderiam ainda conduzir na fase luteal tardia à uma redução no número de células luteais viáveis através da inibição da expressão do Bcl-2, fator inibidor de apoptose (Skarzynski *et al* 2005).

Outro evento fisiológico ovariano associado a processos inflamatórios seria, também, a atresia folicular que é responsável pela degeneração de cerca de 99% dos folículos ovarianos em ratas. Descobertas recentes revelam que a presença de proteínas inibitórias da apoptose celular, tais como: as cFLIPS e cFLIPL (*do ingles inhibitory protein short form e long form*), nas células da granulosas do ovário, seriam responsáveis por selecionar os folículos por meio do controle da apoptose. A presença dessas proteínas em alguns folículos faria com que eles continuassem a se desenvolver; ao passo que a ausência das mesmas faria com que essas estruturas evoluíssem para a atresia (Manabe N, et al 2004). Contudo, não se encontra até o momento uma ampla discussão acerca da regulação de radicais livres e a regulação da apoptose nos mecanismos de controle da atresia folicular.

### **5.3 Estresse oxidativo na adrenal.**

As alterações na relação GSHeq/GSSG demonstram que existe na adrenal, também na fase do diestro I, uma situação de estresse oxidativo. Isso demonstra que a variação do ciclo estral, provocada pelas flutuações hormonais, exerce um controle sobre o metabolismo de radicais livres em órgãos não diretamente envolvidos na reprodução, como a adrenal.

A esteroidogênese, um fenômeno muito presente na adrenal, sofre regulação pelo processo inflamatório. Durante o ataque inflamatório algumas etapas da esteroidogênese podem ser estimuladas como etapas dependentes da aromatase, enquanto outras podem ser inibidas como a segunda etapa do P450c17 e a 3  $\beta$ -hidroxesteróide desidrogenase. E citocinas que sofrem regulação pelos radicais livres, como o TNF $\alpha$ , demonstram que estes radicais podem interferir nas vias de transdução de sinal do processo inflamatório e, portanto, interferir na esteroidogênese (Straub RH, et al 2005).

O aumento da secreção adrenal da proteína ligante de cortisol (*cortisol binding protein* – CBP), durante a elevação do estradiol, faz com que se eleve os níveis de ACTH durante a alta de estradiol. O ACTH, por sua vez, está envolvido com o metabolismo de radicais livres. (RSF).

A resposta da GR ao estresse oxidativo no diestro II, junta-se ao conjunto de dados existentes na literatura que compõe a hipótese da ação exercida pelos radicais livres durante a esteroidogênese na adrenal.

Mediante o exposto, uma hipótese para o dano oxidativo observado na fase do diestro II na adrenal é a de que o aumento de elementos catecóis, metabólitos derivados do colesterol no córtex da adrenal, poderia conduzir a um status pro-oxidante na adrenal nesse momento.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

As alterações percebidas nos diferentes órgãos ao longo do ciclo estral, podem colaborar para o entendimento de alguns processos fisiopatológicos em que ocorre variação dos hormônios do ciclo reprodutivo, como o estradiol, por exemplo.

O estradiol possui um papel protetor sobre diversas patologias que possuem em seus mecanismos o metabolismo de radicais livres. Esse papel protetor é observado, por exemplo, na aterosclerose onde o uso de estrogênio reduz a oxidação do colesterol (Shwaery *et al*, 1997) e os níveis de proteínas carboniladas no plasma (Telci *et al*, 2002) e na artrose, quando o uso estrogênio reduz os níveis de peroxidação lipídica nos condrócitos (Tsai *et al*, 1998).

No entanto, a literatura traz dados recentes demonstrando que a administração de estrogênio através da terapia hormonal na menopausa, por exemplo, pode aumentar o risco de doença cardiovascular nos dois primeiros anos do seu uso (Newton *et al*, 2005; Million Women Study Collaborators, 2002; Remmers *et al*, 1998 e Mendelsohn *et al*, 1999). Uma das possíveis explicações para o fenômeno, seria um desequilíbrio no metabolismo de estrogênio durante o climatério. O que poderia assim explicar alterações no metabolismo do colesterol na parede dos vasos, aumentando o risco de doença coronariana.

O uso de moléculas com fórmula química e ação biológica semelhantes aos estrogênios são amplamente divulgados como uma alternativa segura ao tratamento preventivo de intercorrências da hipoestrogenemia, tais como as ondas de calor. Dentre essas moléculas, os mais conhecidos são os chamados fitoestrogênios, que podem ser administrados isoladamente ou através da dieta.

Entretanto, alguns trabalhos demonstram que os efeitos de dieta de isoflavonas podem ter sido subestimados, uma vez que em boa parte dos trabalhos da literatura as dietas possuíam quantidades de fitoestrogênios em cerca de 30 a 60 mil vezes acima dos níveis fisiológicos de E<sub>2</sub> (Ohwada *et al*, 1996), considerado os níveis fisiológicos do estrogênio entre 200 a 600 picomol/L (Ohwada *et al*, 1996 apud Boyd *et al*, 1995).

Assim, as variações ocorridas durante o ciclo reprodutivo e no metabolismo dos radicais livres demonstram grande relevância fisiológica, devido as várias interfaces com eventos ocorridos durante o ciclo estral, no útero, ovário e na adrenal.

E resultados como os apresentados no presente trabalho somam-se aos já descritos na literatura para contribuir com o entendimento de processos fisiopatológicos, trazendo novas perspectivas para o tratamento e prevenção de doenças.

## REFERÊNCIAS

---

Agarwal, A.; Gupta, S.; Sharma, RK. **Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective.** *Reprod. Biomed. Online.* 11(5),641-50, nov. 2005.

Agarwal, A.; Gupta, S.; Sharma, R.K. **Role of oxidative stress in female reproduction.** *Reprod Biol Endocrinol.* v. 3, 28, 2005. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/3/1/28>> Acesso em: 23 abr. 2005.

Aiyer, M.S.; Fink, G. **The role of sex steroid hormones in modulating the responsiveness of the anterior pituitary gland to luteinizing hormone releasing factor in the female rat.** *J Endocrinol* 62(3),553-72, sep 1974.

Anderson, J.N.; Peck, E.J.; Clark, J.H. **Estrogen-induced uterine responses and growth: relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei** *Endocrinology*, 96, 160 – 167, Jan 1975.

Aragno, M.; Parola, S.; Brignardello, E.; Mauro, A.; Tamagno, E.; Manti, R.; Danni O.; Boccuzzi, G. **Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury induced by transient ischemia/reperfusion in the brain of diabetic rats.** *Diabetes* 49, 1924-1931, 2000.

Atanackovic, D.; Brunner-Weinzierl, M.C.; Kroger, H.; Serke, S.; Deter, H.C. **Acute psychological stress simultaneously alters hormone levels, recruitment of lymphocyte subsets, and production of reactive oxygen species.** *Immunol. Invest.* 31(2),73-91, may 2002.

Aten, R.F.; Duarte, K.M.; Behrman, H.R.; **Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha.** *Biol Reprod* 46 (3),401-407, mar. 1992.

Azhar, S.; Cao, L.; Reaven, E. **Alteration of the antioxidant defense system during aging in rats.** *J. Clin. Invest.* 96: 1414 – 1424, 1995.

Baird, D.T.; Baker, T.G.; McNatty, K.P.; Neal, P. **Relationship between the secretion of the corpus luteum and the length of the follicular phase of the ovarian cycle.** *J. Reprod. Fertil.* 45(3),611-619, dec. 1975.

