

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação neuroendócrina, metabólica e psicobiológica em prole de ratas Wistar suplementadas com selenito de sódio durante o período de prenhez e lactação.**

**Roberto Laureano Melo**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO NEUROENDÓCRINA, METABÓLICA E  
PSICOLÓGICA EM PROLE DE RATAS WISTAR  
SUPLEMENTADAS COM SELENITO DE SÓDIO DURANTE O  
PERÍODO DE PRENHEZ E LACTAÇÃO.**

**ROBERTO LAUREANO MELO**

*Sob a orientação do professor*  
**Wellington da Silva Côrtes**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Curso de Pós-graduação em  
Ciências Fisiológicas, Área de  
Concentração em Fisiologia

Seropédica, RJ  
Abril de 2013

612.3924

M528a

T

Melo, Roberto Laureano, 1987-

Avaliação neuroendócrina, metabólica e psicológica em prole de ratas wistar suplementadas com selenito de sódio durante o período de prenhez e lactação / Roberto Laureano Melo. - 2013.

79 f.: il.

Orientador: Wellington da Silva Côrtes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.

Bibliografia: f. 50-63.

1. Selênio na nutrição animal - Teses. 2. Selênio - Efeito fisiológico - Teses. 3. Selênio - Metabolismo - Teses. 4. Rato - Alimentação e ração - Teses 5. Hormônios tireoidianos - Teses. 6. Psicobiologia - Teses. I. Côrtes, Wellington da Silva, 1964-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.



Departamento de  
Ciências  
Fisiológicas



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ROBERTO LAUREANO MELO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/04/2013.

Assinatura

Wellington da Silva Côrtes. Ph.D. UFRRJ.  
(Orientador)

Assinatura

Patricia Cristina Lisboa da Silva Ph.D. UERJ.

Assinatura

Luís Carlos Reis. Ph.D. UFRRJ.

**Ao meu avô: pelo seu amor incondicional, pela sua amizade inestimável e pelo apoio nos momentos de incerteza!  
Até logo...**

**“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”  
Mahatma Gandhi.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Grande Gerador de Improbabilidade Infinita por tornar possível a mais bela de todas as equações: a vida.

Aos animais de experimentação, nossos maiores mestres, pela imprescindível colaboração para o desenvolvimento científico até hoje alcançado.

À minha namorada pelo amor e apoio irrestrito ao longo desses últimos 5 anos. Indubitavelmente, você é a essência da sinfonia ministrada em meu coração.

Ao Mestre Wellington Silva Côrtes, meu orientador, por ser um grande exemplo de humildade, dedicação e bondade. Pela incrível paciência, pelo incentivo diário e por tornar viável a realização desse sonho. Creio ser um dia motivo de orgulho para o senhor a fim de recompensá-lo por tudo o que tens feito por mim.

Aos amigos George Kluck e Güínever Império pela amizade e cumplicidade demonstrada na execução deste projeto.

Ao amigo Cláudio Almeida por me ensinar os princípios básicos em psicobiologia e por ter me ajudado exaustivamente na realização dos protocolos comportamentais.

Ao professor Dr. Luís Carlos Reis por ter me dado a primeira oportunidade de aprender fisiologia e a fazer ciência.

À professora Dra. Tânia Maria Ruffoni Ortiga pela colaboração em importantes protocolos experimentais realizados no Laboratório de Endocrinologia Molecular.

Aos professores Bruno Marinho e Fábio Fagundes pela amizade e apoio científico.

Aos amigos Anderson Silveira, Rodrigo Rodrigues, Guilherme Andrade, Lucas Marinho, Fernando Seara, Renata Novais, Aline Conceição, Juliana Macedo, Gláucia Reis e Natália Soares por tornarem o laboratório um ambiente familiar.

Ao Professor Dr. Luciano Fernandes pela aula de regulação neural da pressão arterial, a melhor de fisiologia que já tive e que me inspirou a ingressar no programa de pós-graduação ao qual faço parte.

Ao Professor Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes e ao Laboratório de Coccídios e Coccidioses pelos inesquecíveis ensinamentos de “cultura inútil”.

Ao Professor Dr. Armando Sales pelos maravilhosos momentos vividos na monitoria de histologia animal.

Aos técnicos do Departamento de Ciências Fisiológicas pelo apoio logístico na manutenção do biotério de experimentação e aos colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos por disponibilizar tempo para conciliar as atividades empregatícias e os experimentos finais

## RESUMO

LAUREANO-MELO, Roberto. **Avaliação neuroendócrina, metabólica e psicobiológica em prole de ratas Wistar suplementadas com selenito de sódio durante o período de prenhez e lactação.** 2013. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O selênio (Se) é um elemento importante para a regulação do desenvolvimento fetal e neonatal. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a possível ocorrência de alterações neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais em prole de ratas Wistar suplementadas durante o período de prenhez e lactação com selenito de sódio, na dose de 1mg/kg, por via orogástrica. Para este propósito, inicialmente, foi verificada a função tireoidiana da prole logo após o término do tratamento. Em seguida, a fim de investigar a influência do Se sobre a programação metabólica dos animais, foram avaliadas a ingestão de leite e o acompanhamento do peso corporal do período neonatal à vida adulta. Ademais, foram investigadas as repercussões sobre a homeostase energética através da avaliação do metabolismo lipídico e do teste de tolerância à glicose após o término do tratamento, bem como pela mensuração basal e sob jejum da glicemia na fase adulta. Em relação aos comportamentos motivados, foram realizados protocolos para avaliação da ingestão de água e ração, em condições basais e sob jejum. Não obstante, para determinar os efeitos da suplementação com Se na ontogenia do sistema nervoso central, foi realizada a avaliação neuroquímica indireta através da atividade da colinesterase em distintas regiões encefálicas e pela expressão hipocampal da triptofano hidroxilase (TPH2) e da tirosina hidroxilase (TH). Por fim, foram usados os testes do campo aberto, do labirinto em cruz elevado, da natação forçada e a tarefa de reconhecimento de objetos para determinar o perfil comportamental e a capacidade cognitiva dos indivíduos na fase adulta. De acordo com os resultados obtidos, foi demonstrado que a suplementação com selenito de sódio causa aumento dos níveis de tiroxina (15%) e triiodotironina (25%), além de aumentar a expressão da deiodinase do tipo 2 no tecido adiposo marrom (351%). Dessa forma, o aumento da biodisponibilidade dos hormônios tireoidianos promove alterações na homeostase energética caracterizadas pelo maior consumo neonatal de leite (275%), pela maior mobilização de triglicerídios no fígado (23%) e no tecido adiposo (24%) e pelo restabelecimento mais efetivo da glicemia após o teste de tolerância à glicose (24%). De fato, as alterações no comportamento ingestivo se perpetuam até a fase adulta, destacando a maior ingestão de alimentos em condições basais (19%). Outrossim, o tratamento com Se promove redução da atividade da colinesterase (33%) e da expressão de TPH2 (12%), porém aumenta os níveis de RNAm para TH (200%) no hipocampo. Desse modo, acreditamos que tais alterações neuroquímicas estão fortemente relacionadas com o perfil comportamental na fase adulta. Partindo desse pressuposto, foi verificado que a prole de fêmeas suplementadas com Se apresentam maior atividade locomotora (50%) e exploratória vertical (77%) no teste do campo aberto. Também foi observada uma evidente atividade ansiolítica expressa pelo maior tempo de permanências nos braços abertos (143%) no teste do labirinto em cruz elevado. Por último, através da tarefa de reconhecimento de objetos, foi comprovada que a prole programada apresenta maior capacidade cognitiva, refletida em um maior índice de discriminação absoluto (230%) e relativo (14%). Em resumo, os resultados demonstram que a suplementação materna com selenito de sódio afeta a ontogenia de sistemas fisiológicos envolvidos com a homeostase neuroendócrina e metabólica, assim como pela diferenciada expressão de comportamentos afetivos e motivacionais.

Palavras-chaves: selênio, hormônios tireoidianos, metabolismo, psicobiologia.

## ABSTRACT

LAUREANO-MELO, Roberto. **Neuroendocrine, metabolic and psychobiological evaluation in offspring of Wistar female rats supplemented with sodium selenite during pregnancy and lactation.** 2013. 63 p. Dissertation (Master Science in Physiological Sciences). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2013.

Selenium (Se) is an important element in the regulation of fetal and neonatal development. Thus, the objective of this study was to evaluate the possible occurrence of neuroendocrine, metabolic and behavioral changes in offspring of female rats supplemented during pregnancy and lactation with sodium selenite at dose of 1mg/kg, by orogastric route. For this purpose, initially, was checked thyroid function of offspring soon after the end of treatment. Then, in order to investigate the Se influence on the metabolic programming of animals, it was assessed milk intake and the body weight monitoring since the neonatal period to adulthood. Furthermore, we investigated the repercussions on energy homeostasis through the assessment of lipid metabolism and glucose tolerance test after the treatment, as well as by measurements of basal and fasting glucose in the adult phase. Regarding the motivated behavior, protocols were performed to assess the water and food intake, in basal conditions and underfasting. Moreover, to determine the Se supplementation effects in the ontogeny of central nervous system, it was performed the indirect neurochemical evaluation by cholinesterase activity in different brain regions and by the hippocampal expression of tryptophan hydroxylase (TPH2) and tyrosine hydroxylase (TH). Finally, the open field test, the elevated plus maze test, forced swimming test and the object recognition task were used to determine the cognitive abilities and behavioral profile of individuals in adulthood. According to the results, it was demonstrated that supplementation with sodium selenite causes increased levels of thyroxine (15%) and triiodothyronine (25%), while increasing the expression of type 2 deiodinase in brown adipose tissue (351%). Thus, the increased bioavailability of thyroid hormones causes changes in energy homeostasis characterized by higher consumption of neonatal milk (275%), greater mobilization of triglycerides in the liver (23%) and adipose tissue (24%) and more effective reestablishment of glycemia after oral glucose tolerance test (24%). Indeed, the change in ingestive behavior are perpetuated into adulthood, highlighting the increased food intake in basal conditions (19%). Furthermore, Se treatment promotes reduction of cholinesterase activity (33%) and lower TPH2 expression (12%), but increases the levels of mRNA for TH (200%) in the hippocampus. Therefore, we believe that these neurochemical changes are strongly related to the behavioral profile in adulthood. Based on this premise, it was found that the offspring of females supplemented with Se have higher locomotor activity (50%) and more rearing (77%) in the open field test. Also, There was an apparent anxiolytic activity expressed by higher time spent in the open arms (143%) in the test of elevated plus-maze. Finally, through the object recognition task, it was proven that the programmed offspring shows greater cognitive capacity, reflected in a higher absolute (230%) and relative (14%) index discrimination. In summary, the results demonstrate that maternal supplementation with sodium selenite affects the ontogeny of physiological systems involved in the neuroendocrine and metabolic homeostasis, as well as the differential expression of emotional and motivational behaviors.

