

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

*Exposição Curta a Feromônios de Ratos Machos Diminui a Ansiedade
e Atividade Locomotor-Exploratória, e Modula o Perfil Redox do
Sistema Nervoso Central e Trato Reprodutor de Fêmeas Virgens*

Guilherme Antônio Behr



Porto Alegre

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Exposição Curta a Feromônios de Ratos Machos Diminui a Ansiedade e Atividade Locomotor-Exploratória, e Modula o Perfil Redox do Sistema Nervoso Central e Trato Reprodutor de Fêmeas Virgens

Guilherme Antônio Behr

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica



Porto Alegre

2009

*“O mundo está cheio de coisas óbvias,
que ninguém, em momento algum, observa!”*

Sir Arthur Conan Doyle

Para minha mãe e meu pai.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial minha mãe e meu pai, que de uma forma ou de outra criaram as facilidades que me permitiram chegar aonde cheguei e realizar esta conquista.

Ao meu orientador, que além de ser um prestigiado professor e chefe de laboratório, sempre apoiou as minhas idéias e projetos que surgiram durante os quase oito anos de convívio.

Ao meu "co-orientador" e amigo Dr. Evandro Gomes da Silva, que apesar de não estar tão presente durante o mestrado, oportunizou inúmeras discussões durante toda a minha formação acadêmica.

Ao laboratório *Centro de Estudos em Estresse Oxidativo*, e ao Departamento de Bioquímica, por serem centros de referência em ensino e pesquisa de bioquímica, no estado, Brasil e no mundo.

Aos colegas de laboratório, e grandes companheiros: Juvenil, Marquito, Bobs, Geléia, Marinho, Erexa, Maurão, Chaca, Alfilho, Cabecinha, Lorenzi, Miguel, Roche, Mari Hoff, Fernandinha, Mari Escobar, Maria Helena, Jú, Bruna, Prof. Fábio e Prof. Felipe, e tantos outros que passaram, ou estão chegando, no *Centro de Estudos em Estresse Oxidativo*.

A todo o pessoal do biotério do Departamento de Bioquímica, em especial ao Valeri Brando e ao Marlon Diego Brando, fundamentais para a logística de meu projeto de mestrado.

Aos meus amigos de Nova Tramandaí – RS, essenciais aos finais de semana na hora de ir para praia surfar e relaxar um pouco.

As minhas companheiras de bastante tempo, Mariana, por todos os momentos que passamos juntos nestes últimos anos, e Frau, pelos latidos e lambidas de felicidade.

A todos os órgãos de fomento à pesquisa CNPq, CAPES, FAPERGS e PROPESQ-UFRGS, que com certeza colaboraram para manutenção e ampliação do laboratório nos últimos anos.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino de qualidade, gratuito e universal, a qual me acolheu e possibilitou o desenvolvimento deste e tantos outros projetos.

Índice

Prefácio.....	8
---------------	---

Parte I

Resumo.....	10
-------------	----

Abstract.....	12
---------------	----

Lista de abreviaturas.....	14
----------------------------	----

1. Introdução

1. 1. Comunicação química: o papel dos feromônios.....	15
--	----

1. 2. Espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes.....	17
--	----

2. Objetivos

2. 1. Objetivo geral	
----------------------	--

2. 2. Objetivos específicos.....	19
----------------------------------	----

Parte II

Capítulo I – “Decreased anxiety-like behaviour and locomotor/exploratory activity, and modulation in hypothalamus, hippocampus, and frontal cortex redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues”.....	21
--	----

Capítulo II – “Modulation in reproductive tissue redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues”.....	23
--	----

Parte III

3. Discussão.....25

4. Conclusão.....34

Referências bibliográficas.....35

ANEXOS

ANEXO I – “Pancreas β -cells morphology, liver antioxidant enzymes and liver oxidative parameters in alloxan-resistant and alloxan-susceptible Wistar rats: a viable model system for the study of concepts into reactive oxygen species”.....44

Prefácio

Esta dissertação de mestrado, intitulada, “Exposição curta a feromônios de ratos machos diminui a ansiedade e atividade locomotor-exploratória, e modula o perfil redox do sistema nervoso central e trato reprodutor de fêmeas virgens”, será apresentada em três partes.

A primeira parte traz um resumo da dissertação, um resumo em inglês, uma introdução sobre o assunto, e os objetivos da dissertação. A segunda parte apresenta os dois capítulos contidos na dissertação, elaborados na forma de artigo científico, sendo que os dois artigos estão aceitos para publicação. A terceira parte da dissertação contém a discussão e a conclusão a respeito dos resultados apresentados nos dois capítulos anteriores.

Como anexo consta um artigo científico elaborado durante o período de realização do mestrado. Sendo este meu trabalho de conclusão de curso em ciências biológicas, o qual veio a ser aceito para publicação no ano de 2008.

PARTE I

Resumo

Sinais químicos são amplamente utilizados para comunicação social intra-específica em uma grande quantidade de organismos vivos, indo de bactérias a mamíferos. Como exemplo, mamíferos secretam juntamente com a urina moléculas que promovem modulações neuroendócrinas, com alterações no comportamento e fisiologia do animal que recebe o sinal.

Neste trabalho foram utilizadas ratas Wistar fêmeas virgens, com quatro meses de idade, apresentando ciclo estral regular. As fêmeas utilizadas nos experimentos encontravam-se na passagem de fase entre proestro e estro. Em uma sala isolada, as fêmeas foram expostas durante 90 minutos à maravalha condicionada por machos. Para analisar as possíveis alterações no comportamento das fêmeas após a exposição, foram realizados os testes comportamentais: labirinto em cruz elevada, campo aberto, e caixa claro-escuro. Para os ensaios bioquímicos as fêmeas foram sacrificadas e as estruturas do sistema nervoso central, hipotálamo, hipocampo, córtex frontal, e amígdala; o bulbo olfatório; e as estruturas do sistema reprodutor, útero e ovários, foram isoladas e congeladas para análise. Foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: as atividades das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase), a quantificação das defesas antioxidantes não enzimáticas, TRAP (Total radical antioxidant potential) e TAR (Total antioxidant reactivity), e os parâmetros de dano oxidativo, TBARS (Thiobarbituric acid reactivity substances), Carbonil e conteúdo de tióis).

Nas análises comportamentais foi observado que as fêmeas apresentaram ansiedade e atividade locomotor-exploratória diminuídas após a exposição à maravalha condicionada por machos. Nos ensaios bioquímicos foi observado um aumento nas defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas em estruturas do sistema nervoso central 30 e 90 minutos após a exposição à maravalha condicionada por machos. Além disso, o hipocampo e o córtex

frontal apresentaram diminuído dano oxidativo, gerado por radicais livres, 180 e 240 minutos após a exposição. Foi observado um aumento no potencial antioxidante não enzimático e uma diminuição no dano oxidativo no tecido uterino, 30 e 90 minutos após a exposição. Por outro lado, as defesas antioxidantes nos ovários foram moduladas de maneira distinta durante os 240 minutos após a exposição.