Behrman, H.R.; Aten, R.F. **Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells.** *Endocrinology* 128, 2958-2966,1991.

Bird, R.P.; Draper, H.H. **Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination.** *Methods. Enzymol.* 105, 299-305, 1984.

Blake, C.A.; Helmke, S.M. **Proteomics of the anterior pituitary gland as a model for studying the physiology of a heterogeneous organ.** Exp. Biol. Med. (Maywood).230(11),793-9, dec. 2005.

De Bont, J.M.; Pieters, R. **Management of hyperuricemia with rasburicase review.** Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids 23(8-9),1431-40, oct. 2004.

Boyd, N.F.; Lockwood, G.A.; Greenberg, C.V.; Matin, L.J.; Tritchler, D.L. **Efects of a low-fat high-carbohydrate diet on plasma sex hormones in premenopausal women: Results from a randomized controlled trial.** BJC 76,127-135, 1997.

Bradford, M.M. **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.** Ann. Biochem. 72:248-254,1976.

Brown, N.M.; Setchell, K.D. **Animal models impacted by phytoEstrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones.** Lab. Invest. 81(5), 735-747, may 2001.

Cao, W.G.; Morin, M.; Sengers, V.; Metz, C.; Roger, T.; Maheux, R.; Akoum, A. **Tumour necrosis factor-alpha up-regulates macrophage migration inhibitory factor expression in endometrial stromal cells via the nuclear transcription factor NF-kappaB.** Hum. Reprod. 21(2),421-428, feb. 2006.

Cardinali, D.P.; Golombek, D.A.; Rosenstein, R.E.; Cutrera, R.A.; Esquifino, A.I. **Melatonin site and mechanism of action: single or multiple?** J. Pineal Res. 23(1):32-9, aug. 1997.

Carlson, J.C.; Wu, X.M.; Sawada, M. **Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum function.** Free Radic. Biol. Med.14(1):79-84, jan. 1993.

Carretero, J.; Sanchez, F.; Blanco, E.; Montero, M.; Riesco, J.M.; Gonzalez, R.; Vazquez, R. **Estrogenic modulation of met-enkephalin-induced prolactin secretion in rats.** Anat. Embryol. (Berl),183(5),455-9, 1991.

Caruso, R.L.; Upham, B.L.; Harris, C.; Trosko, J.E. **Biphasic lindane-induced oxidation of glutathione and inhibition of gap junctions in myometrial cells.** Toxicol. Sci. 86(2),417-26, aug. 2005.

Chaves, M.C.; Ribeiro, R.A.; Rao, V.S. **Possible involvement of nitric oxide in estrogen-induced uterine edema in the immature rat.** Braz. J. M. Biol. Res. 26(8), 853-857, aug.1993.

Davies, K.J.; Shringarpure, R. **Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and in inflammatory neuromuscular diseases.** Neurology 24,66(2 Suppl 1),S93-6, jan. 2006.

Devasagayam, T.P.A. **Lipid proxidation in rat uterus.** Biochem. Biophys. Acta 876: 507-514.1986.



Dincer Y, Ozen E, Kadioglu P, Hatemi H, Akcay T. **Effect of sex hormones on lipid peroxidation in women with polycystic ovary syndrome, healthy women, and men.** Endocr. Res. 27(3),309-16, 2001.

Dormandy TL. **Free-radical reaction in biological systems.** Ann. R. Coll. Surg. Engl. 62(3):188-94; may 1980.

Duleba AJ, Foyouzi N, Karaca M, Pehlivan T, Kwintkiewicz J, Behrman HR. **Proliferation of ovarian theca-interstitial cells is modulated by antioxidants and oxidative stress.** Hum. Reprod. 19(7),1519-24, jul 2004.

Duran Reyes G, Gomez Melendez MR, Hicks Gomez JJ. **Importance of free radicals during the reproduction cycle.** Ginecol. Obstet. Mex. 66, 371-376, sep. 1998.

Ferreira, M.V.F.; Alencastro, A.C.R.; Hermes-Lima, M. **Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in freshwater snails *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835).** Can. J. Zool. 81:1239-1248, 2003.

Fields, R.; Dixon, H.B. **Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-dinitrophenylhydrazine.** Biochem. J. 121(4):587-9 feb. 1971.

Flohe, L.; Brand, I. **Kinetics of glutathione peroxidase.** Biochem. Biophys. Acta 191(3):541-9, 1969.

Fridovich, I. **Oxygen toxicity: a radical explanation.** J. Exp. Biol. 201(Pt 8):1203-9, apr. 1998.

Fujii, J.; Iuchi, Y.; Okada, F.; **Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system.** Reprod Biol and Endocr. 3:43, 2005. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/3/1/43>> Acesso em 23 abr. 2005.

Garcia-Segura, L.M.; Azcoitia, I.; DonCarlos L.L. **Neuroprotection by estradiol.** Progr. Neurobiol. 63, 29 – 60, 2001.

Gille, L.; Nohl, H. **The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation.** Arch. Biochem. Biophys. 1,388(1),34-8, apr. 2001.

Ginani, J.S. **Estudo da ação antioxidante in vitro do polifenol ácido elágico. Dissertação de mestrado.** 2005, 11 f. Tese (Mestrado em Nutrição) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

Gómez-Zubeldia, M.A.; Corrales, S.; Arbués, J.; Nogales, A.G.; Millán, J.C. **Influence of estradiol and gestagens on oxidative stress in the rat uterus.** Gynecol. Oncol. 86, 250 – 258, 2002.

Gómez-Zubéla, M.A.; Hinchado, G.; Arbués, J.J.; Nogales, A.G.; Millán, J.C. **Influence of estradiol on oxidative stress in castrated rat uterus.** Gynecol. Oncol. 80, 227-232, 2001.

Gondar, T.R. **Íons cobalto e estresse oxidativo *in vitro*.** 2005, 4f. Tese (Mestrado em Nutrição) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

Griffith, O.W. **Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine.** Anal. Biochem. 15, 106(1), 207-12, jul 1980.

Guarnaccia, M.M.; Takami, M.; Jones, E.E.; Preston, S.L.; Behrman, H.R. **Luteinizing hormone depletes ascorbic acid in preovulatory follicles.** Fertil Steril 74(5):959-63, nov. 2000.

Halliwell, I.B.; Gutteridge, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 3 ed. London: Oxford University Press, 2000.

Hermes-Lima, M. **Oxidative stress and medical sciences (chapter 12 and 13) In: Functional Metabolism Regulation and Adaptation,** Editado por K.B Storey, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA pp 319-368, 2004 pp 369-382.

Hermes-Lima, M.; Zenteno-Savin, T. **Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress.** Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 133(4), 537-556, dec. 2002.

Hermes-Lima, M.; Willmore, W.G.; Storey, K.B. **Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xilenol orange complex formation.** Free Rad. Biol. and Med. 19(3):271-280, sep. 1995.

Hirshfield, A.N. **Development of follicles in the mammalian ovary.** Int. Rev. Cytol. 124, 43-101, 1991.

Hogg, N.; Darley-Usmar, V.M.; Wilson, M.T.; Moncada, S.; **Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide.** Biochem. J. 15;281 ( Pt 2):419-24, jan. 1992.

Hornsby, P. J.; Crivello, J.F. **The role of lipid peroxidation and biological antioxidant in the function of the adrenal cortex.** Part 2. Mol. Cell. Endocrinol. 30, 123 – 147, 1983.

Hornsby, P. J. **Steroid and xenobiotic effects on the adrenal cortex: mediation by oxidative and other mechanism.** Free Radical. Biol. Med. 6(1), 103 – 115, 1989.