Keywords: selenium, thyroid hormones, metabolism, psychobiology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do processo de tradução de selenoproteínas....	4
<b>Figura 2.</b> Biotransformação de formas orgânicas de Se em seres humanos.....	5
<b>Figura 3.</b> Selenoproteoma humano.....	6
<b>Figura 4.</b> Etapas de ativação e inativação dos hormônios tireoidianos.....	8
<b>Figura 5.</b> Papel das selenoproteínas no metabolismo tireoidiano.....	9
<b>Figura 6.</b> Papel das selenoproteínas na prevenção de distúrbios comportamentais.....	11
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do desenho experimental... ..	15
<b>Figura 8.</b> Análise qualitativa do RNA extraído das amostras através da utilização de um transluminador UV.....	16
<b>Figura 9.</b> Aparelho de PCR <i>Mastercycler ep Realplex (Eppendorf, Germany)</i> .....	17
<b>Figura 10.</b> Gaiolas metabólicas.....	20
<b>Figura 11.</b> Teste do campo aberto.....	22
<b>Figura 12.</b> Teste do labirinto em cruz elevado.....	23
<b>Figura 13.</b> Natação forçada.....	24
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos.....	25
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática dos procedimentos estatísticos adotados.....	26
<b>Figura 16.</b> Avaliação da função tireoidiana em prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. * representa $p<0,05$ e ***, $p<0,001$ , quando comparados ao grupo controle.....	28
<b>Figura 17.</b> Avaliação da expressão de DIOs na tireoide, fígado e tecido adiposo marrom (BAT) em prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. * representa $p<0,05$ , quando comparados ao grupo controle.....	28
<b>Figura 18.</b> Avaliação do peso corporal em prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.....	28
<b>Figura 19.</b> Avaliação do perfil de ingestão em prole de 1 e 14 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.***, $p<0,001$ , quando comparados ao grupo controle.....	29
<b>Figura 20.</b> Avaliação da glicemia em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.....	29

<b>Figura 21.</b> Avaliação da glicemia em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.....	30
<b>Figura 22.</b> Teste de tolerância à glicose em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. * representa $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle.....	30
<b>Figura 23.</b> Avaliação do metabolismo hepático de lipídios em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. ** representa $p < 0,01$ ; *** representa $p < 0,001$ , quando comparados ao grupo controle.....	31
<b>Figura 24.</b> Avaliação do metabolismo de lipídios em tecido adiposo subcutâneo de prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. *** representa $p < 0,001$ , quando comparados ao grupo controle.....	32
<b>Figura 25.</b> Avaliação do metabolismo de lipídios em BAT de prole de 21 DPN oriundos de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. ** representa $p < 0,01$ , quando comparados ao grupo controle.....	33
<b>Figura 26.</b> Avaliação dos níveis séricos de leptina em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.....	34
<b>Figura 27.</b> Avaliação da ingestão de ração em condições basais e ao serem submetidos a jejum alimentar em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 80 DPN durante 180 minutos.* representa $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle	35
<b>Figura 28.</b> Avaliação dos da ingestão de água em condições basais e ao serem submetidos a jejum alimentar em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 80 DPN durante 180 minutos.**** representa $p < 0,0001$ , quando comparados ao grupo controle.....	35
<b>Figura 29.</b> Avaliação da atividade da AChE em de prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio. Protocolo realizado com 60 dias pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$ ; **, $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ , quando comparados ao grupo controle.....	36
<b>Figura 30.</b> Avaliação da expressão de TPH2 e TH em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%; **, $p < 0,01$ .....	37
<b>Figura 31.</b> Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do campo aberto em prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 60 dias pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$ ; **, $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ , quando comparados ao grupo controle.....	38

<b>Figura 32.</b> Gráfico de ocupação média dos grupos experimentais no teste do campo aberto. Cores quentes expressam maior ocupação, enquanto cores frias, menor ocupação.....	38
<b>Figura 33.</b> Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 60 DPN durante 300 segundos. * representa $p<0,05$ ; **, $p<0,01$ e *** $p<0,001$ , quando comparados ao grupo controle.....	39
<b>Figura 34.</b> Gráfico de ocupação média dos grupos experimentais no teste do labirinto em cruz elevado. Cores quentes expressam maior ocupação, enquanto cores frias, menor ocupação.....	40
<b>Figura 35.</b> Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste da natação forçada em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 60 DPN durante 300 segundos.....	40
<b>Figura 36.</b> Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 60 DPN durante 300 segundos. . * representa $p<0,05$ , quando comparados ao grupo controle.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração média de Se em diferentes alimentos.....	3
<b>Tabela 2.</b> Fórmulas usadas na avaliação da tarefa de reconhecimento de objetos.....	25

## LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

Se: selênio  
T3: triiodotironina  
T4: tiroxina  
rT3: T3 reverso.  
MIT: monoiodotirosina  
DIT: diiodotirosina  
TPO: tireoperoxidase  
NIS: simporte sódio/iodeto  
DUOX: dual oxidase  
TG: tireoglobulina  
cAMP: AMP cíclico  
IP3: inositol 1, 4, 5-trifosfato  
IP3R: receptor para IP3  
PRDX: peroxiredoxina  
MSRB1: metionina sulfóxido reductase B1  
PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase  
PTEN: proteína fosfatase homóloga à tensina.  
p70<sup>rsk</sup>: p70-ribossomal S6 cinase-1  
LDL: lipoproteína de baixa densidade  
HDL: lipoproteína de alta densidade  
SEL: selenoproteína  
DIO 1: desiodase tipo 1  
DIO 2: desiodase tipo 2  
DIO 3: desiodase tipo 3  
GPX: glutationala peroxidase  
SELP: selenoproteína P  
TrxR: tioredoxina reductase  
SPS 2: selenofosfato sintetase 2  
SECIS: elemento de inserção de selenocisteína  
SBP 2: proteína ligadora de elemento SECIS  
EFSeCys: fator de alongação específico para selenocisteína.  
SeMet: selenometionina  
SeCys: Selenocisteína  
GSSeSG: selenodiglutationala  
g-glutamyl-CH3SeCys: g-glutamil-Se-metil-selenocisteína  
H2Se: seleneto  
HSePO3<sup>-2</sup>: selenofosfato  
CH3SeCys: Se-methylselenocistena  
CH3SeH: metilselenol  
(CH3)2Se: dimetilseleneto  
SeO2: dióxido de selênio  
(CH3)3Se<sup>+</sup>: on trimetilselenônio  
AchE: acetilcolinesterase.  
TH: tirosnina hidroxilase  
TPH: triptofano hidroxilase  
MAO: monoaminaoxidase  
GABA: cido gama-aminobutírico  
5-HT: 5-hidroxi-triptamina

DNA: ácido desoxiribonucleico  
cDNA: DNA complementar  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNAm: RNA mensageiro  
RNAt: RNA transportador.  
A: adenina.  
C: citosina  
G: guanina  
T: timina  
NF-κB: fator nuclear kappa B  
ASK1: proteína quinase reguladora de apoptose  
PPAR: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  
NRF: fator nuclear respiratório  
PGC 1: coativador gama de PPAR.  
RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa via transcriptase reversa  
TLC: cromatografia em camada delgada  
DEPC: dietil pirocarbonato  
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético  
TAE: tampão tris-acetato-edta  
DTNB: ditiobisnitrobenzeno  
PBS: tampão fosfato salino.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio.  
Ru<sup>+2</sup>: rutênio.  
BAT: tecido adiposo marrom  
DPN: dia pós-natal.  
ANOVA: análise de variância  
FAO: Food And Agriculture Organization.  
NHI: Nacional Institutes of Health  
%: porcentagem  
Kg: quilo  
g: gramas  
mg: miligrama  
µg: micrograma  
m: metro  
cm: centímetro  
l: litro  
dl: decilitro  
ml: mililitro  
µg: microlitro  
M: molar  
pH: potencial hidrogeniônico.  
UV: ultravioleta  
®: marca registrada.  
°C: graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1 Selênio.....	2
2.2 Farmacocinética e Farmacodinâmica do Selênio.....	3
2.3 Selenoproteínas.....	6
2.4 Selênio e Metabolismo Tireoidiano.....	7
2.5 Selênio e Metabolismo Energético.....	10
2.6 Selênio e Sistema Nervoso Central.....	11
<b>3 JUSTIFICATIVAS</b>	<b>12</b>
<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
4.1 Objetivo Geral.....	13
4.2 Objetivos Específicos.....	13
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
5.1 Animais.....	14
5.2 Drogas.....	14
5.3 Tratamento.....	14
5.4 Procedimentos Experimentais.....	15
5.4.1 Avaliação da função tireoidiana.....	15
5.4.1.1 Dosagem de TSH, T3 e T4 totais.....	15
5.4.1.2 Determinação da expressão das Dios.....	15
5.4.2 Avaliação do metabolismo energético.....	18
5.4.2.1 Peso corporal.....	18
5.4.2.2 Avaliação da ingestão neonatal de leite.....	18
5.4.2.3 Glicemia.....	18
5.4.2.4 Teste de tolerância à glicose.....	19
5.4.2.5 Metabolismo Lipídico.....	19
5.4.2.6 Dosagem de Leptina.....	19
5.4.2.7 Avaliação do comportamento ingestivo na vida adulta.....	20
5.4.3 Avaliação neuroquímica indireta.....	20
5.4.3.1 Atividade da colinesterase.....	20
5.4.3.2 Expressão das enzimas TH e TPH2.....	21
5.4.4 Avaliação psicobiológica durante a vida adulta.....	21
5.4.4.1 Teste do campo aberto.....	22
5.4.4.2 Teste do labirinto em cruz elevado.....	22
5.4.4.3 Natação forçada.....	23
5.4.4.4 Teste de reconhecimento de objetos.....	24
5.4.5 Análise estatística.....	25
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>27</b>
6.1 Avaliação da função tireoidiana.....	27
6.2 Avaliação do metabolismo energético.....	28
6.2.1 Peso Corporal.....	28

6.2.2 Avaliação neonatal da ingestão de leite.....	29
6.2.3 Glicemia.....	29
6.2.4 Teste de tolerância à glicose.....	30
6.2.5 Metabolismo Lipídico.....	31
6.2.6 Dosagem de leptina.....	34
6.2.7 Avaliação do comportamento ingestivo na vida adulta.....	34
6.3 Avaliação neuroquímica indireta.....	35
6.3.1 Atividade da colinesterase.....	35
6.3.2 Expressão das enzimas TH e TPH2.....	36
6.4 Avaliação psicobiológica durante a vida adulta.....	37
6.4.1 Teste do campo aberto.....	37
6.4.2 Labirinto em cruz elevado.....	39
6.4.3 Teste do nado forçado.....	40
6.4.4 Tarefa de reconhecimento de objetos.....	41
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
7.1 Avaliação da função tireoidiana.....	42
7.2 Avaliação do metabolismo energético.....	43
7.3 Avaliação neuroquímica indireta.....	45
7.4 Avaliação psicobiológica na fase adulta.....	47
7.5 Considerações finais.....	48
<b>8 CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com estudos publicados pelo epidemiologista David Barker, a prevalência de algumas doenças na fase adulta apresenta uma considerável correlação com distúrbios homeostáticos durante a fase fetal (BARKER, 1990). Inúmeros fatores ambientais podem causar um ambiente intrauterino adverso durante esta fase crítica, possibilitando alterações estruturais e funcionais no feto e, por conseguinte, o desencadeamento de doenças em longo prazo. Esse processo é conhecido como programação fetal (BARKER, 1990). Nesse contexto, um dos principais fatores ambientais capazes de interferir na embriogênese de diferentes sistemas fisiológicos é a nutrição materna. É importante salientar, que os mecanismos envolvidos nesse processo são basicamente epigenéticos, ou seja, alteram a expressão gênica sem causar mutações, dentre os quais se destacam: a metilação do DNA e a modificação das histonas, (CHMURZYNSKA, 2010).