Estes resultados trazem as primeiras evidências que o perfil oxidativo no sistema nervoso central, e sistema reprodutor feminino, são alterados por pistas químicas presentes na maravalha condicionada por machos, sugerindo que a comunicação através de feromônios é capaz de modular a produção e/ou remoção de espécies reativas de oxigênio no cérebro e trato reprodutor feminino.

Abstract

Chemical cues are widely used for intraspecific social communication in a vast majority of living organisms ranging from bacteria to mammals. As an example, mammals release olfactory cues with urine that promote neuroendocrine modulations with changes in behaviour and physiology in the receiver.

In this work, four-month-old Wistar (regular 4-day cyclic) virgin female rats were utilized in the proestrus-to-estrus phase of the reproductive cycle for experimental exposure. In an isolated room, female rats were exposed for 90 min to male-soiled bedding (MSB). Elevated plus-maze assay, open field test, and light/dark box task were performed to analyze behavioural alterations on females after exposure. For biochemical assays, female rats were killed and the hypothalamus, hippocampus, frontal cortex and amigdala; the olfactory bulb; and the uterus and ovaries were isolated for further analysis. Antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), non-enzymatic antioxidant defense measurements (TRAP and TAR), and the oxidative damage parameters (TBARS, Carbonyl and SH content) were analyzed.

In behavioural analyzes we observe that female rats show decreased anxiety and locomotory/exploratory activities after MSB exposure. In biochemical assays we observed an increase in both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in different central nervous system (CNS) structures analyzed 30 and 90 min after MSB exposure. Furthermore, hippocampus and frontal cortex showed diminished free radical oxidative damage at 180 and 240 min after exposure. We observed an increase in the non-enzymatic antioxidant potential and diminished free radical oxidative damage in uterine tissue, 30 and 90 min after exposure. Furthermore, in ovaries enzymatic defenses were modulated distinctly along the 240 min after exposure.

These results provide the first evidence that oxidative profile of female central nervous system, and reproductive system, are altered by chemical cues present in the MSB, thus suggesting that pheromonal communication is able to modulate radical oxygen species production and/or clearance in the female brain and reproductive tract.

Lista de abreviaturas

CAT – Catalase

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

MUPs – Major Urinary Proteins – proteínas majoritárias na urina

NFκB – fator nuclear B

O₂^{•-} – Radical superóxido

PKC – Proteína cinase C

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TAR – Total antioxidant reactivity – reatividade antioxidante total

TBARS – Thiobarbituric acid reactivity substances – espécies reativas ao ácido tiobarbiturico

TRAP – Total radical antioxidant potential – potencial antioxidante total não-enzimático

1. Introdução

1. 1. Comunicação química: o papel dos feromônios

A percepção das mais diferentes moléculas através do olfato é de fundamental importância para muitos animais. Algumas espécies secretam substâncias químicas no meio onde habitam para influenciar o comportamento e/ou a fisiologia de membros da mesma espécie (Shepherd, 2006). Estas substâncias são chamadas de feromônios, atuando na comunicação química intra-específica. A palavra feromônio foi cunhada pelos cientistas Peter Karlson e Adolf Butenandt por volta de 1959 a partir do grego antigo φέρω (féro) "transportar" e ὄρμῶν (órmon), particípio presente de ὀρμάω (órmao) "excitar". Desta forma, o termo já indica que se trata de substâncias que provocam excitação ou estimulam outro indivíduo.

Sinais químicos são amplamente utilizados na comunicação social intra-específica na grande maioria dos organismos vivos, indo de bactérias a mamíferos (Ben-Jacob e col., 2004; Brennan & Keverne, 2004; Johansson & Jones, 2007). Em uma grande variedade de espécies os comportamentos sexuais e reprodutivos são intimamente dependentes da comunicação via sinais químicos (Savic e col., 2001; Martínez-Rícos e col., 2007). Mamíferos secretam através da urina feromônios e moléculas relacionadas que promovem modulações neuroendócrinas, com posteriores alterações na fisiologia e comportamento do indivíduo receptor (Luo e col., 2003; Lin e col., 2005).

Algumas respostas fisiológicas e comportamentais são induzidas por moléculas voláteis, não sendo necessário que o indivíduo receptor tenha contato físico com o sinal químico (Muroi e col., 2006). Outras respostas, por serem mediadas por moléculas não-voláteis, necessitam que o indivíduo tenha contato com o local onde o sinal químico foi secretado. A grande variedade de informações que estas marcas podem carregar está

relacionada com a complexidade e diferentes possibilidades de arranjos químicos. A presença de grandes quantidades de proteínas na urina – proteinúria fisiológica – é condição obrigatória para o sucesso reprodutivo em roedores (Marchlewska-Koj e col., 2000; Beynon & Hurst, 2004), por serem muito abundantes na urina são classificadas como *Major Urinary Proteins* – MUPs. Tanto a maravalha – serragem utilizada na caixa de cobaias – habitada por machos, como a habitada por fêmeas, possuem moléculas voláteis e não-voláteis, ambas sabidamente importantes para a comunicação intra-específica, promovendo seleção do parceiro e comportamento de cópula (Marchlewska-Koj e col., 2000; Moncho-Bogani e col., 2002; Briand e col., 2004).

Há mais de meio século publicações relatam a influência de sinais químicos na comunicação sexual em roedores. Fêmeas que não vivem juntas quando agrupadas modificam ou suprimem seu ciclo estral (Van Der Lee & Boot, 1955). O ciclo estral é caracterizado por alterações hormonais que levam à ovulação, com duração média entre 4 e 5 dias em roedores. A exposição à urina de ratos machos pode restaurar e/ou sincronizar o ciclo estral de fêmeas que não ciclam (Whitten, 1956), ou acelerar a maturação sexual de jovens fêmeas (Vandenbergh, 1969). Recentemente foi reportado que a urina de ratos machos induz o diestro – fase do ciclo estral – e restabelece o ciclo estral em ratas fêmeas idosas que apresentam ciclo irregular ou não ovulam (Mora e col., 1994). Além disso, MUPs de camundongos machos podem influenciar ativamente a ovulação via órgão vomeronasal em fêmeas (Morè, 2006).

Avanços tecnológicos recentes permitiram um aprofundamento no estudo de sistemas quimiosensórios e os aspectos que influenciam na fisiologia e comportamento de vertebrados (Brennan & Zufall, 2006), indicando que sistemas hormonais ativados por feromônios exercem uma gama grande de funções neuroendócrinas no cérebro.

1. 2. Espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes

Espécies reativas são moléculas altamente instáveis que podem trocar elétrons por reações de óxido/redução formando assim radicais livres. Os radicais livres são conceituados como compostos, átomos ou moléculas capazes de difundir pelo sistema e que contém um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo, sendo assim extremamente reativos. Essa é uma definição bastante ampla e é conveniente lembrar que a reatividade dos radicais livres varia grandemente entre as mais diferentes espécies e o ambiente onde se encontram (Halliwell & Gutteridge, 2007). Mesmo sendo causadores de danos e podendo produzir disfunção celular, as espécies reativas também possuem papel fisiológico fundamental em sistemas biológicos, sugerindo uma adaptação dos organismos à presença do oxigênio ao decorrer da evolução. Espécies reativas de oxigênio – ERO – participam ativamente em diversas rotas fisiológicas tais como: proliferação, diferenciação, transformação, resposta a patógenos, apoptose, ativação de fatores de transcrição, etc. A participação ocorre em diversos níveis, desde sinalizadores celulares até compostos finais de rota (Finkel, 1998).