Huang, J.; Roby, K.F.; Pace, J.L.; Russel, S.W.; Hunt, J.S. **Cellular localization of inducible nitric oxide synthase in cycling mouse uterus.** Journ. of Leukoc. Biol. 57:27-35, jan. 1995.

Inazu, N.; Nagashima, Y.; Satoh, T. **Localization and activity of adrenal carbonyl reductase during the estrous cycle.** Biol. Pharm. Bull. 18(5):671-6, may 1995.

Jain, S.; Saxena, D.; Kumar, P.; Laloraya, M. **NADPH dependent superoxide generation in the ovary and uterus of mice during the estrous cycle and early pregnancy.** Life Sciences 66 (12), 1139-46, 2000.

Jain, S.; Saxena, D.; Kumar, P.G.; Koide, S.S.; Laloraya, M. **Effect of estradiol and selected antiestrogen on pro- and antioxidant pathways in mammalian uterus.** Contraception 60,111-118, 1999.

Jezeek, P.; Hlavata, L. **Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism.** Int. J. Biochem. Cell. Biol. 37(12),2478-2503, dec. 2005.

Jiang, Z.Y.; Hunt, J.V.; Wolff, S.P; **Ferrous ion oxidation in the presence of xilenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein.** Anal. Biochem. 1,202(2), 384-389, may 1992.

Jonas, S.K.; Riley, P.A.; Willson, R.L. **Hydrogen peroxide cytotoxicity. Low-temperature enhancement by ascorbate or reduced lipoate.** Biochem. J. 15;264(3):651-5, dec. 1989.

Jozwik, M.; Wolczynski, S.; Jozwik, M.; Szamatowicz, M. **Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans.** Mol. Human. Reprod. 5(5), 409-413, may 1999.

Kaneko, T.; Iuchi, Y.; Kawachiya, S.; Fujii, T.; Saito, H.; Kurachi, H.; Fujii, J. **Alteration of glutathione reductase expression in the female reproductive organs during the estrous cycle.** Biol. Reprod. 65, 1410 – 1416, aug. 2001.

Karageuzyan, K.G. **Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment.** Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 4(1), 85-98, feb. 2005.

Keszler, A.; Mason, R.P.; Hogg, N. **Immuno-spin trapping of hemoglobin and myoglobin radicals derived from nitrite-mediated oxidation.** Free Radic. Biol. Med. 1,40(3),507-15, feb. 2006.

Khan, S.A. **Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on ubiquinone and catalase in the livers of male F-344 rats.** Biol. Pharm. Bull. 28(7),1301-3, jul. 2005.

Knauf, C.; Prevot, V.; Stefano, G.B.; Mortreux, G.; Beauvillain, J.C.; Croix, D. **Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release.** Endocrinology 142, 2343 – 2350, jun. 2001.

Knobil, E.; Neil, J.D. **The Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 613-646.

Kodaman, P.H.; Behrman, H.R. **Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles**. *Endocrinology* 142, 687-693, feb. 2001.

Kodaman, P.H.; Aten, R.F.; Behrman, H.R. **Lipid hydroperoxides evoke antionadotropic and antisteroidogenic activity in rat luteal cells**. *Endocrinology* 135, 2723-2730, 1994.

Kraus, P. **Resolution, purification and some properties of three glutathione transferases from rat liver mitochondria**. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 361(1):9-15, jan. 1980.

Krumenacker, J.S.; Hyder, S.M.; Murad, F. **Estradiol rapidly soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus**. *PNAS* 98 (2), 717-722, jan. 2001.

Kum-Tatt, L.; Tan IK, Seet AM. **A new colorimetric method for the determination of NADH/NADPH dependent glutathione reductase in erythrocytes and in plasma**. *Clin. Chim. Acta* 20;58(2):101-8, jan. 1975.

Kumanov, P.; Nandipati, K.C.; Tomova, A.; Robeva, R.; Agarwal, A. **Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications**. *Reprod. Biomed. Online* 10(6),786-812, jun. 2005 .

Laloraya, M.; Kumar, G.P.; Laloraya, M.M. **Changes in the superóxido radical and superoxide dismutase levels in the uterus of *Rattus norvegicus* during the Estrous cycle and a possible role for superoxide radical in uterine oedema and cell proliferation at proestrus**. *Biochem. Cell Biol.* 69:313 – 316; 1991.

Leblanc, V.; Dery, M.C.; Shooner, C.; Asselin, E. **Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus**. *Reprod Biol Endocrinol* 27,1,59, aug 2003. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/1/1/59>> Acesso em 23 abr. 2006.

Lewin, B. **Genes VII**. Nova Iorque: Oxford, 2000.

Liehr, J.G. **Is estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen?** *Endocr. Rev.* 21(1), 40 – 54, 2000.

Machlin, L.J.; Bendich A. **Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients**. *FASEB J* 1(6):441-5, dec. 1987.

Manabe, N.; Goto, Y.; Matsuda-Minehata, F.; Inoue, N.; Maeda, A.; Sakamaki, K.; Miyano, T. **Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia**. *J. Reprod. Dev.* 50(5),493-514, oct. 2004.

Margolin, Y.; Behrman, H.R. **Xanthine oxidase and dehydrogenase activities in rat ovarian tissues**. *Am. J. Physiol.* 262(2 Pt 1), E173-8, feb. 1992.

Margolin, Y.; Aten, R.F.; Behrman, H.R. **Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells**. *Endocrinology* 127, 245 – 250, jul. 1990.

Markides, C.S.A.; Roy, D.; Liehr, J. **Concentration dependence of prooxidant and antioxidant properties of CatecholEstrogens**. *Arch. Biochem. Biophys.* 36(1), 105-112, 1998.

Martin, V.; Herrera, F.; Carrera-Gonzalez, P.; Garcia-Santos, G.; Antolin, I.; Rodriguez-Blanco, J.; Rodriguez, C. **Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin**. *Cancer Res.* 15;66(2):1081-8, jan. 2006.

Maser, E. **Neuroprotective role for carbonyl reductase?** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24,340(4),1019-1022, feb. 2006.

Massafra, C.; De Felice, C.; Gioia, D.; Buonocore, G. **Variations in erythrocyte antioxidant glutathione peroxidase activity during the menstrual cycle**. *Clin. Endocr.* 49(1),63-7, jul. 1998.

Mattison, D.R.; Shiromizu, K.; Nightingale, M.S. **Oocyte destruction by polycyclic aromatic hydrocarbons**. *Am. J. Ind. Med.* 1983;4(1-2):191-202.

McCord, J.M.; Fridovich, I. **Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)**. *J. Biol. Chem.* 25,244(22),6049-55, nov. 1969.

Mendoza-Rodriguez, C.A.; Merchant-Larios, H.; Segura-Valdez, M.L.; Moreno-Mendoza, N.; Cruz, M.E.; Arteaga-Lopez, P.; Camacho-Arroyo, I.; Dominguez, R.; Cerbon, M. **c-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle**. *Mol. Reprod. Dev.* 64(4):379-88; apr. 2003.

Mendelsohn, M.E.; Karas, R. **Mechanisms of disease: The protective effects of estrogen on the cardiovascular system** *N. Engl. J. Med.* 340(23) 1801-1811, 1999.

Miyazaki, T.; Sueoka, K.; Dharmarajan, A.M.; Atlas, S.J.; Bulkley, G.B.; Wallach, E.E. **Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary**. *J. Reprod. Fertil.* 91(1),207-12, jan. 1991.