Mediante a esse pressuposto, ressalta-se que em mulheres gestantes e lactantes, as concentrações plasmáticas de selênio (Se) se encontram reduzidas, uma vez que há um aumento da demanda deste nutriente devido à necessidade da transferência constante deste elemento ao feto e ao neonato durante as fases de gestação e lactação, respectivamente (SMITH & PICCIANO, 1986). Dessa forma, a suplementação de Se é recomendada em faixas que variam de 30 a 85 µg por dia em humanos adultos (RAYMAN, 2008). Essa oferta é baseada nos níveis de Se necessários para maximizar a atividade da enzima glutathione peroxidase no plasma (DUFFIELD et al., 1999). No entanto, vale destacar que a suplementação diária com 200 µg de Se com fins terapêuticos tem sido amplamente aceita pela comunidade científica (KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, et al., 2000)

Diante desse fato, muitos estudos têm sido realizados a fim de compreender como que a oferta de diferentes espécies químicas deste micronutriente pode interferir na dinâmica deste elemento e, por conseguinte, na homeostase de diferentes sistemas fisiológicos tanto nas mães quanto na prole (LANE et al., 1991; TAYLOR et al., 2005; TOULIS et al., 2010).

Foi demonstrado que o Se é um elemento importante para a regulação do desenvolvimento fetal e neonatal (EWAN, 1976), sendo que a deficiência desse elemento pode ocasionar abortos (BARRINGTON et al., 1996) e nascimentos prematuros (DOBRZYNSKI et al., 1998). Nesse contexto, nos últimos anos, muitos estudos epidemiológicos demonstraram a participação da deficiência de Se na gênese e progressão de doenças crônicas, como doenças metabólicas, cardiovasculares e neurológicas (NAVARRO-ALARCÓN & LÓPEZ-MARTINEZ, 2000).

Por outro lado, dados na literatura demonstram que o Se, em doses tóxicas superiores a 10 ppm, pode causar efeitos tóxicos durante o período de desenvolvimento intra-uterino. A exposição a formas inorgânicas de Se causa o aparecimento de malformações embrionárias em patos (HOFFMAN & HEINZ, 1998) e galinhas (PALMER et al., 1973). Sabe-se, ainda, que a administração de selenito ou selenato aumenta a incidência de malformações embrionárias em cultura de embriões de ratos (USAMI et al., 1999). Já em camundongos, o Se causa aborto e retardo no crescimento dos fetos expostos a doses tóxicas, mas não mostrou efeitos teratogênicos (YONEMOTO et al., 1983). Dessa forma, foi observado que este elemento atravessa a barreira placentária, sendo distribuído e acumulado nos tecidos fetais (BEDWAL & BAHUGUNA, 1994).

Portanto, é imprescindível que se realizem estudos mais meticulosos que favoreçam uma melhor compreensão sobre as possíveis implicações da suplementação

de Se no desencadeamento de programações metabólicas em neonatos. Deste modo, é possível que a suplementação cause um ambiente intrauterino adverso e seja, conseqüentemente, responsável pela prevalência de distúrbios metabólicos, neuroendócrinos e comportamentais na fase adulta destes indivíduos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Selênio

O Se foi descoberto, em 1817, pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius, quando o mesmo analisava um depósito vermelho na parede de câmeras de chumbo, usadas na produção de ácido sulfúrico. Devido às semelhanças químicas com o elemento telúrio, termo grego que se refere à terra, seu nome também deriva da palavra grega selene, que significa lua (MELLOR, 1955).

O Se é um não metal que se localiza no grupo 16 da tabela periódica e é encontrado na natureza em quatro estados de oxidação: seleneto ( $\text{Se}^{-2}$ ), selênio metálico ( $\text{Se}^0$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ) e selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ) (TINGGI, 2003). Ademais, por também ser um calcogênio, apresenta propriedades químicas semelhantes ao enxofre. Esta similaridade permite que o enxofre seja substituído pelo Se em algumas moléculas orgânicas, possibilitando o desencadeamento de reações químicas específicas que ocorrem nos sistemas biológicos (URSINI & BINDOLI, 1987).

De acordo com registro de inúmeros autores, é verificado que este elemento traço apresenta distribuição geográfica heterogênea, estando presente em todos os solos, principalmente em regiões calcárias ou ricos em carvão e pirita, sendo que a concentração de Se em diferentes regiões varia de  $0,1\mu\text{g/g}$  a  $1\text{mg/g}$  (COZZOLINO, 2005).

Estima-se que cerca de 45 a 75 % do Se existente na crosta terrestre seja oriundo de oceanos e se deposita na terra, a partir dos gases dimetilseleneto e dimetilselenilsulfito produzidos sazonalmente por alguns fitoplânctons, em especial os das bactérias *Coccolithophorid*. Por isso, regiões litorâneas apresentam solos mais ricos em selênio (COZZOLINO, 2005).

O Se pode ser obtido através de alimentos, suplementos, água e ar. Porém, a principal fonte desse micronutriente é a alimentação. Ressalta-se, no entanto, que o teor de Se em um mesmo tipo de alimento reflete a concentração desse elemento traço presente no solo e, por conseguinte, pode variar de acordo com distintas regiões. Segundo um projeto da FAO, aos cuidados da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), o consumo diário de Se no Brasil atinge em média cerca de  $60\mu\text{g/dia}$  e em países, como EUA e Japão, cerca de 98 e  $133\mu\text{g/dia}$ , respectivamente (COZZOLINO, 2005). A tabela 1 apresenta a concentração de Se em diferentes alimentos.

Devido sua baixa janela terapêutica, o selênio era conhecido como uma substância deletéria aos indivíduos. Sugere-se que primeiro caso de intoxicação por Se foi observado por Marco Polo, no século XVIII, em regiões montanhosas localizadas no oeste da China, ricas em plantas acumuladoras de Se, que, uma vez ingeridas em grandes quantidades, causavam o desprendimento dos cascos dos animais (KREHL, 1970). Todavia, a intoxicação por Se só foi comprovada em 1842, sendo associada, em 1935, a quadros clínico-patológicos em animais de fazenda, que também se alimentavam de plantas tóxicas com grande capacidade de acumular esse elemento

(BEATH et al., 1935). Já, em humanos, o caso mais grave de intoxicação ocorreu na China, entre 1961 a 1964, quando uma grave seca destruiu toda a colheita de arroz de uma região, forçando a população residente a consumir cereais e vegetais provenientes de áreas com solo rico em Se (YANG et al., 1983).

**Tabela 1.** Concentração média de Se em diferentes alimentos (Adaptado de BROWN & ARTHUR, 2001).

<b>Alimentos</b>	<b>Concentração média de Se (<math>\mu\text{g}/100\text{g}</math>)</b>
Leite	1,5
Carne bovina	7,6
Carne suína	14,0
Carne ovina	3,8
Fígado	42,0
Rim	145,0
Peixe	16
Frutas	1
Vegetais	2
Cereais	11,0
Pão	4,5
Castanha-do-Pará	245

Embora a deficiência de Se seja rara em humanos, há regiões espalhadas pelo planeta tão pobres em Se, que afecções relacionadas à deficiência desse mineral são consideradas endêmicas. Regiões áridas da Austrália, o nordeste da China, Nepal, Tibet e África central apresentam alta prevalência de doenças ligadas à deficiência de Se, tais como: a doença de Kashin-Beck, caracterizada por uma osteoartrite deformante, e a doença de Keshan, que se trata de uma cardiomiopatia congestiva, afetando principalmente crianças e mulheres jovens. (TAPIERO et al., 2003).

Nesse contexto, entre 1952 a 1957, o Se passou a ser considerado um micronutriente metabolicamente essencial para as bactérias, aves e mamíferos (POSTGATE, 1952; SCHWARZ, 1957; SCHWARZ & FOLTZ, 1958). Anos depois, foi descoberto que o Se é requerido para síntese de GPx (ROTRUCK et al., 1973). Assim, na forma de selenocisteína, é incorporado no sítio ativo de importantes enzimas, denominadas selenoproteínas, que atuam na defesa do organismo contra os radicais livres e no metabolismo propriamente dito. Dentre as principais selenoproteínas, destacam-se: a GPx como já supracitado, glutathiona redutase, as TrxR, SELP e as DIOs (TAPIERO et al., 2003).

## **2.2 Farmacocinética e Farmacodinâmica do Selênio**

O selênio pode ser encontrado na alimentação nas suas formas inorgânica e orgânica. Os compostos inorgânicos se encontram na forma de oxiânions: selenito e selenato. Já os orgânicos são os aminoácidos: selenometionina e selenocisteína. A maior parte do selenito é absorvida no duodeno por difusão passiva, enquanto o selenato é ativamente absorvido no íleo por um transporte ativo, de maneira semelhante à

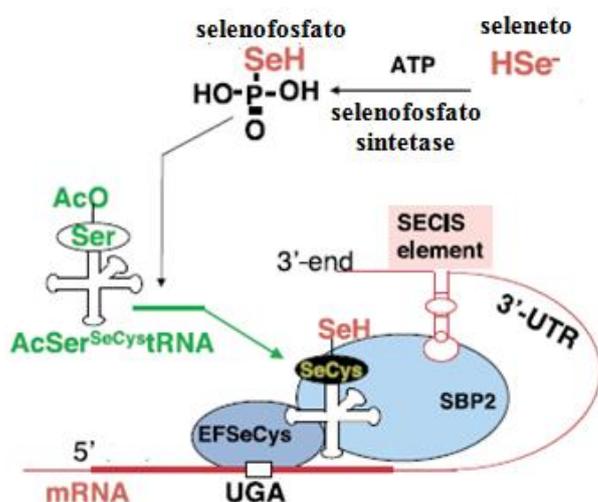
absorção de sulfato. Quanto às formas orgânicas, são majoritariamente absorvidos no duodeno, cujo transporte é caracterizado por um transporte ativo secundário com íons sódio. Pouco do Se elementar é absorvido no intestino devido a sua baixa solubilidade e, portanto, passa a ser excretado nessa forma pelas fezes. Ressalta-se que diferentemente de outros micronutrientes, não há comprovação de que a absorção intestinal de Se sofra qualquer tipo de regulação homeostática (VENDELAND et al., 1994).

Após o processo absorptivo, o selenito é captado pelas hemácias, sendo prontamente reduzido em seleneto, que é lançado na corrente sanguínea e transportado ao fígado com auxílio de uma albumina. O selenato, por sua vez, é incorporado diretamente pelos hepatócitos através do mesmo sistema de transporte dos fosfatos da corrente sanguínea, sendo convertido em selenito e este, reduzido em seleneto (SUZUKI et al., 2005).

Diferentemente das reações simples de redução citadas anteriormente para as formas inorgânicas, as formas orgânicas são convertidas em seleneto por processos enzimáticos muito mais complexos. Sabe-se que a selenocisteína é diretamente convertida em seleneto a partir da enzima  $\beta$ -liase. Já a selenometionina é convertida em seleneto pela ação da enzima  $\gamma$ -liase através de uma série de reações semelhantes à transulfuração (SUZUKI et al., 2005).

É importante salientar que tanto os compostos inorgânicos quanto os orgânicos não são incorporados diretamente em selenoproteínas funcionais, necessitando ser inicialmente reduzidos a seleneto. Este, por sua vez, reage com uma molécula de ATP, sendo transformado em selenocisteína através de uma reação catalisada pela enzima SPS 2. Por conseguinte, há a formação de um composto denominado selenofosfato, que se liga a um resíduo de serina, o que possibilita a formação de uma nova molécula de selenocisteína (ESAKI et al., 1981; BUTLER & WHANGER, 1989).