Radicais livres e espécies reativas relacionadas exercem importantes papéis em uma grande variedade de processo fisiológicos, incluindo sexo e reprodução (Fujii e col., 2005; Aitken & Baker, 2006). Estresse oxidativo há muito tempo é reconhecido como fator determinante para a fertilidade tanto em machos como em fêmeas. A presença de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas no espermatozóide e no fluido epididimal são essenciais para a manutenção da fertilidade em espermatozoides (Drevet, 2006). Níveis controlados do radical superóxido – $O_2^{\bullet-}$ – apresentam um importante papel na função normal do espermatozóide durante sua jornada pelo trato reprodutivo feminino (Agarwal e col., 2008a). ERO contribuem para o sucesso no processo de fertilização através da modulação de diferentes processos, como a reação acrossômica e a entrada do espermatozóide no óvulo

(Ford, 2004; Rivlin e col., 2004). Estão também envolvidos na maturação do oócito e na regressão do *corpu luteum* durante o ciclo reprodutivo ovariano normal em mamíferos (Agarwal e col., 2005). Todas estas evidências suportam a idéia que radicais livres exercem um papel fundamental na fertilização e reprodução. Recentemente, novas pesquisas sobre o papel de ERO na sobrevivência, divisão e diferenciação celular do sistema nervoso central – SNC – foram publicadas (Noble e col., 2003), e a influência da sinalização redox em processos de neurotransmissão também discutidas (Noble, 2006).

Para lidar com essas moléculas altamente reativas, mas essenciais para a homeostasia, os sistemas biológicos desenvolveram defesas antioxidantes. Existem dois grupos de defesas antioxidantes: as enzimáticas, que abrangem enzimas antioxidantes como superóxido dismutase – SOD –, catalase – CAT – e glutatona peroxidase – GPx –; e as não-enzimáticas, que engloba algumas vitaminas, glutatona – GSH –, ácido úrico, flavonóides, hormônios, quelantes de metais. Essas defesas são responsáveis por manter um nível basal de espécies reativas, de maneira que elas não sejam tóxicas para as células, mas ao mesmo tempo não eliminem totalmente a sinalização produzida por essas espécies (Halliwell & Gutteridge, 2007). ERO são produtos normais do metabolismo celular com reconhecido papel dualístico, onde as espécies reativas podem atuar de maneira deletéria/danosa ou benéfica/essencial para a manutenção do organismo vivo e/ou saudável (Valko e col. 2006). Efeitos benéficos das ERO ocorrem em níveis baixo/moderado e envolvem rotas fisiológicas na resposta celular, especialmente na sinalização celular e transdução de sinal (Valko et al. 2007).

2. Objetivos

2. 1. Objetivo geral

Feromônios são os principais fatores para modulação do comportamento em uma grande variedade de espécies. Entretanto, até a elaboração do presente estudo, faltavam trabalhos na literatura que investigassem uma possível modulação de espécies reativas e defesas antioxidantes no SNC e trato reprodutor feminino quando ratas eram excitadas por feromônios.

No presente estudo foram analisados parâmetros de estresse oxidativo (atividade de enzimas antioxidantes, defesas não-enzimáticas, danos oxidativos) no SNC e sistema reprodutor de fêmeas virgens expostas à maravalha condicionada por machos. Também foram avaliados parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade nas fêmeas após a exposição à maravalha condicionada por machos.

2. 2. Objetivos específicos

Para tal, os objetivos específicos foram desenvolvidos nos capítulos que seguem:

- Capítulo I – “Decreased anxiety-like behaviour and locomotor/exploratory activity, and modulation in hypothalamus, hippocampus, and frontal cortex redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues”

- Capítulo II – “Modulation in reproductive tissue redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues”

PARTE II

Capítulo I

“Decreased anxiety-like behaviour and locomotor/exploratory activity, and modulation in hypothalamus, hippocampus, and frontal cortex redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues”

Artigo aceito para publicação na revista
Behavioural Brain Research, special issue:
Pheromonal communication, em Nov/2008.

doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.047



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Decreased anxiety-like behavior and locomotor/exploratory activity, and modulation in hypothalamus, hippocampus, and frontal cortex redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues

Guilherme Antônio Behr^{a,*}, Leonardo Lisbôa da Motta^a, Marcos Roberto de Oliveira^a,
Max William Soares Oliveira^a, Mariana Leivas Müller Hoff^a,
Roberta Bristot Silvestrin^b, José Cláudio Fonseca Moreira^a

^a Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Lab. 32), PPG Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b PPG Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2008

Received in revised form

27 November 2008

Accepted 29 November 2008

Available online xxx

Keywords:

Chemical cues

Frontal cortex

Hippocampus

Hypothalamus

Redox profile

Antioxidant defenses

Female behavior

ABSTRACT

Chemical cues are widely used for intraspecific social communication in a vast majority of living organisms ranging from bacteria to mammals. As an example, mammals release olfactory cues with urine that promote neuroendocrine modulations with changes in behavior and physiology in the receiver. In this work, four-month-old Wistar (regular 4-day cyclic) virgin female rats were utilized in the proestrus-to-estrus phase of the reproductive cycle for experimental exposure. In an isolated room, female rats were exposed for 90 min to male-soiled bedding (MSB). Elevated plus-maze assay, open field test, and light/dark box task were performed to analyze behavioral alterations on females after exposure. For biochemical assays, female rats were killed and the hypothalamus, hippocampus, and frontal cortex were isolated for further analysis. Antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), non-enzymatic antioxidant defense measurements (TRAP and TAR), and the oxidative damage parameters (TBARS, Carbonyl and SH content) were analyzed. In behavioral analyses we observe that female rats show decreased anxiety and locomotory/exploratory activities after MSB exposure. In biochemical assays we observed an increase in both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in different central nervous system (CNS) structures analyzed 30 and 90 min after MSB exposure. Furthermore, hippocampus and frontal cortex showed diminished free radical oxidative damage at 180 and 240 min after exposure. These results provide the first evidence that oxidative profile of female CNS structures are altered by chemical cues present in the MSB, thus suggesting that pheromonal communication is able to modulate radical oxygen species production and/or clearance in the female brain.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The sense of smell is fundamentally important to many animals. Some species release chemical substances into their surroundings to influence the behavior or physiology of members of the same species [55]. Chemical cues are widely used in intraspecific social communication in a vast majority of living organisms ranging from bacteria to mammals [3,8,26]. In a variety of species, sexual and reproductive behaviors are closely dependent on communication through chemical signals [40,52]. As an example, mammals release

olfactory cues with urine that promote neuroendocrine modulations with changes in behavior and physiology in the receiver [32,35]. In addition, some behavioral and physiological responses are induced by airborne signals, while other organisms require physical contact between the receiver and the chemical cue [45]. Male and female-soiled bedding contain both volatile and non-volatile compounds that are known to be important in intraspecific communication, for instance promoting mate selection and copulatory activity [10,37,43]. Recent developments have led to an appreciation of the diversity of chemosensory systems and their complementary roles in influencing vertebrate physiology and behavior [9], thus indicating that pheromone activated hormonal systems play a wide range of neuroendocrine functions within the brain.

Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) are pivotal enzymes for the normal function of several important biological processes in mammals, with known

* Corresponding author at: Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Lab. 32), Depto Bioquímica/UFRGS, Av. Ramiro Barcelos, 2600 Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33085578; fax: +55 51 33085540.

E-mail addresses: guibebr@gmail.com, guilherme.behr@ufrgs.br (G.A. Behr).

Capítulo II

“Modulation in reproductive tissue redox profile in sexually receptive female rats after short-term exposure to male chemical cues”

Artigo aceito para publicação na revista
Chemical Senses, em Jan/2009.

doi: 10.1093/chemse/bjp004

Modulation in Reproductive Tissue Redox Profile in Sexually Receptive Female Rats after Short-Term Exposure to Male Chemical Cues

Guilherme Antônio Behr, Leonardo Lisbôa da Motta, Marcos Roberto de Oliveira, Max William Soares Oliveira, Daniel Pens Gelain and José Cláudio Fonseca Moreira

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, PPG Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to be sent to: Guilherme A. Behr, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Lab. 32), Depto Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ramiro Barcelos, 2600 Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. e-mail: guibebr@gmail.com

Abstract

It is well known that antioxidants play an important role in sperm fertility, but there is no data on the literature regarding the effect of male chemical cues in the antioxidant defenses of the female reproductive tract. Here, we evaluated oxidative parameters in ovaries and uterus of virgin female rats isolated from contact to males and exposed only to male-soiled bedding (MSB). Four-month-old Wistar (regular 4-day cyclic) virgin female rats were utilized from proestrus to estrus phase of the reproductive cycle for experimental exposure. In an isolated room, female rats were exposed for 90 min to MSB. For biochemical assays, female rats were killed by decapitation at 30, 90, 180, and 240 min after the end of exposure, and the ovaries and uterus were removed for further analysis. Antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase), the nonenzymatic antioxidant potential (total radical-trapping antioxidant parameter), and the oxidative damage parameters (thiobarbituric acid-reactive species and carbonyl content) were analyzed. We observed an increase in the nonenzymatic antioxidant potential and diminished free radical oxidative damage in uterine tissue, 30 and 90 min after exposure. Furthermore, in ovaries, enzymatic defenses were modulated distinctly along the 240 min after exposure. MSB exposure modulates the antioxidant profile in ovaries and uterus of receptive female rats. It is possible that the modifications in the oxidative profile of the female genital tract may have important implications in the process of fertilization.

Key words: antioxidant defenses, female reproductive tract, male-soiled bedding, oxidative damage, pheromonal communication

Introduction

Chemical cues are widely used in intraspecific social communication in a vast majority of living organisms ranging from bacteria to mammals (Ben-Jacob et al. 2004; Brennan et al. 2004; Johansson et al. 2007). In a variety of species, sexual and reproductive behaviors are closely dependent on communication through chemical signals (Roelofs 1995; Martínez-Rícos et al. 2007). As an example, mammals release olfactory cues with urine that promote neuroendocrine modulations with changes in behavior and physiology in the receiver (Luo et al. 2003; Lin et al. 2005). In addition, some behavioral and physiological responses can occur with airborne signals, whereas other organisms require physical contact between the receiver and the chemical cue (Muroi et al. 2006). Male- and female-soiled bedding contain both volatile and nonvolatile compounds that are known to be important in intraspecific communication, for instance promoting mate selection and copulatory activity (Marchlewska-Koj et al.

2000; Moncho-Bogani et al. 2002; Briand et al. 2004). Recent developments have led to an appreciation of the diversity of chemosensory systems and their complementary roles in influencing vertebrate physiology and behavior (Brennan and Zufall 2006).

Free radicals and related reactive species play an important role in a wide range of physiological processes, including sex and reproduction (Fujii et al. 2005; Aitken and Baker 2006; Halliwell and Gutteridge 2007). Oxidative stress has long been recognized as a determinant factor in sperm fertility, as the presence of both nonenzymatic and enzymatic antioxidant defenses in sperm and epididymal fluid have been demonstrated to be essential for sperm fertility (Drevet 2006). Besides, reduced levels of $O_2^{\bullet-}$ have been proposed to play an important role in normal sperm function during their way through the female reproductive tract (Agarwal, Makker, et al. 2008). Reactive oxygen species (ROS) may

PARTE III

3. Discussão

Sinais químicos são o principal fator para indução de alterações no comportamento de uma grande variedade de espécies. A urina de roedores apresenta uma complexa mistura de compostos voláteis e não-voláteis essenciais para reprodução, marcação do território e reconhecimento social (Beynon & Hurst, 2004; Muroi e col., 2006). Entretanto, poucas substâncias que comprovadamente induzem respostas endócrinas e/ou comportamentais específicas foram isoladas e identificadas até hoje (Thompson e col., 2004). A combinação de moléculas voláteis e não-voláteis pode ser detectada pelo epitélio olfatório e/ou órgão vomeronasal, atuando como sinalizadoras para o sistema neuroendócrino (Bigiani e col., 2005). Em roedores, a percepção de moléculas através do olfato engloba diferentes subsistemas, e contrariamente à visão tradicional, o epitélio olfatório principal pode mediar respostas a odores comuns, assim como a feromônios (Spehr e col., 2006). Além disso, pesquisas recentes mostram que respostas hormonais induzidas por feromônios exercem importantes modulações bioquímicas no SNC. A proteína c-Fos é um bom marcador para atividade neuronal. Níveis aumentados desta proteína foram encontrados no bulbo olfatório acessório de ratas fêmeas após a exposição à urina de machos, sugerindo aumento na atividade neuronal provocada por feromônios (Yamaguchi e col., 2000).

Para correlacionar a exposição à maravalha condicionada por machos com o comportamento das fêmeas expostas, foram utilizados três testes diferentes: o labirinto em cruz elevada, o campo aberto e a caixa claro-escuro. O labirinto em cruz elevada é um teste comportamental amplamente utilizado para avaliar ansiedade em roedores. É fácil de realizar, pode ser totalmente filmado e resultados válidos podem ser obtidos em um período curto de 5 minutos de teste (Walf & Frye, 2007). Trabalhos recentes com roedores demonstraram que a experiência reprodutiva de fêmeas reduz parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade (Wartella e col., 2003), diminuindo o parâmetro durante a fase de proestro – fase

onde ocorre o início da ovulação – em fêmeas jovens com experiência reprodutiva (Byrnes & Bridges, 2006). Além disso, foi recentemente demonstrado que o ciclo estral influencia a resposta das fêmeas de roedores no teste do labirinto em cruz elevada (Marcondes e col., 2001), onde as fêmeas em proestro permanecem um período maior nos braços abertos do labirinto.