Million Women Study Collaborators. **Patterns of use of hormone replacement therapy in one million women in Britain, 1996-2000**. *BJOG.* 109(12),1319-1330, dec. 2002.

Mohn, C.E.; Fernandez-Solari, J.; De Laurentiis, A.; Prestifilippo, J.P.; De La Cal C., Funk, R.; Bornstein, S.R.; McCann, S.R.; Rettori, V. **The rapid release of**

**corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E<sub>2</sub>** PNAS 102: 6213-6218, 2005.

Nathan, L.; Chaudhuri, G. **Antioxidant and Prooxidant Actions of Estrogens: Potencial Phjysiological and Clinical Implications**. Sem. Rep. Endocr. 16 (4),309-314, 1998.

Niture, S.K.; Velu, C.S.; Bailey, N.I.; Srivenugopal, K.S. **S-thiolation mimicry: quantitative and kinetic analysis of redox status of protein cysteines by glutathione-affinity chromatography**. Arch. Biochem. Biophys. 15,444(2),174-84, dec. 2005.

Newton, K.M.; Buist, D.S.; Miglioretti, D.L.; Beverly, K.; Hartsfield, C.L.; Chan, K.A.; Andrade, S.E.; Wei, F.; Connelly, M.T.; Kessler, L. **The impact of comorbidities on hormone use. After the 2000 release of the Women's Health Initiative**. J. Gen. Intern. Med. 20(4),350-356, apr.2005.

Okano, A.; Kishi, H.; Takahashi, H.; Takahashi, M. **Tumor Necrosis Factor-alpha Induces Apoptosis In Cultured Porcine Luteal Cells**. J. Reprod. Dev. 17; [Epub ahead of print] jan. 2006.

Ogasawara, M.; Nomura, K.; Shibata, N.; Ujihara, M.; Kobayashi, M.; Demura, H. **Surgical stress increases renal glutathione content via increased glucocorticoid, and resistance to subsequent oxidative injury in the rat: significant link between endocrine response and cell defense system under the stress**. Endocr. J. 46(1),99-106, feb. 1999.

Ota, H.; Igarashi, S.; Kato, N.; Tanaka, T. **Aberant expression of glutathione peroxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis**. Fertil. Steril. 74(2), 313 – 318, aug. 2000.

Ohwada, M.; Suzuki, M.; Sato, I.; Tsukamoto, H.; Watanabe, K. **Glutathione peroxidase activity in endometrium: effects of sex hormones and cancer**. Gynec Oncol 60(2), 277-282, feb. 1996.

Paoletti, F.; Mocali, A.; Aldinucci, D. **Superoxide-driven NAD(P)H oxidation induced by EDTA-manganese complex and mercaptoethanol**. Chem. Biol. Interact. 76(1), 3-18, 1990.

Pepperell, J.R.; Porterfield, D.M.; Keefe, D.L.; Behrman, H.R.; Smith, P.J. **Control of ascorbic acid efflux in rat luteal cells: role of intracellular calcium and oxygen radicals**. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 285(3), C642-51, sep. 2003.

Pinto, R.E.; Bartley, W. **The Nature of the Sex-Linked Differences in Glutathione Peroxidase Activity and Aerobic Oxidation of Glutathione in Male and Female Rat Liver**. Biochem. J 115, 449-456, 1969.

Quarmby, V.E.; Korach, K.S. **The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus**. Endocrinology, 114: 694 – 702, mar 1984.

Quinn , P.G.; Payne, A.H. **Steroid product-induced, oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in Leydig cell cultures. Relationship to desensitization.** J. Biol. Chem. 25,260(4), 2092-2099, feb. 1985.

Ramos-Vasconcelos, G.R.; Cardoso, L.A.; Hermes-Lima, M. **Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*.** Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 140(2),165-174, feb 2005.

Remmers, D.E.; Cioffi, W.G.; Bland, K.I.; Wang, P.; Angele, M.K.; Chaudry, I.H. **Testosterone: The Crucial Hormone Responsible for Depressing Myocardial Function in Males After Trauma-Hemorrhage.** Ann. of Surg. 227(6) 790-799,1998.

Riley, J.C.; Behrman, H.R. **In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis.** Endocrinology 128, 1749 – 1753, Apr 1991.

Romer, W.; Oettel, M.; Menzenbach, B.; Droescher, P.; Schwarz, S. **Novel Estrogens and their radical scavenging effects, iron-chelating, and total antioxidative activities: 17 alpha-substituted analogs of delta 9(11)-dehydro-17 beta-estradiol.** Steroids. 62(11), 688-94, nov 1997.

Rubinek, T.; Rubinfeld, H.; Hadani, M.; Barkai, G.; Shimon, I. **Nitric oxide stimulates growth hormone secretion from human fetal pituitaries and cultured pituitary adenomas.** Endocrine 28,2, 209-216, nov 2005.

Salmen, J.J.; Skufca, F.; Matt, A.; Gushansky, G.; Mason, A.; Gardiner, C.S. **Role of glutathione in reproductive tract secretions on mouse preimplantation embryo development.** Biol. Reprod. 73(2),308-314, Aug 2005.

Sakaguchi, S.; Kanda, N.; Hsu, C.C.; Sakaguchi, O. **Lipid peroxide formation and membrane damage in endotoxin-poisoned mice.** Microbiol Immunol. ;25(3):229-44, 1981.

Schaberg, E.S.; Jordan, W.H.; Kuyatt, B.L. **Artificial intelligence in automated classification of rat vaginal smears cells.** Anal. Quant. Cytol. Hist. 14 (6), 446-50, dec. 1992.

Yang, SH.; Liu, R.; Perez, E.J.; Wen, Y.; Stevens, S.M.Jr.; Valencia, T.; Brun-Zinkernagel, AM.; Prokai, L.; Will, Y.; Dykens, J.; Koulen, P.; Simpkins, J.W. **Mitochondrial localization of Estrogen receptor  $\beta$ .** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 23, 101(12), 4130–4135, mar. 2004.

Shwaery, G.T.; Vita, J.Á.; Keaney, J.F. **Antioxidant Protection of LDL by Physiological Concentration of 17 $\beta$ -Estradiol.** Circulation 95(6),1378-1385,1997.

Singh, D.; Pandey, R.S. **Changes in catalase activity and hydrogen peroxide level in rat ovary during Estrous cycle and induction of catalase in rat ovary by estradiol-17 beta.** Indian. J. Exp. Biol. 36(4),421-3, Apr. 1998.

Singhal, S.S.; Yallampali, C.; Singhal, J.; Piper, J.T.; Awasthi, S. **Purification and characterization of glutathione S-transferases of rat uterus.** Intern. Jour. Biochem. Cell Biol. 28(11), 1271-1283, 1996.

Skarzynski, D.J.; Jaroszewski, J.J.; Okuda, K. **Role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in luteolysis in cattle.** Domest. Anim. Endocrinol. 29(2),340-6, aug 2005.

Smith, M.S.; Freeman, M.E.; Neill, J.D. **The control of progesterone secretion during the Estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy.** Endocrinology 96(1):219-226, jan 1975.

Straub, R.H.; Harle, P.; Kriegel, M.; Scholmerich, J.; Lorenz, H.M. **Adrenal and gonadal hormone variations during a febrile attack in a woman with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome.** J. Clin. Endocrinol . Metab. 90(10),5884-7, oct 2005.

Sudhir, J.; Thomas, M.; Kumar, G.P.; Laloraya, M. **Programmed Lipid Peroxidation of Biomembranes Generating Kinked Phospholipids Permitting Local Molecular Mobility: A peroxidative theory of fluidity Management.** Biochem. Bioph. Res. Comm. 195:574-580, 1993.