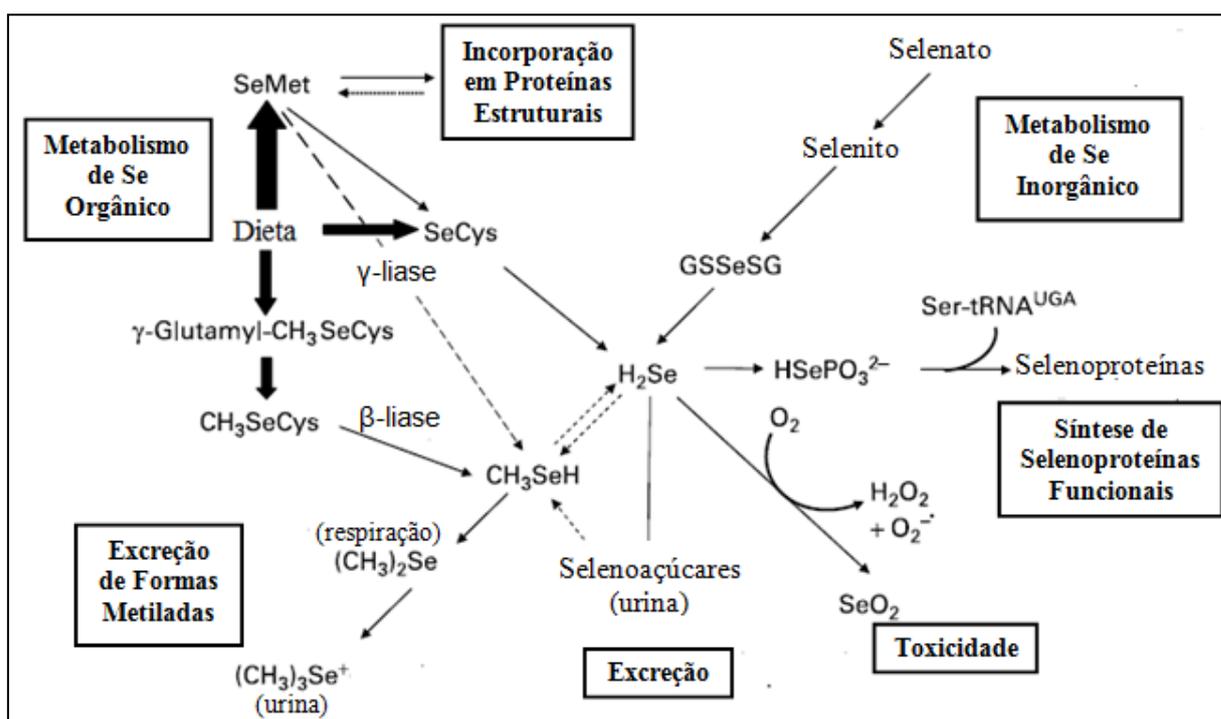
Ressalta-se que o códon de inserção de selenocisteína durante o período de tradução é o UGA que, em geral, também é o códon de terminação. Todavia, cinco componentes são necessários para esse processo de formação de selenoproteínas: duas sequências *cis*, um elemento de inserção de selenocisteína (SECIS), presente na região 3' não traduzida, e o códon UGA, localizado na região codificada; além de três fatores *trans*, um fator de alongação específico para selenocisteína (EFSeCys), o RNA  $t^{SeCys}$  e um proteína que liga o componente SECIS (SBP2), esquematizados na figura 1 (MEHTA et al., 2004).



**Figura 1.** Representação esquemática do processo de tradução de selenoproteínas (Adaptado de SUZUKI, 2005).

Ademais, vale lembrar que a molécula de selenometionina oriunda de fontes exógenas, diferentemente da selenocisteína, é capaz de ser incorporada, sem sofrer quaisquer alterações, em proteínas que apresentam metionina em sua composição, pelo mesmo códon AUG, uma vez que o RNAt não consegue distinguir esses dois aminoácidos durante o processo de tradução (MCCONNELL & HOFFMAN, 1972). Em consequência, 40-50% do Se corporal podem ser armazenados na forma de selenometionina inserida em proteínas do tecido muscular, denominadas selenoproteínas não funcionais. Posteriormente, após a degradação dessas proteínas, a selenometionina pode ser transformada em seleneto pela ação  $\gamma$ -liase e, por conseguinte, ser reutilizada para síntese de selenoproteínas funcionais (DANIELS, 1996).

Quanto ao processo de eliminação, o excedente de Se é transformado no tecido hepático através de reações de metilação, sendo eliminado na forma de metilselênio ou trimetilselenônio por via urinária, que são muito menos tóxicos do que os compostos orgânicos e inorgânicos supracitados (FRANCESCONI & PANNIER, 2004). Não obstante, Se também pode ser eliminado na forma de 1 $\beta$ -metilseleno-N-acetil-D-galactosamina, que é o principal metabólito urinário em alguns indivíduos (KUEHNELT et al., 2006). Por conseguinte, em casos de níveis muito elevados de ingestão de selênio, a via respiratória passa a ser uma rota complementar de excreção do elemento também na forma de metabólitos metilados (MCCONNELL & ROTH, 1966).



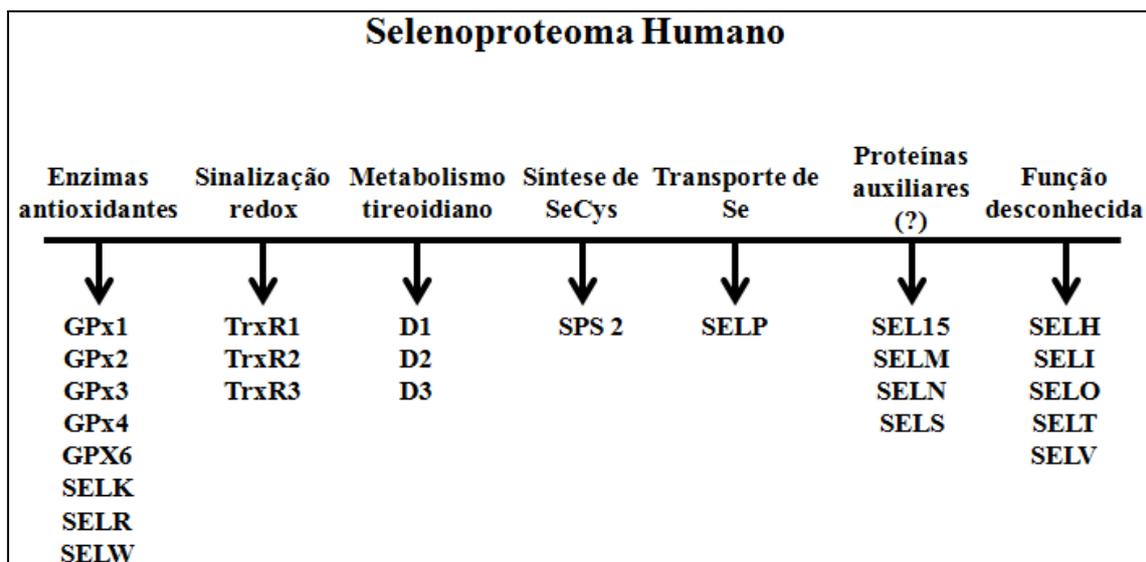
**Figura 2.** Biotransformação de formas orgânicas e inorgânicas de Se em seres humanos. SeMet, selenomethionine; SeCys, selenocisteína; GSSeSG, selenodiglutationa; g-glutamyl-CH<sub>3</sub>SeCys, g-glutamyl-Se-metil-selenocisteína; H<sub>2</sub>Se, seleneto; HSePO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, selenofosfato; CH<sub>3</sub>SeCys, Se-metilselenocisteína; CH<sub>3</sub>SeH, metilselênio; (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Se, dimetilseleneto; SeO<sub>2</sub>, dióxido de selênio; (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Se<sup>+</sup>, íon trimetilselenônio (Adaptado de RAYMAN et al., 2008).

Por fim, a ingestão excessiva das formas orgânicas de Se pode resultar num aumento da sua incorporação nas proteínas do organismo, podendo, inclusive, alterar a função destas. Além disso, *in vitro*, os compostos de Se, tais como: selenito, dióxido de selênio e seleneto podem reagir com grupamentos tióis de inúmeras proteínas, dentre as

quais se destaca a glutathiona, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (SPALLHOLZ, 1997).

### 2.3 Selenoproteínas

As propriedades essenciais do Se para a promoção da homeostase são atribuídas a pelo menos 25 selenoproteínas (SEL) esboçadas na figura 3 e enumeradas a seguir: glutathiona peroxidases (GPx1-GPx6), tioredoxina redutases (TrxR1-TrxR3), desidases (DIO1-DIO3), selenofosfato sintetase (SPS 2), SEL 15 kDa- (SEL15), SELH, SELI, SELK, SELM, SELN, SELO, SELP, SELR, SELS, SELT, SELV, SELW.



**Figura 3.** Selenoproteoma humano. As proteínas foram divididas de acordo com suas determinadas ou possíveis (?) funções. Adaptado de PAPP et al., 2007.

Indubitavelmente, o principal papel biológico do selênio é a formação de enzimas que atuam na prevenção dos efeitos deletérios causados pelos radicais livres. Dentre a grande variedade de selenoproteínas que possuem ação antioxidante, destacam-se: as GPx, a SELP e a TrxR. Essas enzimas, em concentrações satisfatórias, impedem o dano celular acarretado pela peroxidação lipídica e pela oxidação proteica (LEI et al., 2007).

As enzimas GPx efetuam a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio através da oxidação da glutathiona reduzida, um tripeptídeo com grupamento tiol. Existem seis isoformas dessa enzima: a GPx 1, que apresenta localização citoplasmática; a GPx 2, localizada no trato gastrointestinal; GPx 3, que é a selenoproteína de maior concentração no plasma; GPx 4, que é ubiquamente distribuída no organismo e degrada fosfolipídios hidroperóxidos em álcool; GPx 5, com expressão restrita ao epidídimo, além da GPx 6, recentemente descoberta e localizada no epitélio olfatório e em tecidos embrionários (PAPP et al., 2007). De fato, o papel fisiológico destas enzimas depende tanto do status nutricional de selênio no organismo quanto da magnitude do estresse (TEMPLE, 2000). Nesse contexto, acredita-se que a GPx seja o principal mecanismo de defesa do organismo contra os radicais livres (PAPP et al., 2007).

A SELP é a segunda selenoproteína com maior biodisponibilidade no plasma. Trata-se de um importante antioxidante extracelular associada ao endotélio vascular, pois apresenta um importante papel no sequestro de peroxinitrito, reduzindo os riscos de

lesão vascular causado por este radical livre. Adicionalmente, é importante no transporte de selênio hepático para outros tecidos, como cérebro e testículos (BURK & HILL, 2009). Partindo desse pressuposto, dados da literatura demonstram que camundongos knockout para SELP desenvolvem infertilidade e disfunções neuronais (HILL et al., 2004; RENKO et al., 2010).