As variáveis clássicas analisadas no labirinto em cruz elevada incluem número de entradas nos braços abertos, o tempo de permanência nos braços abertos, e o número de entradas nos braços fechados. Entre estas variáveis, o tempo de permanência nos braços abertos e o número de entradas nos braços abertos, vêm sendo descritos como afetados por drogas que alteram a ansiedade. Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados é comumente não afetado por estas drogas, por isso é utilizado como medida de atividade locomotora (Kliethermes, 2005). Os resultados obtidos com este teste comportamental variam conforme a intensidade luminosa utilizada durante o comportamento. Quando este teste comportamental é realizado com alta intensidade luminosa (Sadeghipour e col., 2007), um aumento no tempo de permanência nos braços abertos foi observado em fêmeas durante o diestro – fase do ciclo estral de roedores caracterizada pela infiltração de leucócitos no epitélio uterino. Quando realizado em baixa intensidade luminosa (Mora e col., 1996), foi demonstrado que um grande número de fêmeas em proestro e estro – fase logo após o término da ovulação – apresentaram aumento no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, quando comparadas com fêmeas em diestro. Neste estudo foi utilizada iluminação vermelha para aquisição dos parâmetros comportamentais durante o teste de labirinto em cruz elevada, iluminação esta caracterizada como de baixíssima intensidade luminosa. Os resultados sugerem que a curta exposição à maravalha condicionada por machos, fonte rica em feromônios, tem um efeito ansiolítico em fêmeas virgens receptivas – durante a passagem da fase de proestro para estro –, de acordo com o maior tempo de

permanência nos braços abertos observado. Contudo, a utilização de mais de um experimento de comportamento ajuda a discutir melhor os resultados obtidos (Ramos e col., 1997; Bourin e col., 2007), desta forma foram realizados outros testes comportamentais, utilizando o mesmo protocolo de exposição.

Roedores são animais noturnos, desta forma preferem áreas mais escuras. O teste da caixa claro-escuro é baseado na aversão inata que os roedores apresentam para áreas muito iluminadas, desta forma o decréscimo na atividade exploratória da área clara pode ser utilizado como índice de ansiedade (Costall e col., 1989; de Oliveira e col., 2007). De acordo com os resultados obtidos, a exposição à maravalha condicionada por machos induziu a redução na atividade locomotora das fêmeas virgens, caracterizada pela diminuição na locomoção em ambos os compartimentos, e um maior tempo para deixar pela primeira vez o compartimento claro. É sabido que o teste da caixa claro-escuro foi desenvolvido para camundongos machos, e este teste ainda não foi validado para fêmeas. Além disso, a influencia do ciclo estral nos parâmetros avaliados no teste ainda não foi investigada (Bourin & Hascoet, 2002).

Recentemente foi sugerido um possível envolvimento de ERO em respostas neuro-comportamentais associadas a estresse, sendo estas respostas bastante específicas por gênero, onde cobaias do sexo masculino são mais suscetíveis ao estresse do que cobaias do sexo feminino (Chakraborti e col., 2007). Outra importante diferença entre as análises comportamentais realizadas é o tipo de iluminação utilizada. No teste de labirinto em cruz elevada foi utilizada iluminação de baixíssima intensidade, luz vermelha, e talvez por isso as fêmeas tenham se sentido mais a vontade para explorar o labirinto. Nos testes de campo aberto e caixa claro-escuro foi utilizada iluminação normal com alta intensidade luminosa, luz branca, para observar o comportamento das cobaias. Possivelmente, quando a análise do comportamento de um animal é realizada em ambientes com alta intensidade luminosa, a

cobaia já está previamente exibindo níveis basais aumentados de ansiedade, em relação a cobaias observadas em ambientes com baixíssima intensidade luminosa (Hogg, 1996).

Entretanto, fêmeas expostas à maravalha condicionada por machos apresentaram alguns comportamentos que não são característicos de aumento de ansiedade, como maior número de passagens no centro do campo aberto e um tempo maior para deixar o compartimento claro pela primeira vez no teste da caixa claro-escuro, comportamentos que não indicam aumento de ansiedade. Outro resultado interessante obtido no teste de campo aberto diz respeito a um possível índice para ansiedade observável neste teste. Trata-se da razão entre o número de células visitadas no centro, pelo número de células visitadas na periferia do campo aberto, altos níveis de ansiedade apresentam redução nesta razão. A exposição à maravalha condicionada por machos não alterou este parâmetro, indicando um comportamento não associado ao aumento de ansiedade. Da mesma forma, quando realizada a análise dos resultados obtidos no teste de labirinto em cruz elevada, a exposição à maravalha condicionada por machos apresentou um claro efeito ansiolítico nas fêmeas virgens receptivas. Publicações relatam que o teste de labirinto em cruz elevada é mais sensível a efeitos ansiolíticos quando comparado ao teste da caixa claro-escuro (Chaouloff e col., 1997). Observando os resultados comportamentais, o cenário descrito aqui sugere que fêmeas expostas à maravalha condicionada por machos apresentam parâmetros de ansiedade e atividades locomotor-exploratórias reduzidas, e estes resultados são consistentes com o risco aumentado em que as fêmeas são expostas quando iniciam comportamentos de cópula (Kavaliers e col., 2001).

O hipotálamo é uma das mais importantes regiões do cérebro, reconhecidamente envolvida no processamento de feromônios (Savic e col., 2001; Hosokawa & Chiba, 2007), possui conexões com muitas partes do SNC, incluindo o hipocampo, o núcleo amilóide, e os lobos frontais do córtex. Conhecido como o centro de controle das funções

hormonais/endócrinas, o hipotálamo controla em mamíferos diversos comportamentos sexuais, como a cópula e o reconhecimento sexual (Shepherd, 2006). Além disso, o hipotálamo controla a receptividade sexual com envolvimento de receptores de estrogênio e sinalização via proteína cinase C – PKC – recentemente reportado (Dewing e col., 2008). Ratos machos com lesão bilateral em áreas do hipotálamo apresentam reconhecimento sexual anormal, estes achados suportam o envolvimento do hipotálamo na integração dos sinais químicos que definem a preferência olfativa pelo sexo oposto (Hurtazo & Paredes, 2005).

Outra estrutura com reconhecida importância é o hipocampo. A aquisição de novas memórias sobre locais e eventos requer elevada plasticidade sináptica por parte do hipocampo (Cheng & Frank, 2008). Recentemente um trabalho bastante interessante com camundongos foi realizado, onde ficou demonstrado que feromônios de machos estimulam a neurogênese no hipocampo de fêmeas adultas (Mak e col., 2007). A formação de memórias explícitas sobre situações emocionais no hipocampo é intimamente relacionada à transmissão de sinais via amígdala, reconhecida região ativada por feromônios (LeDoux, 2007). A sofisticada troca de informações entre diferentes estruturas do SNC permite uma rápida e precisa detecção de comida, perigo, e possibilidades de cópula, elementos cruciais para a sobrevivência e manutenção das espécies.