Sugino, N.; Karube-Harada, A.; Taketani, T.; Sakata, A.; Nakamura, Y. **Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F2alpha production through nuclear factor-kappaB activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation.** J. Reprod. Dev. 50(2):215-25, apr. 2004.

Swierczynski, J.; Bannasch, P.; Mayer, D. **Increase of lipid peroxidation in rat liver microsomes by dehydroepiandrosterone feeding.** Biochem. Bioph. Acta 1315, 193 – 198, 1996.

Tibbetts, T.A.; Conneely, O.M.; O'Malley, B.W. **Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus.** Biol. Reprod. 60, 1158-1165, 1999.

Telci, A.; Cakatay, U.; Akhan, S.E; Bilgin, M.E.; Turfanda, A.; Sivas, A. **Postmenopausal hormone replacement therapy use decreases oxidative protein damage.** Gynecol. Obstet. Invest. 54(2),88-93, 2002.

Tsai, C.L.; Chang, L.Y.; Chow, K.C.; Chan, W.K.; Chen, Y.L.; Lu, F.J. **Catalase prevents estradiol – induced chondrocyte cytotoxicity.** Life Sciences 62 (13), 1147-1152, 1998.



Winters, S.J.; Moore, J.P. **Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates.** Mol. Cell Endocrinol. 29,234(1-2),19-25, apr. 2005.

van der Beek, E.M. **Circadian control of reproduction in the female rat.** Prog. Brain Res.111,295-320, 1996.

Vaskivuo, T.E.; Ottander, U.; Oduwole, O.; Isomaa, V.; Vihko, P.; Olofsson, J.I.; Tapanainen, J.S. **Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression.** Mol. Cell Endocrinol. 30,194(1-2),191-200, aug. 2002.

Yen, S.H.; Pan, J.T. **Nitric oxide plays an important role in the diurnal change of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and prolactin secretion in ovariectomized, estrogen/progesterone-treated rats.** Endocrinology 140(1):286-91, jan. 1999.

Young, A.J.; Lowe, G.M. **Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids.** Arch. Biochem. Biophys. 1;385(1),20-27, jan. 2001.

Zirkin, B.R.; Chen, H. **Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging.** Biol Reprod. 63(4),977-981, oct. 2000.

Zusterzeel, P.L.; Peters, W.H.; De Bruyn, M.A.; Knapen, M.F.; Merkus, H.M.; Steegers, E.A. **Glutathione S-transferase isoenzymes in decidua and placenta of preeclamptic pregnancies.** Obstet. Gynecol. 94(6),1033-1038, dec. 1999.

## GLOSSÁRIO

---

1. **Amenorréia:** ausência de fluxo menstrual por mais de 90 dias.
2. **Adeniose:** implantação de endométrio ectópico no útero.
3. **Condrócitos:** células que compõem os segmentos cartilagosos das articulações e que estão envolvidos em mecanismos de doenças degenerativas, como a artrose.
4. **Endometriose:** implantação de endométrio ectópico fora do útero.
5. **Gonadotrofina Coriônica:** hormônio produzido pelo trofoblasto, com estrutura molecular semelhante ao LH que estimula o corpo lúteo a produzir progesterona.
6. **Lordose:** imobilidade dorsal da fêmea quando estimulada pelo macho, arqueia seu dorso e move sua cauda. Dessa maneira permite a monta e a penetração pelo macho. Reflexo - passivo
7. **Luteólise:** degradação do corpo lúteo promovida pela infiltração tecidual de leucócitos.
8. **NADPH oxidase:** enzima que participa na formação do radical livre superóxido  $O_2^-$  por meio do consumo de NADPH.
9. **Ooforectomia:** retirada dos ovários.
10. **Radicais Livres:** toda espécie química com um ou mais átomos que possuem em seu orbital mais externo elétrons desemparelhados. São mais comuns as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

---

# **ANEXO A**

MAPA DA CITOLOGIA VAGINAL DAS RATAS

---

**ANEXO A: MAPA DE CITOLOGIA VAGINAL DIÁRIA DAS RATAS SACRIFICADAS NA FASE I**

<b>A/D</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
<b>GAIOLA 1</b>															
1.1	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
1.2	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	D	PE	E	D	D
1.3	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
1.4	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
<b>GAIOLA 2</b>															
2.1	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
2.2	E	D	D	PE	-	D	D	D	PE	E	D	D	D	PE	E
2.3	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E
2.4	D	PE	E	D	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
2.5	E	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	PE	E
<b>GAIOLA 3</b>															
3.1	E	D	D	PE	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D
3.2	E	D	D	PE	-	D	D	PE	?	D	D	PE	E	D	D
3.3	E	D	D	PE	-	D	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
3.4	E	D	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
3.5	E	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	*	D	D	PE	E

A/D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>GAIOLA 4</b>															
4.1	D	D	D	D	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
4.2	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE/E	E	D	D	PE
4.3	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	PE	*	D	D	PE	E
4.4	D	D	D	PE	-	D	D	D	PE	E	D	D	D	PE	E
4.5	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
<b>GAIOLA 5</b>															
5.1	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
5.2	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
5.3	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
5.4	E	D	D	PE	-	D	D	PE	E	D	*	PE	E	D	D
5.5	E	D	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
<b>GAIOLA 6</b>															
6.1	PE	E	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	D	PE
6.2	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
6.3	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
6.4	D	D	PE	E	-	D	D	PE	E	D	D	?	PE	E	D
6.5	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E
<b>GAIOLA 7</b>															
7.1	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
7.2	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
7.3	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	D	D	D	PE	E
7.4	D	D	PE	E	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
7.5	PE	E	D	D	-	PE	*	D	D	PE	E	D	D	PE	E

<b>A/D</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
<b>GAIOLA 8</b>															
8.1	E	D	D	PE	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D
8.2	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E
8.3	E	D	D	PE	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D
8.4	PE	E	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	PE	E
8.5	E	D	D	PE	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D

**ANEXO A: MAPA DE CITOLOGIA VAGINAL DIÁRIA DAS RATAS SACRIFICADAS NA FASE II**

<b>A/D</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<b>GAIOLA 1</b>																									
1.0	D	PE	E	D	D	-	E	E	D	D	D	PE	E	D	-	D	PE	E	D	D	D	PE	E	D	S
1.1	D	PE	E	D	D	-	PE	D	D	D	PE	E	D	D	-	PE	E	D	D	D	PE	E	D	S	
1.2	E	E	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	S	
1.3	D	D	PE	PE	E	-	D	D	D	PE	D	D	PE	D	-	D	PE	D	D	D	PE	E	D	S	
1.4	D	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	?	D	D	E	S
1.5	D	D	D	D	D	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	PE	?	D	D	S	
<b>GAIOLA 2</b>																									
2.0	D	D	D	PE	E	-	D	D	PE	E	E	D	D	D	-	D	D	D	D	D	?	D	PE	S	
2.1	PE	E	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	S	
2.2	D	D	PE	E	D	-	D	PE	E	D	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	D	PE	E	D	S
2.3	D	D	D	D	D	-	D	D	D	PE	E	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	D	D	D	D	S
2.4	D	D	D	D	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	S	
2.5	D	D	D	D	D	-	D	D	D	E	D	D	PE	E	-	D	D	D	PE	E	E	D	D	PE	S
<b>GAIOLA 3</b>																									
3.1	D	E	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	-	PE	E	D	D	PE	E	E	D	PE	S
3.2	?	E	D	D	D	-	D	D	D	PE	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	S	
3.3	PE	E	D	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	S
3.4	D	PE	E	D	D	-	PE	E	D	D	PE	E	E	D	-	D	PE	E	D	D	D	PE	E	D	S
3.5	D	D	D	D	PE	-	D	PE	E	D	D	D	PE	E	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE	S