Já a TrxR é um antioxidante intracelular, que participa da redução de nucleotídeos durante a síntese de ácidos nucleicos (ARNÉR & HOLMGREN, 2001). Ademais, atua na regulação da expressão gênica por controle redox da ligação de fatores de transcrição ao DNA, dentre os quais se destacam: NF- $\kappa$ B, Ref-1, AP-1, P53, receptor de glicocorticoide e proteína quinase reguladora de apoptose (ASK1). Portanto, a TrxR regula indiretamente vias celulares associadas à apoptose, proliferação celular e com a ativação da resposta imune (SUN et al., 1999; RUNDLÖF & ARNÉR, 2004).

Não obstante, as proteínas SELR, SELK e SELW também exercem propriedades antioxidantes. No entanto, vale salientar que as selenoproteínas não atuam apenas no controle redox, mas também no metabolismo tireoidiano através de uma classe de selenoproteínas denominadas desiodases, que serão posteriormente destacadas. Por outro lado, existem também selenoproteínas com potenciais propriedades auxiliares não muito bem elucidadas e outras com funções ainda desconhecidas (PAPP et al., 2007).

## 2.4 Selênio e Metabolismo Tireoidiano

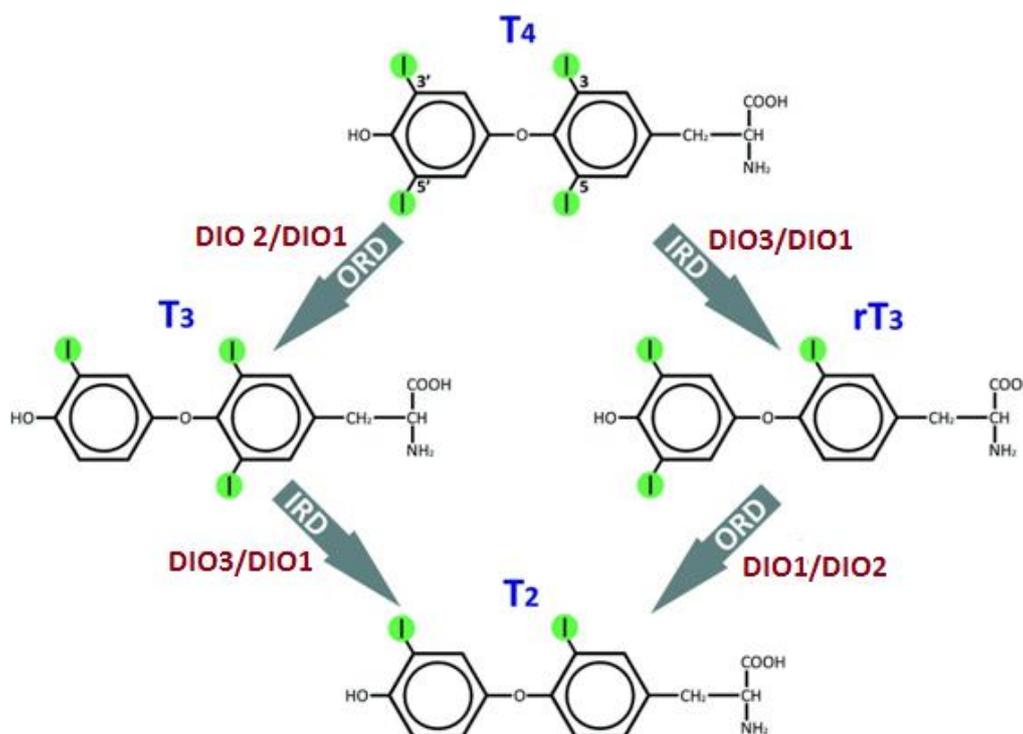
A compreensão do papel do selênio na síntese e ação dos hormônios tireoidianos aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Durante este período, foi demonstrado que as glândulas tireoides pertencem ao grupo de tecidos que apresentam maior concentração de selênio (DICKSON & TOMLINSON, 1967). Este fato se deve principalmente à expressão de selenoproteínas importantes no metabolismo tireoidiano, tais como: DIOs e as GPxs (SCHMUTZLER et al., 2007; SCHWEIZER et al., 2008).

Como demonstrado na figura 4, a família das DIOs é composta por três enzimas (DIO 1, DIO 2, DIO 3) que catalisam a ativação (DIO 1 e DIO 2) e inativação (DIO 1 e DIO 3) dos hormônios tireoidianos, que são importantes para regulação de vários processos metabólicos e fundamentais para desenvolvimento normal do feto. Não obstante, os hormônios tireoidianos também modulam a expressão gênica em vertebrados a partir de um conjunto de fatores de transcrição associados aos receptores desses mesmos hormônios (PAPP et al., 2007).

As DIOs exibem distintos sítios de localização tanto durante a fase de desenvolvimento quanto na fase adulta. De um modo geral, a DIO 1 é principalmente expressa no fígado, nos rins e na tireoide, ao passo que a DIO 2 é expressa no tecido adiposo marrom, sistema nervoso central, hipófise, tireoide e músculos estriados. Já a expressão da DIO3 ocorre predominantemente na placenta, em outros tecidos fetais e na pele de indivíduos adultos (ST.GERMAIN & GALTON, 1997). Em relação à localização subcelular dessas enzimas, sabe-se que a DIO 1 e a DIO 3 estão inseridas na membrana plasmática, enquanto a DIO2 está na membrana do retículo endoplasmático (BAQUI et al 2000; BAQUI et al., 2003).

De acordo com experimentos realizados *in vitro*, proteínas com resíduos mutantes de SeCys apresentam capacidade de desiodação três vezes menor. Portanto, a presença desse aminoácido é absolutamente requerida para a atividade catalítica das DIOs (PAPP et al., 2007). Dessa maneira, não é surpreendente que a concentração de Se no organismo tenha uma ação regulatória sobre a expressão de tais proteínas. Diferentemente do que ocorre em outras selenoproteínas, na deficiência de Se, a expressão de DIO 1 é mantida ou levemente aumentada na glândula tireoide. De modo

semelhante, a restrição de Se também não causa alteração na expressão de DIO 2 e DIO 3 no cérebro e placenta, respectivamente. Mas, ocorre redução da expressão de DIO 1 nos demais tecidos (BATES et al., 2000). Partindo desse pressuposto, é conjecturado que os mecanismos de regulação exercidos pelo Se na expressão dessas enzimas, embora pouco compreendidos, parecem ocorrer de maneira específica e hierarquizada de acordo com determinados tecidos e órgãos (HILL, et al., 1992).

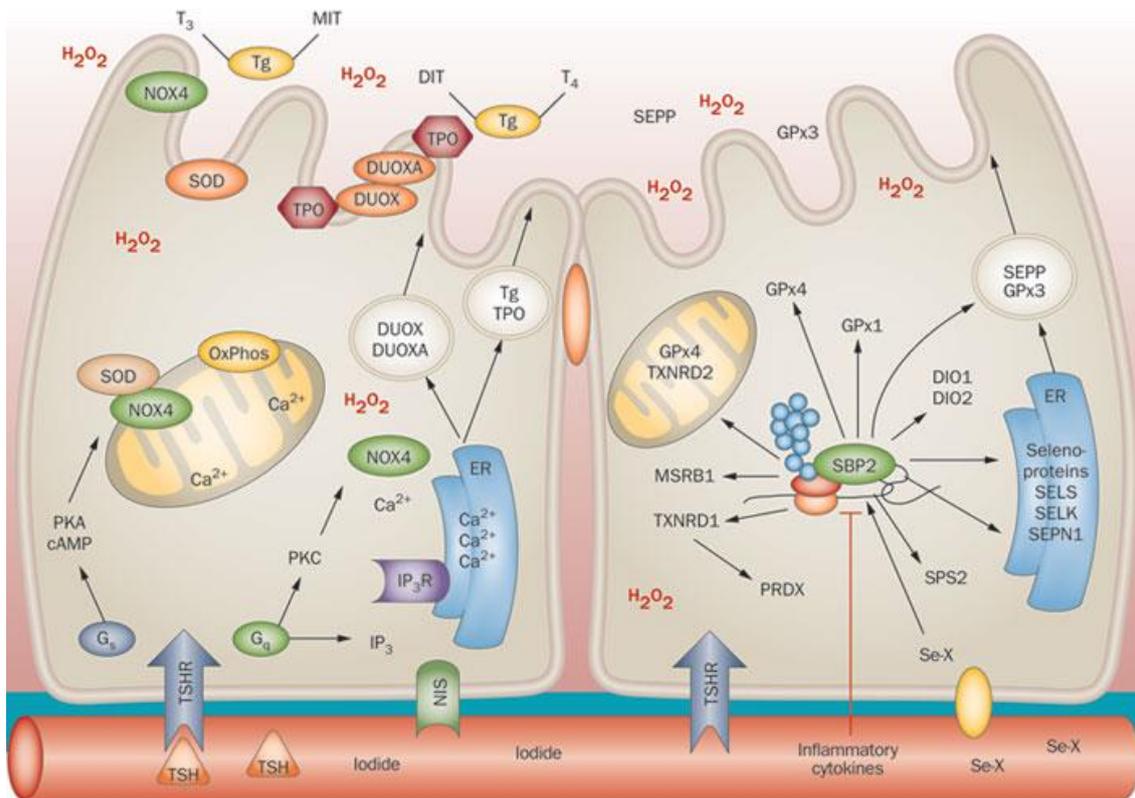


**Figura 4.** Etapas de ativação e inativação dos hormônios tireoidianos. Desiodase 2 (DIO2) converte a hormônio T4 na forma biologicamente ativa T3 através da desiodação do anel externo ou 5' (ORD). A desiodase 3 (DIO3) converte, através da desiodação do anel interno ou 3 (IRD), T4 e T3 para as formas inativas, T3 reverso (rT3) e 3,3'-diiodotironina, respectivamente. Já, a desiodase 1 (DIO1) realiza tanto reações no ORD quanto no IRD (Adaptado de DARRAS & VAN HERCK, 2012).

Quanto às GPxs, estas enzimas são essenciais para manutenção do balanço redox na tireoide. Como demonstrado na figura 5, a produção de hormônios tireoidianos requer a síntese contínua de peróxido de hidrogênio, que age como doador de elétron para oxidação de iodeto, utilizado para formação de iodotironinas. Desta maneira, é evidente a necessidade de uma resposta antioxidante efetiva para controlar os níveis de peróxido de hidrogênio produzido pela dual oxidase, que, em excesso, pode causar lesão tecidual e fibrose da tireoide. Além disso, as glutatonas competem com a tireoperoxidase pelo peróxido de hidrogênio, regulando diretamente a síntese de hormônios tireoidianos (SCHOMBURG, 2011).

É importante enfatizar que a deficiência de Se está relacionada com a gênese e progressão de cretinismo mixedematoso (VANDERPAS et al., 1993; CONTEMPRE et al., 1995). Assim, a deficiência de selênio está implicada com as seguintes consequências biomédicas: i) em longo prazo, pode causar fibrose tireoidiana uma vez

que há redução nos níveis de GPx e, por conseguinte, acúmulo de peróxidos, que, em excesso, causam aumento da iodação e citotoxicidade; ii) em curto prazo, pode reduzir as concentrações plasmáticas da DIO 1, principalmente, favorecendo menor produção de T3 e iii) redução de outras selenoproteínas (CHANOINE et al., 1992; CONTEMPRE et al., 1995). Por outro lado, são necessários estudos que comprovem se a suplementação diária de selênio é capaz de alterar a síntese, a regulação e o metabolismo dos hormônios tireoidianos (KÖHRLE et al., 2005).