Todas as células aeróbicas sofrem estresse oxidativo, e o cérebro de mamíferos é uma estrutura especialmente sensível. Uma das razões é o alto consumo de O_2 , aproximadamente 20% do consumo basal de O_2 de um indivíduo é utilizado pelo cérebro (Halliwell & Gutteridge, 2007). Desta forma, são necessários sistemas coordenados de proteção e reparo a biomoléculas oxidadas, falhas nos sistemas antioxidantes contribuem para a neurodegeneração e a perda das funções cerebrais normais. Uma das mais importantes estratégias de defesa é manter o mais baixo possível as tensões de O_2 , mas baixo o suficiente que permita a manutenção das funções normais, promovendo apenas um estado fisiológico de

formação de ERO Espécies reativas são produtos normais do metabolismo celular aeróbico, podendo apresentar funções benéficas e danosas para os organismos vivos (Halliwell, 1999; Valko e col., 2006). Efeitos benéficos para ERO ocorrem em níveis baixo a moderados na produção destas espécies, e envolvem sinalização celular e transdução de sinal (Valko e col., 2007), além disso, níveis controlados de ERO podem induzir divisão celular em células não-trasformadas (Chiarugi & Fiaschi, 2007). Mesmo o papel das ERO estando bastante estudado, trabalhos a respeito da função das ERO no SNC são bastante recentes. Uma revisão publicada há pouco tempo aborda os diferentes achados sobre a possibilidade de ERO agirem como mensageiros no SNC, com especial atenção para o peróxido de hidrogênio – H_2O_2 – molécula difusível com reconhecida capacidade de mensageiro (Avshalumov e col., 2007).

SOD, CAT e GPx são enzimas fundamentais para o funcionamento normal de importantes processos biológicos em mamíferos, com reconhecida importância em processos fisiológicos e patológicos (Warner e col., 2004). As SODs são enzimas que catalisam com alta eficiência a dismutação do $O_2^{\bullet-}$, gerando H_2O_2 , que pode ser removido por dois tipos de enzimas, as catalases – CATs – e as peroxidases – por ex. a GPx –. O aumento nas defesas antioxidantes observado no SNC das fêmeas após a exposição à maravalha condicionada por machos, pode ser resultado de um aumento na formação de ERO, principalmente H_2O_2 , entretanto, não foram observadas alterações em parâmetros de danos oxidativos nas estruturas do SNC analisadas. Foi observado também um aumento nas defesas antioxidantes não-enzimáticas no SNC das fêmeas, no mesmo período em que se observou aumento das defesas enzimáticas. Estes resultados suportam um possível rápido aumento na produção de ERO no SNC das fêmeas após a exposição a feromônios de machos.

Um estado redox alterado pode influenciar em vias de sinalização, fatores de transcrição, mecanismos epigenéticos, modulando a qualidade/viabilidade de oócitos, espermatozoides e embriões (Agarwal e col., 2008b). Além disso, vias de sinalização

mediadas por ERO exercem importantes papéis em processos reprodutivos fisiológicos, como decidualização e menstruação (Sugino, 2007). O metabolismo de oócitos e embriões é finamente regulado por potenciais redox (Agarwal e col., 2008b). No trato reprodutor feminino, ERO estão implicados em diversos processos fisiológicos relacionados a aspectos da reprodução, incluindo foliculogênese e esteroideogênese (Shiotani e col., 1991; Behrman e col., 2001; Sugino e col., 2004). Concentrações reduzidas de H_2O_2 são fundamentais para a realização correta do processo de capacitação dos espermatozoides, mas concentrações altas acabam por inibir este processo (Rivlin e col., 2004). Além disso, antioxidantes exógenos são geralmente utilizados para aumentar a capacidade de fertilização de sêmen crio-preservado (Sikka, 2004; Michael e col., 2007).

Fêmeas vivem mais que machos, e isto pode estar relacionado à fina regulação que o estrogênio exerce sobre genes relacionados à longevidade. O estrogênio liga-se a receptores específicos que subsequentemente podem ativar cascatas de sinalização dependentes de PKC e fator nuclear B – NF κ B –, resultando na transcrição de genes responsáveis por defesas antioxidantes (Vinã e col., 2006). Desta forma, o aumento nas defesas antioxidantes não enzimáticas observado nas estruturas do SNC, e no útero, das fêmeas expostas a feromônios, pode estar relacionado a um aumento de hormônios sexuais femininos, como o estradiol (Mhyre & Dorsa, 2006; Pozzi e col., 2006). A grande variedade de interações entre as vias relacionadas ao estradiol e a defesas antioxidantes está bem descrita (Vinã e col., 2008), e foi demonstrado que o estradiol pode apresentar efeitos ansiolíticos no teste de labirinto em cruz elevada (Marcondes e col., 2001). Com a possibilidade de ERO ativarem e/ou regularem vias de sinalização, aliada a descrição de que H_2O_2 é difusível e sinalizador, os níveis possivelmente aumentados desta ERO presentes no hipotálamo e córtex frontal podem apresentar origem em outras áreas do SNC, como o hipocampo, que apresentou níveis aumentados da enzima SOD. Outra possibilidade para o aumento nas defesas antioxidantes

observadas é o aumento não-dependente de substrato, através da ativação de fatores de sinalização que promovem ativação de elementos responsivos a antioxidantes (Li e col., 2007). Com certeza um interessante efeito biológico foi observado neste trabalho, e certamente estudos futuros são necessários para melhor investigar o perfil de expressão das enzimas antioxidantes envolvidas neste quadro.

Está claro que o SNC apresenta estruturas/regiões distintas e especializadas, desta maneira, a análise de estruturas específicas, ao invés do homogenato total de cérebro, é fundamental para melhor entender os resultados obtidos. A importância de outras regiões cerebrais, e áreas associadas, para percepção e processamento de sinais químicos está bastante descrita. Assim, foram realizadas análises na região da amígdala em SNC, assim como em bulbo olfatório, estruturas envolvidas na comunicação via feromônios. Entretanto, de acordo com resultados prévios, a atividade das defesas antioxidantes enzimáticas não está alterada após a exposição à maravalha condicionada por machos (resultados não apresentados). Mais investigações são necessárias para melhor determinar a influencia da exposição a feromônios masculinos em outras regiões do SNC e áreas associadas.

Sinais químicos excitam respostas rápidas no indivíduo que os recebe, geralmente levando a interação entre dois indivíduos, como em lutas para marcação territorial ou manifestação de comportamento sexual. Estes sinais induzem respostas que são preferencialmente mediadas pelo sistema neuro-endócrino. Desta forma, é possível que um animal module a fisiologia e o comportamento de outro através de feromônios (Bigiani e col., 2005). No presente estudo, foi observado que a exposição à maravalha condicionada por machos foi capaz de modular o perfil oxidativo do trato reprodutivo de ratas virgens. É possível que estas alterações tenham importantes implicações no processo de fertilização. Os resultados aqui presentes mostram que a exposição a feromônios de machos é capaz de promover a diminuição no dano oxidativo, e o aumento nas defesas antioxidantes não

enzimáticas, no útero de ratas receptivas, sugerindo que sinais químicos secretados por machos podem influenciar a capacidade de fertilização de fêmeas pré-expostas, estimulando um ambiente redox favorável para o espermatozóide.