A/D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
<b>GAIOLA 4</b>																										
4.0	D	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	D	E	D	D	PE	S	
4.1	PE	D	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	-	PE	E	D	D	D	D	D	D	D	D	S
4.2	D	D	PE	D	D	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	D	D	D	D	D	S
4.3	PE	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	E	D	D	-	D	D	D	D	D	D	D	PE	E	S	
4.4	D	D	D	D	D	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	-	D	D	PE	E	D	D	D	PE	E	S	
4.5	D	D	PE	E	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	S		
<b>GAIOLA 5</b>																										
5.0	D	PE	E	D	D	-	PE	E	D	D	D	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	S		
5.1	D	D	D	D	PE	-	D	D	D	PE	E	D	D	D	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D	S	
5.2	D	D	D	D	D	-	D	D	D	D	PE	E	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	S		
5.3	PE	E	D	D	PE	-	D	D	D	D	D	D	D	D	-	D	D	PE	E	D	D	D	PE	S		
5.4	D	D	D	D	D	-	D	D	D	D	D	D	PE	D	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D	S	
5.5	E	D	D	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	E	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	S		
6.0	E	D	D	PE	E	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	-	D	-	E	D	D	PE	E	D	S		
<b>GAIOLA 6</b>																										
6.1	PE	PE	E	E	D	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	-	D	-	E	D	D	D	D	PE	S		
6.2	E	D	D	D	PE	-	D	D	D	PE	E	D	D	D	-	E	-	D	PE	E	D	D	D	D	S	
6.3	PE	E	D	D	PE	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	-	D	-	E	D	D	PE	E	D	S		
6.4	D	D	D	PE	E	-	D	D	PE	E	D	D	D	PE	-	D	-	D	PE	E	D	D	D	PE	S	
6.5	D	D	PE	D	D	-	PE	E	D	D	D	PE	E	D	-	PE	-	D	D	PE	E	D	D	PE	S	



**ANEXO A: MAPA DE CITOLOGIA VAGINAL DIÁRIA DAS RATAS SACRIFICADAS NA FASE III**

A/D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>GAIOLA 0</b>																				
0.1	E	D	D	D	-	D	D	D	-	D	D	D	*	E	D	D	*	E	D	D
0.2	PE	E	D	*	D	?	D	D	-	?	?	?	D	D	D	D	PE	E	D	D
0.3	E	D	D	PE	E	D	D	?	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
0.4	?	D	*	E	*	*	PE	E	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E
<b>GAIOLA 1</b>																				
1.1	?	E	D	D	PE	E	D	D	-	-	PE	E	D	D	PE	E	*	D	PE	E
1.2	PE	E	D	D	D	PE	E	*	-	*	PE	E	E	*	D	PE	E	D	D	D
1.3	D	D	D	D	PE	E	D	D	-	E	*	*	PE	E	D	D	PE	E	D	D
1.4	D	D	D	*	*	*	-	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	D
1.5	D	PE	E	D	D	PE	E	D	-	D	PE	E	D	D	D	PE	E	D	D	D
<b>GAIOLA 2</b>																				
2.1	E	D	D	*	*	*	*	*	-	*	?	PE	?	*	*	*	*	*	D	D
2.2	D	PE	E	D	D	PE	E	E	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	D
2.3	D	D	D	D	D	D	D	D	-	D	D	D	D	D	D	?	E	D	D	PE
2.4	E	D	D	PE	E	D	D	?	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
2.5	PE	E	D	D	PE	E	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D

A/D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>GAIOLA 3</b>																				
3.1	D	D	D	D	*	*	*	*	-	D	*	*	*	*	PE	*	*	?	E	D
3.2	D	PE	E	E	D	D	PE	E	-	D	D	PE	*	*	D	D	D	D	D	D
3.3	D	D	D	D	D	D	*	*	-	?	?	D	E	D	D	PE	E	D	D	PE
3.4	D	D	D	D	D	D	D	D	-	D	D	D	?	E	D	D	PE	E	D	D
3.5	D	D	D	D	D	D	D	D	-	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E
<b>GAIOLA 4</b>																				
4.1	D	D	PE	E	D	?	D	D	-	D	PE	E	D	D	D	PE	E	D	*	D
4.2	D	D	D	D	D	D	E	*	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
4.3	E	D	D	D	PE	E	D	D	-	PE	E	D	D	PE	E	D	D	D	D	PE
4.4	E	D	D	*	?	*	D	PE	-	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D	D	PE
4.5	PE	E	D	D	D	D	D	D	-	D	D	D	*	*	*	*	*	PE	PE	E
<b>GAIOLA 5</b>																				
5.1	D	D	-	D	PE	E	D	D	-	D	D	*	*	*	D	*	D	PE	E	D
5.2	D	D	?	?	D	D	D	*	-	D	D	D	*	D	D	PE	E	D	D	PE
5.3	D	D	D	D	D	D	D	D	-	D	D	PE	E	E	D	D	PE	E	D	D
5.4	D	D	D	PE	E	D	*	D	-	?	E	D	D	PE	E	D	D	PE	E	D
5.5	D	D	D	PE	E	D	D	PE	-	D	D	PE	E	*	*	*	E	D	D	PE
<b>GAIOLA 6</b>																				
6.1	*	*	PE	E	D	D	PE	E	-	D	PE	PE	D	D	PE	E	D	D	D	D
6.2	D	PE	E	D	D	?	PE	E	-	D	PE	E	D	*	PE	E	E	D	D	PE
6.3	D	D	D	PE	E	D	D	D	-	E	D	D	PE	E	D	D	D	PE	E	D
6.4	E	D	D	PE	E	E	D	D	-	*	D	D	D	PE	E	E	D	D	D	*
6.5	E	D	D	PE	PE	E	D	D	-	PE	E	D	*	D	PE	E	E	D	PE	E

A/D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>GAIOLA 7</b>																				
7.1	E	D	D	D	PE	E	D	D	-	D	D	D	D	?	?	D	D	D	D	D
7.2	*	*	?	D	?	E	*	?	-	E	D	D	PE	E	E	D	D	D	PE	E
7.3	D	D	D	D	D	D	D	D	-	D	D	E	*	D	PE	E	D	D	PE	E
7.4	D	D	PE	E	D	D	D	D	-	E	D	D	D	PE	E	D	D	D	D	D
7.5	D	PE	E	D	D	D	PE	E	-	D	D	PE	E	D	D	D	PE	E	D	D

**Legenda:**

**A/D** – ANIMAL/DIA

**PE** – Proestro

**E** – Estro

**D** – Diestro

**S** – Animal sacrificado no dia anterior.

**(-)** – Não foi realizada citologia vaginal neste dia.

**?** – Não foi possível identificar a fase na observação da citologia vaginal a fresco.

**(\*)** – Não havia material suficiente na lâmina para se realizar a leitura.

---

# **ANEXO B**

Variações de insolação, temperatura e umidade relativa do ar no período referente aos experimentos.