**Figura 5.** Papel das selenoproteínas no metabolismo tireoidiano. Dentre os vários estímulos fisiológicos para o controle da síntese de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em tireócitos, destacam-se principalmente o suplemento de iodo, a cascata de sinalização do TSH, além da fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) e da atividade da NADPH oxidase (Nox4) (célula da esquerda). A estimulação do receptor para TSH (TSHR) ativa duas vias intracelulares dependentes de proteínas G ( $G_s$  e  $G_q$ ). Essas vias culminam na ativação e proteínas quinases (PKA e PKC, respectivamente) que, por conseguinte, promovem a biossíntese do simporte sódio / iodeto (NIS), de tiroglobulina (Tg) e de enzimas de iodação. Em contrapartida, a biossíntese de selenoproteínas de proteção é afetada principalmente pelo genótipo, pela biodisponibilidade de compostos orgânicos e inorgânicos (Se-X) e por estímulos inflamatórios (célula do lado direito).  $H_2O_2$  intracelular serve para fins de sinalização e, como resultado, a sua concentração é altamente regulada devida sua biodisponibilidade elevada no coloide, que é necessária para a organificação do iodo nos resíduos tirosil. Desse modo, há a formação de resíduos de mono e diiodotirosina (MIT, DIT). Um ideal arranjo espacial da dual oxidase (DUOX / DUOXA), da tiroperoxidase (TPO), juntamente com a superóxido dismutase (SOD) melhora o uso extracelular de  $H_2O_2$  e limita a sua difusão. Embora, a localização subcelular de selenoproteínas antioxidantes seja mal caracterizada nos tireócitos, sabe-se que a selenoproteína P (SEPP) e glutaciona peroxidase 3 (GPx3) são ativamente secretadas, enquanto sete selenoproteínas, incluindo selenoproteína S e K

(SELS, SELK), exercem função de controle em vias que ocorrem no interior do retículo endoplasmático (ER). Desiodases 1 e 2, (DIO1, DIO2), e GPx1 GPx4, metionina sulfóxido reductase B1 (MSRB1), selenofosfato sintetase 2 (SPS2) e tioredoxina redutase 1 (TXNRD1) são proteínas citoplasmáticas, enquanto que a isoenzima e TXNRD2 e GPx4 são mitocondriais. SBP2 é um fator limitante da taxa de tradução de selenoproteínas, que é negativamente modulado por citocinas inflamatórias. Abreviaturas: cAMP, AMP cíclico; IP3, inositol 1, 4, 5-trifosfato; IP3R, receptor para IP3; PRDX, peroxiredoxina (Adaptado de SCHOMBURG, 2011).

## 2.5 Selênio e Metabolismo Energético

As células  $\beta$  do pâncreas apresentam baixa capacidade antioxidante, sendo susceptíveis ao estresse oxidativo. Desse modo, animais com deficiência de selênio apresentam baixa secreção de insulina, que é prontamente normalizada com a devida suplementação deste nutriente (TONG & WANG, 2008). Observa-se, ainda, que em camundongos db/db, em que os animais são predispostos a desenvolverem diabetes do tipo II, a suplementação com selenato apresenta ação insulino-mimética, enquanto a deficiência de Se e a própria reposição com selenito de sódio agravam o quadro destes animais (MUELLER et al., 2008).

Molecularmente, sabe-se que a suplementação com formas inorgânicas de selênio em adipócitos ou hepatócitos isolados de ratos é capaz de estimular a ativação de proteínas associadas à sinalização intracelular da insulina, tais como: a Akt, a PI3K e a p70<sup>rsk</sup>, que atuam na translocação de vesículas contendo transportadores de glicose em direção à membrana plasmática e na síntese de glicogênio, lipídios e proteínas (EZAKI, 1990; RODEN et al., 1995). Como estas ações insulino-miméticas são obtidas através da utilização de doses quase tóxicas, utilização destes compostos com finalidade terapêutica se torna inviável (MUELLER & PALLAUF, 2006).

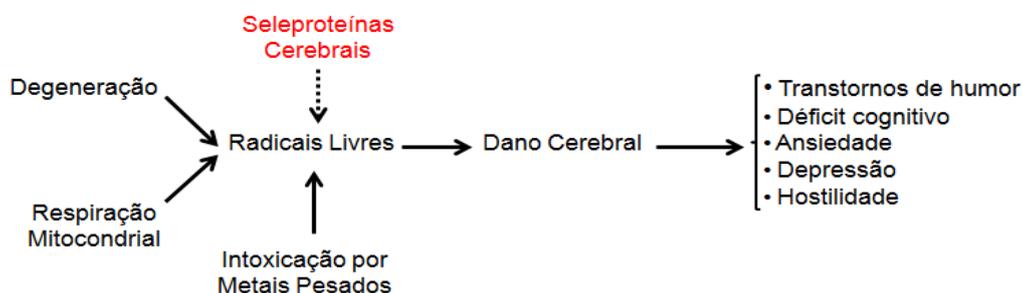
Contrária às comprovadas propriedades insulino-miméticas desempenhadas pelo selênio, alguns estudos epidemiológicos realizados nos EUA demonstraram que a suplementação de selênio está relacionada com a prevalência de diabetes tipo II e com aumento nos níveis plasmáticos de colesterol, triglicerídeos e de LDL na população deste país (BLEYS et al., 2007; BLEYS et al., 2008). Nesse contexto, alguns trabalhos apontam para uma espécie de “paradoxo redox”, ou seja, a redução da biodisponibilidade pancreática de formas reativas de oxigênio pode causar resistência insulínica (GOLDSTEIN et al., 2005). Este processo é mediado pela GPx1 (MCCLUNG et al., 2004; WANG et al., 2008), que reduz a síntese de peróxido de hidrogênio produzido pela NAD(P)H oxidase 4 (MAHADEV et al., 2004). Desta maneira, o arrefecimento das concentrações intracelulares deste hidroperóxido favorece a ativação da proteína tirosina fosfatase 1B, que desfosforila os resíduos do receptor de insulina (MAHADEV et al., 2001). Além disso, a GPx 1 também ativa a proteína PTEN que desfosforila os produtos oriundos da atividade da PI3K, como a proteína AKT. Assim, a cascata de sinalização intracelular da insulina é interrompida (LOH et al., 2009).

Curiosamente, em modelos animais que superexpressam GPx1, a restrição alimentar, além de eliminar o quadro de obesidade, reduz a hiperglicemia e a resistência insulínica nestes animais, enquanto que a hiperinsulinemia crônica persiste mesmo com a restrição de Se na dieta. (WANG et al., 2008; PEPPER et al., 2011).

## 2.6 Selênio e Sistema Nervoso Central

O Se é amplamente distribuído em todo o corpo, mas é preferencialmente mantido no cérebro, mesmo após um período prolongado de restrição dietética desse elemento traço (SCHWEIZER et al., 2004). Dessa forma, foi demonstrado que ratos submetidos a uma dieta pobre em Se por treze semanas apresentaram depleção plasmática de Se, sem que houvesse alteração da biodisponibilidade cerebral desse nutriente (PROHASKA & GANTHER, 1976). De forma semelhante, em outro experimento, a sexta geração de ratos submetidos à dieta deficiente de Se, tiveram redução de 99% na concentração desse elemento no fígado, plasma, tecido ósseo e músculos, ao passo que no sistema nervoso central houve uma retenção de cerca de 60% (KYRIAKOPOULOS et al., 2000). Tais resultados sugerem que o Se desempenha um papel fundamental para manutenção das funções cerebrais.

Nesse contexto, pesquisas recentes sugerem uma forte associação entre os níveis de selênio e distúrbios neuronais, principalmente em situações de desbalanço redox. De fato, indivíduos com deficiência de selênio tendem a desenvolver transtornos de humor, deficiência cognitiva, ansiedade, depressão e hostilidade (RAYMAN & RAYMAN, 2002). No entanto, o aumento da oferta deste elemento na dieta pode atenuar e estabilizar estas disfunções. Adicionalmente, observa-se também uma correlação não muito bem esclarecida entre deficiência de selênio, aumento do estresse oxidativo e doenças neurais, tais como: acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia e esclerose múltipla (CHEN & BERRY, 2003; SCHWEIZER et al., 2004).



**Figura 6.** Papel das selenoproteínas cerebrais na prevenção de distúrbios comportamentais. Setas fechadas indicam formação, enquanto setas tracejadas indicam supressão da produção de radicais livres (adaptado de ZHANG et al., 2010).

Dessa forma, um balanço adequado entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a ação das defesas antioxidantes endógenas é de extrema importância para a integridade do sistema nervoso central, o qual por possuir menor expressão de enzimas antioxidantes e alto conteúdo lipídico é um dos tecidos mais vulneráveis aos efeitos deletérios do estresse oxidativo (ARLT et al., 2002; SULTANA et al., 2006).

### 3 JUSTIFICATIVAS

A suplementação mineral é uma das práticas mais realizadas na pecuária brasileira a fim de aumentar a produtividade. Trata-se, pois, de um processo caracterizado em verificar, se há ou não deficiência de um ou mais elementos e, em caso positivo, suplementar um ou mais nutrientes deficientes. Entretanto, muitos produtores realizam este manejo de forma equivocada uma vez que há oferta de misturas minerais desbalanceadas ou desnecessárias para um determinado rebanho.

O risco de intoxicação para animais e para o homem, apesar do elemento ser incluído nos suplementos minerais e consumido indiscriminadamente por pessoas que buscam melhorias no desempenho como atletas ou no retardo do envelhecimento, não é pequeno, uma vez que as doses terapêuticas ou profiláticas não são muito maiores que as doses tóxicas.

Assim, é imprescindível a realização de estudos mais meticolosos que favoreçam uma melhor compreensão sobre as possíveis implicações desta prática no desencadeamento de distúrbios metabólicos, cardiovasculares e neuroendócrinos nesses indivíduos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

- Avaliar uma possível ocorrência de alterações neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais em prole de ratas Wistar suplementadas durante o período de prenhez e lactação com selenito de sódio, com a dose de 1mg/Kg/dia, que é considerada supranutricional, porém não tóxica.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o metabolismo tireoidiano através da determinação das concentrações plasmáticas de TSH, T3 e T4 por quimioluminescência, bem como da determinação da expressão das DIOs teciduais pela técnica RT-qPCR.
- Avaliação da ingestão neonatal de leite;
- Avaliar o metabolismo energético em prole de ratas Wistar tratadas cronicamente com selenito de sódio através das mensurações da glicemia em condições basais e de jejum, do teste de tolerância à glicose, do perfil lipídico, da dosagem de leptina e do peso corporal.
- Avaliar a atividade da colinesterase neuronal em regiões cerebrais prosencefálicas e mesencefálicas através do método modificado de Ellman;
- Caracterizar a expressão de TPH2 e TH no hipocampo pela técnica RT-qPCR.
- Avaliar a ingestão hídrica e de alimentos em condições basais e de jejum;
- Avaliar a atividade motora espontânea através do teste do campo aberto;
- Avaliar a expressão de comportamentos semelhantes à ansiedade e à depressão através dos testes do labirinto em cruz elevado e do nado forçado, respectivamente;
- Avaliar as capacidades cognitivas e mnemônicas através do teste de reconhecimento de objetos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos, com peso 220-250g, provenientes do plantel do biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas. Os animais receberam durante este período água e ração (Purina ®) *ad libitum*, em salas com ambiente aclimatizado (temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e com ciclo de claro-escuro de 12 horas.