4. Conclusão

No presente estudo foi observado que a exposição à maravalha condicionada por machos, uma fonte rica em feromônios, induziu a diminuição da ansiedade em fêmeas virgens, além disso, foi observada a diminuição nas atividades locomotoras e exploratórias nas ratas expostas.

Foi observado também, que a exposição à maravalha condicionada por machos modula o perfil oxidativo no hipotálamo, hipocampo e córtex frontal de fêmeas virgens, apresentando um interessante aumento nas defesas antioxidantes, acompanhada da diminuição nos parâmetros de dano oxidativo.

Vários trabalhos na literatura focam nos efeitos de ERO na fisiologia e patologia do SNC (Warner e col., 2004; Noble, 2006; Pozzi e col., 2006; Li e col., 2007; Valko e col., 2007), e sistema reprodutor feminino (Behrman e col., 2001; Sikka, 2004; Fujii e col., 2005; Agarwal e col., 2008a). Entretanto, até o presente momento, este é o primeiro trabalho na literatura a demonstrar que o perfil oxidativo dos referidos sistemas pode ser alterado por moléculas presentes na maravalha condicionada por machos, sugerindo que a comunicação através de feromônios pode modular a produção e/ou remoção de ERO no SNC e sistema reprodutor feminino antes da reprodução e fertilização.

Referências bibliográficas

- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 3:28–48
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. 2008a. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*. 59:2–11
- Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. 2008b. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 10:1375–1403
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250:66–69
- Avshalumov MV, Bao L, Patel JC, Rice ME. H₂O₂ signaling in the nigrostriatal dopamine pathway via ATP-sensitive potassium channels: issues and answers. *Antioxid Redox Signal*, 2007;2: 219-231
- Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. 2001. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig*. 8:40–42
- Ben-Jacob E, Becker I, Shapira Y, Levine H. Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends Microbiol*, 2004;12: 366-372
- Beynon RJ, Hurst JL. Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats. *Peptides* 2004; 25:1553–1563
- Bigiani A, Mucignat-Caretta C, Montani G, Tirindelli R. Pheromone reception in mammals. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2005;154: 1-35
- Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*, 2002;463: 55-65
- Bourin M, Petit-Demouliere B, Dhonnchadha BN, Hascoet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol*, 2007;21: 567-574

- Brennan PA, Keverne EB. Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr Biol*, 2004;14: 81-89
- Brennan PA, Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, 2006;444: 308-315
- Briand L, Trotier D, Pernollet JC. Aphrodisin, an aphrodisiac lipocalin secreted in hamster vaginal secretions. *Peptides*, 2004;25: 1545-1552
- Byrnes EM, Bridges RS. Reproductive experience alters anxiety-like behavior in the female rat. *Horm Behav*, 2006;50: 70-76
- Chakraborti A, Gulati K, Banerjee BD, Ray A. Possible involvement of free radicals in the differential neurobehavioral responses to stress in male and female rats. *Behav Brain Res*, 2007;179: 321-325
- Chaouloff F, Durand M, Mormede P. Anxiety-and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res*, 1997;85: 27-35
- Cheng S, Frank LM. New experiences enhance coordinated neural activity in the hippocampus. *Neuron*, 2008;57: 303-313
- Chiarugi P, Fiaschi T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*, 2007;19: 672-682
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1989;32: 777-785
- Dewing P, Christensen A, Bondar G, Micevych P. PKC signaling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates sexual receptivity in female rats. *Endocrinology*, 2008 149(12):5934-42
- Drevet JR. 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol*. 250:70–79

- Finkel, T. Oxygen radicals and signaling. **Cur Op Cell Biol**, v.10, p.248-253, 1998.
- Ford WCL. 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*. 10:387–399
- Fujii, J, Iuchi Y, Okada, F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanism in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:43–52,
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 1999;31: 261-272
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007, 704pp.
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996;54: 21-30
- Hosokawa N, Chiba A. Effects of sexual experience on conspecific odor preference and male odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in female rats. *Brain Res*, 2007;1175: 66-75
- Hurtazo HA, Paredes RG. Olfactory preference and Fos expression in the accessory olfactory system of male rats with bilateral lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus. *Neuroscience*, 2005;135: 1035-1044
- Johansson BG, Jones TM. The role of chemical communication in mate choice. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2007;82: 265-289
- Kavaliers M, Choleris E, Colwell DD. Brief exposure to female odors “emboldens” male mice by reducing predator-induced behavioral and hormonal responses. *Horm Behav*, 2001;40: 497-509
- Kliethermes CL. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005;28: 837-850

- LeDoux J. The amygdala. *Curr Biol*, 2007;17: 868-874
- Li J, Calkins MJ, Johnson DA, Johnson JA. Role of Nrf2-dependent ARE-driven antioxidant pathway in neuroprotection. *Methods Mol Biol*, 2007;399: 67-78
- Lin DY, Zhang SZ, Block E, Katz LC. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*, 2005;434: 470-477
- Luo M, Fee MS, Katz LC. Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science*, 2003;299: 1196-1201
- Mak GK, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I, Weiss S. Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci*, 2007;10: 1003-1011
- Marchlewska-Koj A, Cavaggioni A, Mucignat-Caretta C, Olejniczak P. Stimulation of estrus in female mice by male urinary proteins. *J Chem Ecol*, 2000;26: 2355-2366
- Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*, 2001;74: 435-440
- Martínez-Rícos J, Agustín-Pavón C, Lanuza E, Martínez-García F. Intraspecific communication through chemical signals in female mice: Reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chem Senses*, 2007;32: 139-148
- Mhyre AJ, Dorsa DM. Estrogen activates rapid signaling in the brain: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in neurons and glia. *Neuroscience*, 2006;138: 851-858
- Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscios C. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. 68:204–212

- Moncho-Bogani J, Lanuza E, Hernández A, Novejarque A, Martínez-García F. Attractive properties of sexual pheromones in mice: innate or learned? *Physiol Behav*, 2002;77: 167-176
- Mora OA, Cabrera MM, Sánchez-Criado JE. Hormonal pattern of the pheromonal restoration of cyclic activity in aging irregularly cycling and persistent-estrus female rats. *Biol Reprod* 1994; 51:920–925
- Mora S, Dussaubat N, Díaz-Véliz G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 1996;21: 609-620.
- More L. Mouse major urinary proteins trigger ovulation via the vomeronasal organ. *Chem Senses* 2006; 31:393–401
- Muroi Y, Ishii T, Komori S, Kitamura N, Nishimura M. Volatile female odors activate the accessory olfactory system of male mice without physical contact. *Neuroscience*, 2006;141: 551-558
- Noble M, Smith J, Power J, Mayer-Pröschel M. Redox state as a central modulator of precursor cell function. *Ann N Y Acad. Sci*, 2003;991: 251-271.
- Noble M. Implications for CNS repair of redox modulation of cell survival, division and differentiation. *Curr Alzheimer Res*, 2006;3: 37-47.
- de Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello E Souza T, Moreira JCF. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: Effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology*, 2007;28: 1191–1199
- Pozzi S, Benedusi V, Maggi A, Vegeto E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2006;1089: 302-323