---



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA ABASTECIMENTO E PECUÁRIA  
 INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET  
 ESTAÇÃO CLIMATOLÓGICA PRINCIPAL - BRASÍLIA - DF

Data	INSOLACAO, TOTAL DIARIO	TEMPERATURA MAXIMA, DIARIA	TEMPERATURA MINIMA, DIARIA	UMIDADE RELATIVA DO AR, MEDIA DIARIA
08-ABR-1999	8,0	29,4	17,5	64,8
09-ABR-1999	9,9	28,6	18,0	65,0
10-ABR-1999	10,1	27,6	18,7	61,3
11-ABR-1999	10,3	26,8	17,1	65,0
12-ABR-1999	8,4	27,0	16,5	64,5
13-ABR-1999	8,2	28,2	18,1	61,3
14-ABR-1999	8,0	28,6	17,6	58,3
15-ABR-1999	8,3	29,8	17,5	54,3
16-ABR-1999		27,7	18,0	77,3
17-ABR-1999	2,8	24,5	15,8	85,8
18-ABR-1999	9,0	25,8	14,1	71,0
19-ABR-1999	6,6	28,2	16,2	62,8
20-ABR-1999	5,5	28,5	16,7	79,8
21-ABR-1999	7,2	27,6	16,5	68,5
22-ABR-1999	9,8	27,4	17,8	64,8
23-ABR-1999	9,5	26,0	17,8	65,0
24-ABR-1999	9,2	26,5	16,7	64,3
25-ABR-1999	8,9	26,8	15,9	61,8
26-ABR-1999	8,3	27,2	17,0	61,8
27-ABR-1999	9,9	26,0	15,3	48,5
28-ABR-1999	7,7	25,2	13,8	59,3
29-ABR-1999	8,3	25,2	16,1	63,8
30-ABR-1999	9,5	26,0	16,5	58,5
01-MAI-1999	9,0	26,6	17,7	63,8
02-MAI-1999	8,4	25,7	17,0	63,0
03-MAI-1999	7,4	25,7	16,4	66,5
04-MAI-1999	7,9	26,4	16,8	57,0
05-MAI-1999	8,5	28,4	17,2	61,3
06-MAI-1999	9,7	28,2	16,0	60,8
07-MAI-1999	5,7	26,0	18,1	69,3
08-MAI-1999	8,0	26,5	16,9	77,8
09-MAI-1999	7,0	25,2	16,5	79,0
10-MAI-1999	6,5	24,2	17,3	73,8
11-MAI-1999	6,0	24,6	15,8	69,0
12-MAI-1999	9,3	27,2	14,6	58,0
13-MAI-1999	8,7	26,6	16,3	56,3
14-MAI-1999	10,0	26,3	14,3	54,0
15-MAI-1999	7,1	23,4	14,5	68,8
16-MAI-1999	8,4	23,0	13,5	54,5
17-MAI-1999	8,0	24,5	13,3	53,0
18-MAI-1999	8,6	26,4	12,6	48,0
19-MAI-1999	7,6	26,6	14,9	45,3
20-MAI-1999	9,5	25,6	14,0	55,3
21-MAI-1999	9,6	25,8	10,7	51,8
22-MAI-1999	9,9	26,7	10,7	53,5
23-MAI-1999	9,4	27,6	12,6	47,5
24-MAI-1999	8,9	28,6	15,0	51,3
25-MAI-1999	8,0	27,4	14,6	52,8
26-MAI-1999	9,4	26,3	15,7	49,8
27-MAI-1999	8,1	26,4	13,1	50,3
28-MAI-1999	9,1	26,0	16,1	59,8
29-MAI-1999	8,4	27,3	18,1	59,5
30-MAI-1999	8,6	27,9	17,0	54,8
31-MAI-1999	8,8	26,3	12,1	58,5
01-JUN-1999	7,8	26,5	11,7	48,5
02-JUN-1999	8,8	26,7	15,4	59,8
03-JUN-1999	7,8	26,6	16,5	56,3

Data	INSOLACAO, TOTAL DIARIO	TEMPERATURA MAXIMA, DIARIA	TEMPERATURA MINIMA, DIARIA	UMIDADE RELATIVA DO AR, MEDIA DIARIA
19-JUL-2000	9,9	27,4	10,1	34,0
20-JUL-2000	9,8	27,8	13,1	37,5
21-JUL-2000	9,6	29,1	14,1	42,3
22-JUL-2000	9,5	28,9	16,4	48,5
23-JUL-2000	9,1	28,4	16,8	64,8
24-JUL-2000	5,4	24,5	12,4	72,0
25-JUL-2000	7,9	28,4	14,3	54,8
26-JUL-2000	8,0	26,8	17,1	63,0
27-JUL-2000	9,4	26,6	16,5	59,8
28-JUL-2000	9,8	25,4	15,1	51,3
29-JUL-2000	10,1	24,5	12,3	50,5
30-JUL-2000	10,1	26,8	12,2	39,5
31-JUL-2000	10,0	26,1	13,3	32,5
01-AGO-2000	7,3	25,0	13,1	39,3
02-AGO-2000	9,2	26,6	13,5	43,8
03-AGO-2000	9,4	27,0	14,6	44,0
04-AGO-2000	8,4	28,2	16,1	40,5
05-AGO-2000	8,9	26,0	17,5	48,3
06-AGO-2000	7,6	25,4	14,7	49,8
07-AGO-2000	10,0	27,8	14,5	33,8
08-AGO-2000	10,0	27,5	14,3	28,8
09-AGO-2000	8,8	28,6	14,6	38,3
10-AGO-2000	8,1	28,8	15,4	40,3
11-AGO-2000	9,1	29,3	17,3	40,8
12-AGO-2000	8,4	29,2	16,5	46,0
13-AGO-2000	8,8	27,6	16,1	54,5
14-AGO-2000	10,0	27,6	16,6	48,5
15-AGO-2000	10,3	26,6	15,3	40,8
16-AGO-2000	10,2	27,9	13,9	32,8
17-AGO-2000	9,7	26,4	16,2	36,3
18-AGO-2000	9,4	27,6	14,3	38,0
19-AGO-2000	10,3	27,7	14,5	34,0
20-AGO-2000	10,2	27,1	16,1	37,3
21-AGO-2000	10,3	26,4	16,2	38,3
22-AGO-2000	10,4	27,5	15,9	36,8
23-AGO-2000	9,4	28,2	15,6	33,3

Data	INSOLACAO, TOTAL DIARIO	TEMPERATURA MAXIMA, DIARIA	TEMPERATURA MINIMA, DIARIA	UMIDADE RELATIVA DO AR, MEDIA DIARIA
03-JUL-2001	5,5	24,5	14,0	49,8
04-JUL-2001	9,8	27,0	12,5	48,8
05-JUL-2001	9,8	26,0	13,1	46,3
06-JUL-2001	9,8	24,0	13,3	45,0
07-JUL-2001	9,8	24,3	13,5	54,5
08-JUL-2001	8,4	23,9	15,0	61,3
09-JUL-2001	9,9	24,5	14,4	53,8
10-JUL-2001	9,9	25,1	13,3	49,8
11-JUL-2001	9,9	26,5	12,5	46,0
12-JUL-2001	9,1	28,3	14,9	46,5
13-JUL-2001	7,9	26,3	15,5	50,8
14-JUL-2001	9,6	25,1	15,9	50,3
15-JUL-2001	10,0	24,5	13,4	47,5
16-JUL-2001	10,0	24,4	13,6	51,5
17-JUL-2001	7,6	25,6	14,7	54,8
18-JUL-2001	5,7	24,0	15,7	73,5
19-JUL-2001	7,0	26,8	14,2	51,3
20-JUL-2001	8,6	28,0	15,7	52,8
21-JUL-2001	7,8	28,4	15,6	46,5
22-JUL-2001	7,0	29,0	18,6	42,3
23-JUL-2001	9,6	28,9	17,1	36,0
24-JUL-2001	9,4	27,3	16,1	50,8
25-JUL-2001	9,7	25,9	16,6	49,5
26-JUL-2001	10,1	25,8	16,7	49,0
27-JUL-2001	10,2	26,2	15,2	
28-JUL-2001	9,4	25,4	13,1	56,8
29-JUL-2001	10,1	26,2	12,9	45,3
30-JUL-2001	8,9	24,5	15,7	51,3
31-JUL-2001	6,0	23,4	14,0	58,0
01-AGO-2001	10,1	24,6	14,1	49,5
02-AGO-2001	10,1	24,3	14,1	43,8
03-AGO-2001	8,7	24,2	14,3	52,8
04-AGO-2001	9,3	24,1	13,9	48,3
05-AGO-2001	9,8	25,4	13,3	47,3
06-AGO-2001	10,1	25,1	13,8	44,3
07-AGO-2001	10,3	25,3	14,1	38,5