Após o término de cada experimento, os animais eram devidamente submetidos à eutanásia pelo método de decapitação. Ressalta-se, que esse delicado procedimento era realizado por pessoas treinadas e que, portanto, estavam aptas à execução do método.

Desse modo, todos os procedimentos utilizados neste estudo estavam de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em consonância com a Lei 11794 de 8 de Outubro de 2008 e o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publicação Nº 85-23, revisado 1996).

### 5.2 Drogas

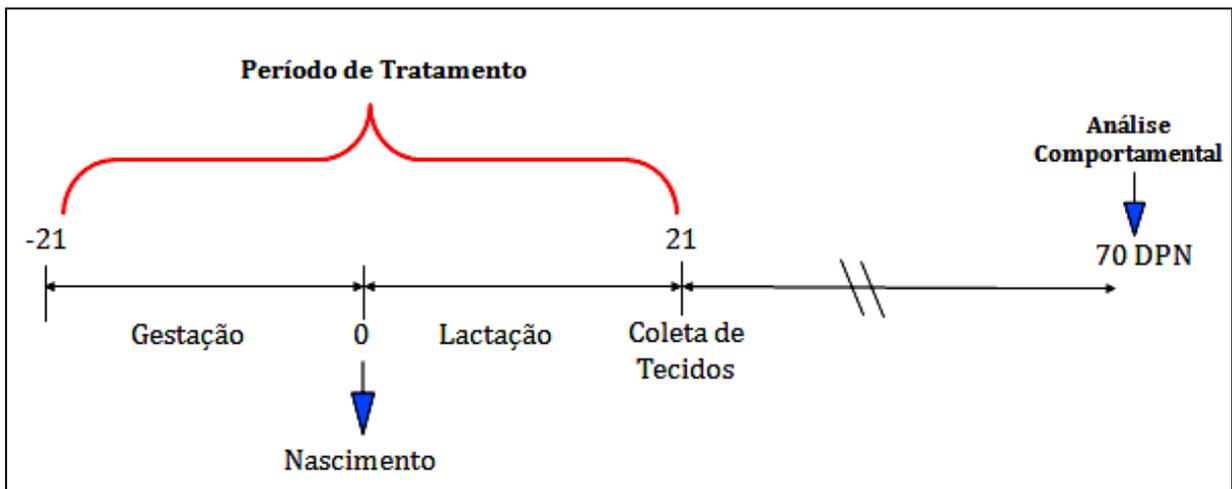
Para realização da suplementação de Se, foi utilizado o composto inorgânico selenito de sódio (Sigma-Aldrich), que é o componente mais utilizado para elaboração de receitas para misturas minerais empregadas na suplementação humana e animal. Vale destacar que o fármaco foi diluído em solução salina fisiológica e permaneceu sob refrigeração em alíquotas contendo 2 ml e concentração de 10mg/ml.

### 5.3 Tratamento

Foram utilizados 12 ratas e 6 ratos durante cada experimento. Durante o período de acasalamento, tais animais foram distribuídos em caixas de acrílico (34 cm x 40 cm x 20 cm) com uma razão de duas fêmeas para um macho. Nos dias subsequentes à exposição inicial ao macho, as fêmeas foram diariamente submetidas à técnica de esfregaço vaginal a fim de detectar a presença de espermatozoides. Uma vez que essas células fossem visualizadas, o primeiro dia de prenhez da fêmea correspondente ao lavado vaginal era considerado.

A partir desse momento, as ratas eram divididas em dois grupos experimentais, que foram submetidos durante a gestação e lactação aos seguintes tratamentos: solução salina 0,9% ou solução de selenito de sódio na dose de 1mg/Kg por gavagem. Cada matriz recebia 0,1 ml de uma das soluções para cada 100g de peso. Vale destacar que a dose escolhida está de acordo com alguns protocolos descritos na literatura (JACOBS & FORST, 1981; BOYLAN et al., 1990).

Após o nascimento, as ninhadas obtidas foram padronizadas em número máximo de 8 filhotes (4 machos e 4 fêmeas) por fêmea. A prole, ao atingir 21 dias, foi submetida ao desmame, sendo as fêmeas prontamente usadas para avaliação neuroendócrina. Já, os machos, ao atingirem a fase adulta, foram submetidos às avaliações comportamentais.



**Figura 7.** Representação esquemática do desenho experimental.

## 5.4 Procedimentos Experimentais

### 5.4.1 Avaliação da função tireoidiana

#### 5.4.1.1 Dosagem de TSH, T3 e T4 total

As quantificações das concentrações séricas de TSH, T3 e T4 foram realizadas por método de eletroquimioluminescência pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LACFAR) da UFRJ.

Essa técnica consiste num processo de reações químicas que geram luminescência a partir de um estímulo elétrico. A eletroquimioluminescência difere da quimioluminescência são gerados eletroquimicamente, por precursores estáveis, na superfície de um eletrodo. O quelato tris (bipiridil) rutênio ( $Ru^{+2}$ ) é o marcador de luminescência mais comumente utilizado e a eletroquimioluminescência é gerada, em um eletrodo, a partir de uma reação de oxidação-redução com tripropilamina. Este quelato é muito estável e relativamente pequeno e tem sido utilizado para marcar haptenos ou grandes proteínas (proteínas ou oligonucleotídeos). Não obstante, o processo de eletroquimioluminescência tem sido utilizado em ensaios imunológicos e de ácidos nucleicos. A vantagem desse processo consiste na preparação simples, na alta estabilidade dos reagentes e em uma grande sensibilidade. A utilização desse processo proporciona limites de detecção de 200fmol/L e uma escala dinâmica, que se estende por seis ordens de magnitude (BURTIS, 2011).

Os valores de referência adotados para avaliação hormonal foram: 0,3 a 5,0 mUI/ml para TSH; 70 a 210 ng/dl para T3 e 4,5 a 12,5 mcg/dl para T4. No entanto, esses intervalos de normalidade são baseados para análise em humanos.

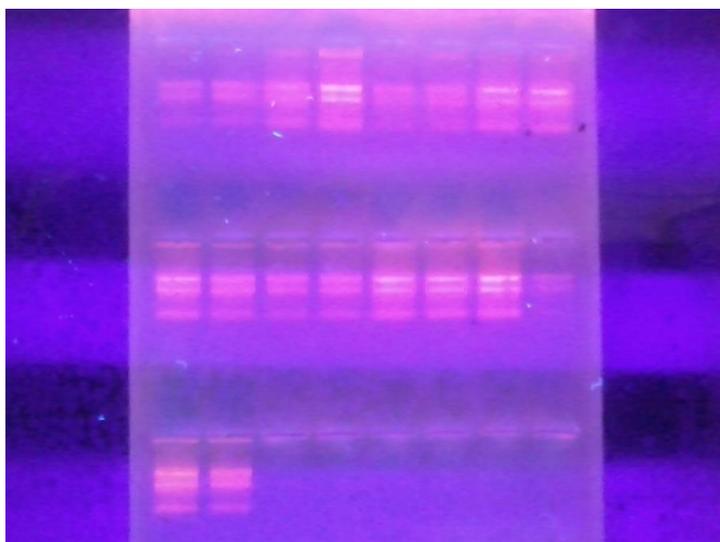
#### 5.4.1.2 Determinação da expressão das DIOs

Foi utilizada a técnica semi-quantitativa de RT-PCR para determinar os níveis dos genes da enzima DIO 1 e 2 nas amostras de RNA extraídos fígado, tireoide e tecido adiposo marrom.

Para a extração do RNA total dos tecidos, foi utilizado o reagente Trizol® conforme as instruções contidas em seu manual (Invitrogen, NY, EUA). As amostras foram homogeneizadas em 0,5 ml de Trizol®. Aos lisados celulares foram adicionados

0,1 ml de clorofórmio, para separação do RNA total. Após centrifugação (12000 x g, 4°C, 10 minutos) foi possível observar uma fase superior aquosa, transparente e uma fase inferior mais densa e rosada. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 0,25 ml de isopropanol, para a precipitação do RNA total. Após centrifugação (12000 x g, 4°C por 10 minutos), o sobrenadante foi descartado e 1ml de etanol 75% foi adicionado para lavagem do precipitado remanescente. O etanol foi descartado e o precipitado, depois de seco, foi ressuspenseo em água tratada com dietil-pirocarboneto (DEPC) (Sigma, MO, EUA). O RNA total extraído foi armazenado em freezer a -20° C (GROZOVSKY, 2006).

O RNA total extraído dos tecidos foi diluído em água tratada com DEPC, sendo a concentração (em µg/µl) e a pureza do RNA estabelecidas através da utilização de um nanofotômetro. Depois da quantificação do RNA total extraído, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% em TAE 1X (0,04 M Trisacetato + 1 mM EDTA) para a verificação da integridade das amostras, através da observação das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal, 28S e 18S (GROZOVSKY, 2006). A visualização das bandas foi possível através da utilização de transluminador UV (figura 8).

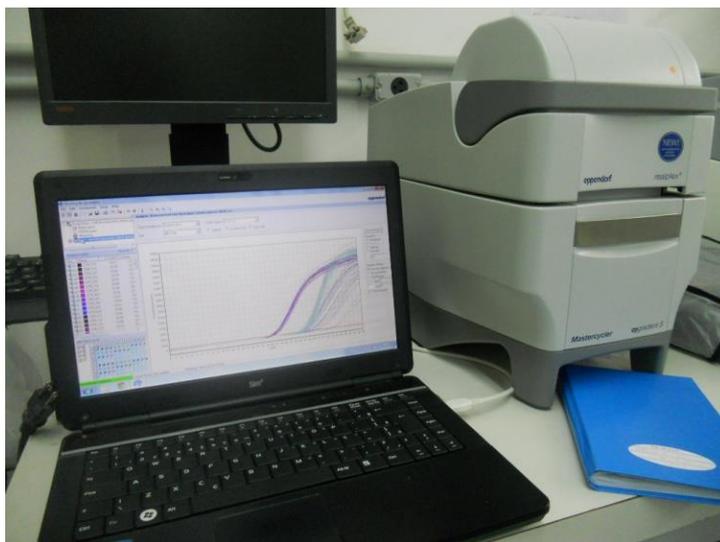


**Figura 8.** Análise qualitativa do RNA extraído das amostras através da utilização de um transluminador UV.

Para a síntese de fitas simples de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total através do mecanismo de transcrição reversa, foi utilizado um kit da *Promega*, por meio do protocolo fornecido pelo fabricante, onde 1 µg de RNA é incubado a 70°C por 10 minutos, resfriado durante 1 minuto em gelo e, em seguida, é adicionado 0,5 µg oligo-dT (iniciador da reação), 2 µL dNTPs (10mM de cada -dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 µL Tampão 10X, 4 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 0,5 µL Inibidor de Rnases; 0,65 µL de enzima (Transcriptase Reversa, 15u) e 0,5 µL água. A reação, de volume final 20 µl, foi então recolocada no termociclador para ser incubada a 42°C por 15 minutos, seguida por 95°C por 5 minutos e 0-5°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a 4°C até a sua utilização.

Após a obtenção do cDNA, foi realizada a amplificação do fragmento correspondente ao RNA mensageiro do gene desejado, utilizando-se um aparelho de PCR *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf, Germany), que possui um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação

(figura 9). Nesse aparelho, as amostras foram desnaturadas pela incubação a 50°C durante 2 min e a 95°C por 10 minutos. Logo em seguida, as reações foram 40 vezes repetidas ciclicamente, usando as seguintes etapas para todos os genes estudados: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos (MACHADO et al., 2009). A fluorescência da reação de amplificação entre os primers e *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (Fermentas, USA) foi detectada no fim de cada ciclo para monitorar a quantidade de produto de PCR formado durante cada ciclo. Para tanto, foi feita a padronização por meio da análise de diluições seriadas de cDNA para os diferentes genes estudados a fim de calcular a eficiência de cada ensaio.