- Ramos A, Berton O, Mormede P, Chaouloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res*, 1997;85: 57-69
- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. 2004. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. 70:518–522
- Sadeghipour HR, Ghasemi M, Sadeghipour H, Riazi K, Soufiabadi M, Fallahi N, Dehpour AR. Nitric oxide involvement in estrous cycle-dependent changes of the behavioral responses of female rats in the elevated plus-maze test. *Behav Brain Res*. 2007;178: 10-17
- Savic I, Berglund H, Gulyas B, Roland P. Smelling of odorous sex hormone-like compounds causes sex-differentiated hypothalamic activations in humans. *Neuron*, 2001;31: 661-668
- Shepherd GM. Behaviour: smells, brains and hormones. *Nature*, 2006;439: 149-151.
- Shiotani M, Noda Y, Narimoto K, Imai K, Mori T, Fujimoto K, Ogawa K. 1991. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Hum Reprod*. 6:1349–1353
- Sikka SC. 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*. 25:5–18
- Spehr M, Spehr J, Ukhanov K, Kelliher KR, Leinders-Zufall T, Zufall F. Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cell Mol Life Sci*, 2006;63: 1476-1484
- Sugino N, Karube-Harada A, Taketani T, Sakata A, Nakamura Y. 2004. Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F₂α production through nuclear factor-κB activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. *J Reprod Dev*. 50:215–225

- Sugino N. 2007. The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. *Placenta*. 28:133–136
- Thompson RN, Robertson BK, Napier A, Wekesa KS. Sex-specific responses to urinary chemicals by the mouse vomeronasal organ. *Chem Senses*, 2004;29: 749-754
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:44–84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 160(1), 1–40, 2006
- Van Der Lee S, Boot LM. Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 1955; 4:442–444
- Vandenbergh JG. Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology* 1969; 84:658–660
- Viña J, Sastre J, Pallardó FV, Gambini J, Borrás C. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free Radic Res*, 2006;40: 1359-1365
- Viña J, Sastre J, Pallardó FV, Gambini J, Borrás C. Modulation of longevity-associated genes by estrogens or phytoestrogens. *Biol Chem*, 2008;389: 273-277
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, 2007;2: 322-328
- Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol*, 2004;207: 3221-3231

- Wartella J, Amory E, Lomas LM, Macbeth AH, McNamara I, Steven L, Lambert KG, Kinsley CH. Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. *Physiol Behav*, 2003;79: 373–381
- Whitten WK. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J Endocrinol* 1956; 13:399–404
- Yamaguchi T, Inamura K, Kashiwayanagi M. Increases in Fos-immunoreactivity after exposure to a combination of two male urinary components in the accessory olfactory bulb of the female rat. *Brain Res*, 2000;876: 211-214

ANEXO

ANEXO I

“Pancreas β -cells morphology, liver antioxidant enzymes and liver oxidative parameters in alloxan-resistant and alloxan-susceptible Wistar rats: a viable model system for the study of concepts into reactive oxygen species”

Artigo publicado na revista *Fundamental & Clinical Pharmacology*.

Este artigo faz parte de meu Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O grupo de pesquisa onde estou inserido sempre se destacou pela determinação em publicar seus trabalhos, possibilitando que mais pessoas possam conhecer nossas pesquisas, da mesma forma contribuindo para o nível de excelência do PPG Bioquímica – UFRGS. Por outro lado, sabemos das dificuldades de publicar trabalhos de base em revistas com índice de impacto aceitável segundo as normas da CAPES. Assim, durante os anos de 2007 e 2008 trabalhei nas horas vagas no aprimoramento de meu trabalho de conclusão de curso de graduação. Enviei o manuscrito em 08/04/2008, foi revisado em 27/05/2008, e aceito para publicação em 20/06/2008, vindo a ser publicado em dezembro de 2008.

**ORIGINAL
ARTICLE**

Pancreas β -cells morphology, liver antioxidant enzymes and liver oxidative parameters in alloxan-resistant and alloxan-susceptible Wistar rats: a viable model system for the study of concepts into reactive oxygen species

Guilherme Antônio Behr^{a*}, Evandro Gomes da Silva^a, Amâncio Romanelli Ferreira^a, Carlos Thadeu Schmidt Cerski^b, Felipe Dal-Pizzol^c, José Cláudio Fonseca Moreira^a

^aCentro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 Anexo-Bairro Santa Cecília-CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400 Anexo-Bairro Santa Cecília-CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105-Bairro Universitário-CEP 88806-000, Criciúma, SC, Brazil

Keywords

alloxan-resistance model, antioxidant enzymes, immunohistochemistry, oxidative stress, pancreatic islets

Received 8 April 2008;
revised 27 May 2008;
accepted 20 June 2008

*Correspondence and reprints:
guibebr@gmail.com,
guilherme.behr@ufrgs.br

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate biochemical and antioxidant parameters in alloxan-resistant (ALR) and alloxan-susceptible (ALS) rats. Diabetes was induced in 60-day-old male Wistar rats by a single intraperitoneal injection of alloxan (AL, 150 mg/kg). Ten days after induction, a group of rats showed a significant decrease in glycemia. This group was named alloxan-resistant group. Susceptible rats showed a remarkable increase in the plasma lipid content, blood glucose and HbA1c. Glycogen content in the liver decreased significantly in the ALS group (2.08 ± 0.41 mg%) compared with ALR group (4.22 ± 0.18). Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities were quantified in the plasma. Interestingly, ALR rats showed a decrease in both activities (42.1 ± 6.11 and 21.7 ± 5.54 U/mL) when compared with ALS rats (59.1 ± 6.55 and 58.1 ± 7.28 U/mL). The TBARS index was significantly increased in the ALS liver (0.38 ± 0.08 nmol/mg protein) when compared with the ALR liver (0.18 ± 0.04). Superoxide dismutase and catalase activities in the ALR (230 ± 13 and 131 ± 15 U/mg protein) liver showed a marked increase when compared with the ALS liver (148 ± 13 and 68 ± 5 U/mg protein). The immunohistochemical and hematoxylin–eosin analysis also revealed that pancreatic islets of ALR rats display a different morphology amongst the groups. These results suggest an increased regenerative or recovery process in the ALR rat pancreatic islets and an increased hepatic antioxidant defenses in these group of alloxan-resistant rats.

INTRODUCTION

Overproduction of reactive oxygen species (ROS) is considered to be one of the major causes of several

pathological disorders. These species are continuously generated in physiological conditions and effectively eliminated by intracellular and extracellular antioxidant systems. Oxidative stress has been defined as an