---

# **ANEXO C**

Controle da massa corpórea dos animais no momento  
da admissão no biotério da Faculdade de Ciências da  
Saúde

---



FASE I		FASE II		FASE II	
ANIMAL	MASSA	ANIMAL	MASSA	ANIMAL	MASSA
1.1	195,6	0.1	243,4	0.1	200
2.1	208,5	1.1	248,6	1.1	214,7
3.1	206,5	1.2	208	2.1	206,8
4.1	191,4	1.3	227,5	3.1	245,65
1.3	224	1.4	250,4	4.1	200,8
2.3	206,2	1.5	230,5	5.1	230,8
3.3	182,7	0.2	247,2	6.1	231,9
4.3	215,3	1.2	214,3	7.1	215,5
5.3	182,7	2.2	217,7	0.2	186,4
1.4	189	3.2	229,5	1.2	229,6
2.4	204,2	4.2	224,9	2.2	203,8
3.4	193,8	5.2	215,5	3.2	201,9
4.4	180	1.3	244,8	4.2	197,7
5.4	196	2.3	261	5.2	208,3
1.5	192,8	3.3	281,9	6.2	197,5
2.5	207,3	4.3	227,7	7.2	200
3.5	193,8	5.3	235,8	0.3	190,4
4.5	203,4	0.4	226,3	1.3	203,2
1.6	244	1.4	196,3	2.3	194
2.6	195	2.4	209	3.3	201,3
3.6	217,5	3.4	227,3	4.3	231,5
4.6	244,4	4.4	233	5.3	237,2
5.6	242,5	5.4	251	6.3	228,9
1.7	191,2	0.5	244	7.3	215,2
2.7	187,5	1.5	249,5	0.4	185,2
4.7	195	2.5	238,3	1.4	201,2
5.7	205,1	3.5	212,8	2.4	177,3
1.8	199	4.5	284,3	3.4	201,6
2.8	222,9	5.5	258,7	4.4	185,7
3.8	212,4	0.6	241,6	5.4	187,2
4.8	200,9	1.6	219,8	6.4	195,2
5.8	175,6	2.6	226,6	7.4	234,4
1.11	214,1	3.6	235,5	0.5	214,8
2.11	204,5	4.6	222,7	1.5	230,6
3.11	224,6	5.6	226,4	2.5	224,2
4.11	192			3.5	215
5.11	204,8			4.5	218,5
1.13	200,6			5.5	213,3
2.13	207,6			6.5	213,4
4.13	193,6			7.5	195,2
5.13	195,7				
<b>MÉDIA</b>	<b>203,5</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>234,62</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>208,4</b>
<b>DP</b>	<b>0,07</b>	<b>DP</b>	<b>12,02</b>	<b>DP</b>	<b>3,39</b>
<b>MÉDIA GERAL</b>			<b>216</b>		
<b>DP GERAL</b>			<b>16,7</b>		

---

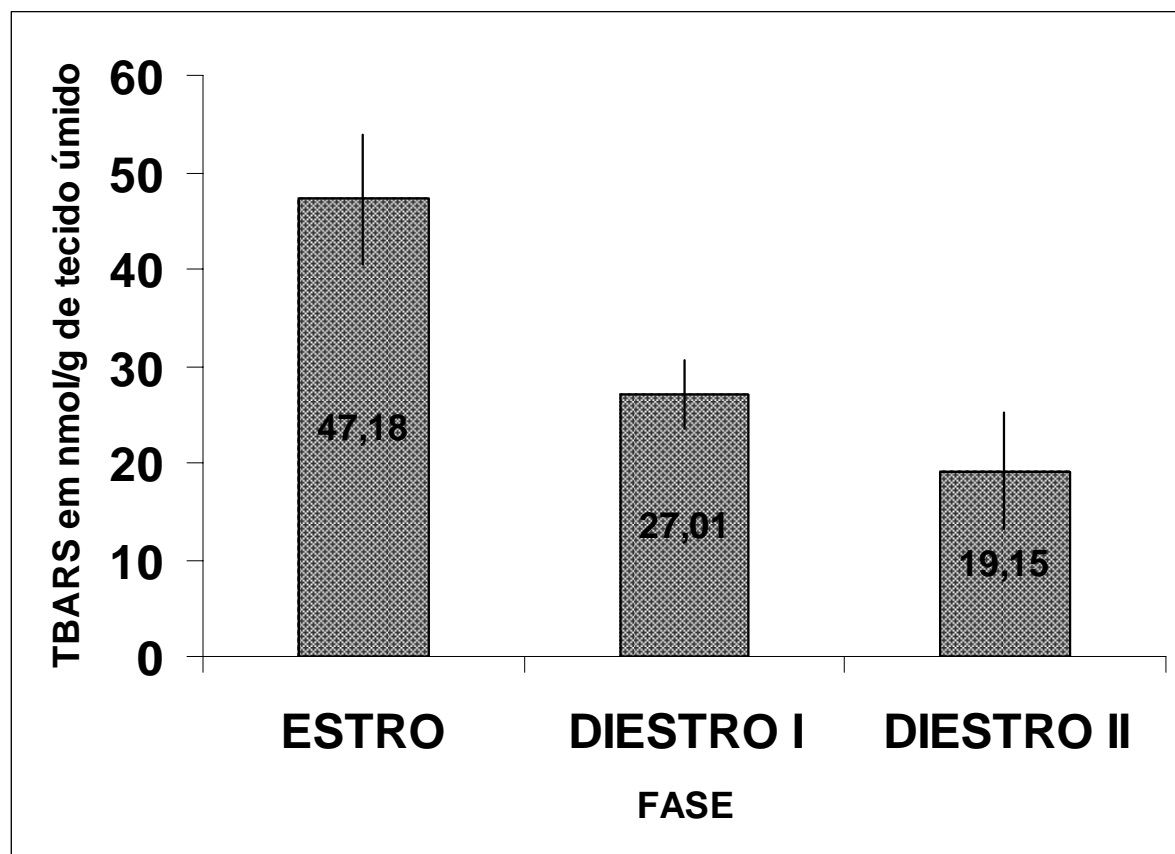
# **ANEXO D**

Resultados preliminares de hipotálamo.

---

## Resultados preliminares de hipotálamo

---



**Gráfico 10:** Dosagem dos níveis de TBARS em hipotálamo de ratas em quatro fases do ciclo estral de ratas. Não houve diferença estatística significante entre os grupos. Para n de E = 4, DI = 4, DII = 4.