**Figura 9.** Aparelho de PCR *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf, Germany)

Os níveis relativos de RNAm foram determinados pela comparação de uma linha limiar que foi traçada na curva exponencial, formada a partir da amplificação de DNA. Essa curva foi usada para calcular o CT (do inglês *cycle threshold*) de cada amostra, ou seja, o ciclo do PCR no qual a fluorescência cruza a linha de base. O valor do CT é inversamente proporcional à quantidade de amostra na reação, assim quanto maior a concentração do DNA de estudo, menor é o valor de CT.

Após a normalização das amostras, o grupo controle tem seu valor convertido para 1 e os outros grupos tem seus valores convertidos em relação a ele conforme o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Ademais, é importante ressaltar que cada amostra foi analisada em duplicata.

Os primers de interesse utilizados para a amplificação do cDNA foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies Inc. Como controle interno dos experimentos foi utilizado o gene 36β4, um gene constitutivo que codifica uma proteína ribossomal. Desse modo, a sequência senso e antisenso dos primers utilizados no protocolo estão enumeradas a seguir: 5'-TTCCCACTGGCTGAAAAGGT-3' e 5'-CGCAGCCGCAAATGC-3' para 36β4; 5'-GACAGGGCTGAGTATGGG-3' e GCTCGGTATTGCTTTATCT para DIO 1; 5'-TTCTCCAACCTGCCTCTTCCTG-3' e 5'-CCCATCAGCGGTCTTCTC-3' para DIO 2.

## **5.4.2 Avaliação do metabolismo energético**

### **5.4.2.1 Peso corporal**

A fim de avaliar se a suplementação materna com selenito de sódio altera a capacidade de ganho de peso da prole, os animais foram pesados semanalmente com auxílio de uma balança de mesa. Esse procedimento foi realizado até que os animais de ambos os grupos experimentais completassem 70 DPN.

### **5.4.2.2 Avaliação da ingestão neonatal de leite**

A avaliação de ingestão de leite foi realizada segundo a adaptação do protocolo descrito por Perillan et al (2007). O dia de nascimento dos animais foi designado como dia zero. As ninhadas, usualmente constituídas de oito a doze filhotes, serão submetidas a este desafio no primeiro e no décimo quarto dia pós-natal. O protocolo é dividido em quatro etapas:

- **Privação**

A ninhada foi padronizada para oito filhotes, os quais foram separados da mãe por um período de duas horas e alocados em caixas brancas de acrílico (30cmx20cmx13cm) com maravilha, sendo aquecidos com auxílio de uma lâmpada de 25 watts.

- **Pesagem**

Os animais foram pesados através de uma balança de precisão antes e depois do período de privação.

- **Ingestão**

Após o período de privação, os filhotes foram recolocados junto as suas progenitoras durante uma hora e meia. Em seguida, foram repesados.

- **Cálculo da ingestão**

A porcentagem de ganho de peso será calculada tomando como base a média percentual de ganho de peso dos animais após a amamentação em relação à média percentual do peso após a privação, considerada 100%. O ganho de peso corporal foi usado como a mensuração da ingestão de leite, uma vez que não haverá nenhuma outra fonte de ganho de peso. De acordo com Wirth & Epstein (1976) que primeiramente designaram este teste de ingestão, perdas por evaporação presume-se ser a mesma para todos os neonatos, tratados ou controles, e que não há excreção espontânea em ratos lactantes.

### **5.4.2.3 Glicemia**

Este protocolo foi realizado em filhotes com 21 DPN e 70 DPN através de um glicosímetro portátil, sendo utilizado um método de medição eletroquímico. Para realização desse paradigma experimental, foi realizada coleta das amostras de sangue através da artéria coccígea, com auxílio de uma agulha hipodérmica. Em seguida, uma fita de glicosímetro foi cuidadosamente posicionada sobre a gotícula de sangue proveniente da coleta e conectada ao equipamento responsável pela leitura.

Também é necessário ressaltar que, com 21 DPN, foi verificada a glicemia apenas em condições basais, enquanto que, com 70 DPN, em diferentes condições metabólicas (basal, jejum e realimentação). Para este propósito, os animais com 70 DPN foram inicialmente submetidos à avaliação glicêmica em condições basais. Após essa mensuração inicial, os mesmos animais ficaram em jejum alimentar por 4 horas e, depois desse período, a glicemia dos indivíduos de ambos os grupos foi reavaliada. Por fim, os animais receberam ração *ad libitum* por 1 hora. Logo, em seguida, foi verificada a glicemia de realimentação.

#### **5.4.2.4 Teste de tolerância à glicose**

O teste de tolerância à glicose é um exame auxiliar para avaliação de alguns distúrbios que afetam o metabolismo glicêmico, como a hipoglicemia e a diabetes.

Para realização deste paradigma, os animais com 24 DPN foram mantidos isolados em caixas brancas de acrílico (30cmx20cmx13cm) e submetidos a jejum alimentar equivalente a 18 horas. Após esse período, cada animal recebeu glicose na dose de 2g/Kg por via oral. Em seguida, com auxílio de um glicosímetro portátil, a glicemia foi avaliada nos tempos 0,15, 30, 60 e 120 minutos após a administração inicial de glicose.

#### **5.4.2.5 Metabolismo Lipídico**

Foi realizada pela técnica de cromatografia em camada delgada unidimensional (TLC) em placas de sílica gel (Merck®). O princípio da TLC segue o mesmo princípio de outras técnicas de cromatografia: um composto possui afinidades diferentes para as fases móveis e estacionárias, afetando a velocidade com a qual ele migra. Os lipídios provenientes de amostras de tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom e fígado de animais com 21 DPN foram reconstituídos em 30 µl de clorofórmio para aplicação das amostras em placas de sílica. Dessa forma, os fosfolipídios foram separados utilizando a seguinte mistura de solventes: acetona, metanol, ácido acético, clorofórmio e água (15:13:12:40:8 v/v, respectivamente) (HORWITZ & PERLMAN, 1987). Já os lipídios neutros foram separados após a corrida das placas de sílica gel em mistura de hexano, éter etílico, ácido acético (60:40:1 v/v, respectivamente). Após a evaporação dos solventes, as placas de cromatografia foram pulverizadas com solução de Cherring, que é composta de sulfato de cobre 10% (p/v) e ácido fosfórico 8% (v/v). Logo após essa etapa, as placas foram queimadas em fornos Pasteur a 170°C por 5 a 10 minutos (RUIZ & OCHOA, 1997). Quanto à análise densitométrica, utilizou-se o software Image Total Lab versão 1.4 (GE Healthcare®.Brazil Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil). Ademais, cada categoria de lipídios foi identificada por comparação com uma amostra padrão (ANGELO, 2011).

#### **5.4.2.6 Dosagem de Leptina**

A dosagem sérica de leptina foi realizada por ensaio imunoenzimático pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LACFAR) da UFRJ.

Este ensaio emprega o sanduíche quantitativo que é uma técnica de ensaio imunoenzimático. Nesse teste, um anticorpo monoclonal específico para o domínio globular da leptina reveste uma microplaca. Dessa forma, na microplaca são pipetados os padrões e amostras. Após um período de incubação, a microplaca é lavada com uma solução de lavagem. Em seguida, um segundo anticorpo marcado com uma enzima e

específico para leptina é pipetado em cada poço. Depois de um período de incubação, é feita uma lavagem para remover os anticorpos não ligados às moléculas de leptina. Logo após, uma solução de substrato é adicionada aos poços e, por conseguinte, a enzima ligada ao anticorpo reage com o substrato, desencadeando a mudança de cor do cromógeno. Assim, a presença de cor nos poços indica a presença da leptina. Ressalta-se ainda que a intensidade luminosa pode ser analisada por um espectrofotômetro, permitindo uma análise quantitativa (ELEUTERIO et al., 2013).

Os valores de referência adotados para avaliação hormonal foram 2,0 a 5,6 ng/ml. No entanto, esse intervalo de normalidade é baseado para análise em humanos.

#### **5.4.2.7 Avaliação do comportamento ingestivo na vida adulta**

Para realização desse protocolo experimental foram utilizadas gaiolas metabólicas de acrílico transparentes que permitiam o acesso *ad libitum* de ração e de água pelos animais. Cada um dos quais foram inseridos individualmente nas gaiolas para adaptação durante 4 dias. Após esse período, foi realizada a avaliação do comportamento ingestivo tanto em condições basais quanto em jejum alimentar de 24 horas.

Antes de começar os experimentos, os bebedouros graduados foram devidamente enchidos e 30g de ração foram pesados e distribuídos para cada animal. Logo em seguida, a ingestão acumulativa de ração e de água foram avaliadas após 30, 60 e 120 minutos.



**Figura 10.** Gaiolas metabólicas

#### **5.4.3 Avaliação neuroquímica indireta**

##### **5.4.3.1 Atividade da colinesterase**

A determinação da atividade da AChE em diferentes regiões encefálicas foi feita através do método de Ellman. Esta técnica é baseada na reação de hidrólise da acetilcolina ou outros ésteres da colina por colinesterases existentes nos neurônios, com

a formação de dois produtos: tiocolina e ácido acético. De acordo com a atividade da enzima, a cinética da reação pode ser alterada (ELLMAN *et al.*, 1961).

Para realização desse protocolo, animais com 21 DPN de ambos os grupos experimentais foram submetidos à eutanásia. Após a retirada dos cérebros, foram dissecadas sobre placa fria as seguintes regiões encefálicas: tronco cerebral, cerebelo, núcleos da base, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. As amostras, então, foram armazenadas em tubos plásticos e mantidas a 70° para posterior análise. Para determinação da atividade enzimática, as regiões encefálicas coletadas foram devidamente pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 0,1M e pH 7,3, que continha TRITON-X 100 a 1% e EDTA 1mM, a 4°C. A proporção de tampão de homogeneização usada foi de 1:2 (peso: volume). Em seguida, os homogenizados foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos.

A atividade da colinesterase foi determinada no sobrenadante imediatamente após o ciclo de centrifugação. Para este propósito, a fonte de colinesterase foi obtida a partir de alíquotas de 20 µl retiradas das amostras, as quais se adicionou 100 µl ditiobisnitrobenzeno (DTNB) na concentração de 3,96 mg/mL e 3,1 ml de PBS 0,1M, totalizando um volume de 3,22 ml. Antes de iniciar a avaliação enzimática, uma parte desse volume total foi realocado em cubetas, sendo adicionado acetilcolina na concentração 18 mg/ml como substrato da colinesterase. Dessa maneira, com a utilização de um espectrofotômetro ajustado a 415nm, a atividade da enzima foi mensurada a partir da formação dos produtos da reação refletida na absorvância acumulativa a cada 60 segundos, durante um período total de 5 minutos.

#### **5.4.3.2 Expressão das enzimas TH e TPH2**

Foi utilizada a técnica semi-quantitativa de RT-PCR para determinar os níveis dos genes das enzimas TH e TPH2 nas amostras de RNA extraídos do hipocampo de animais com 21 DPN. A metodologia adotada foi idêntica à descrita anteriormente para expressão das DIOs.

Vale destacar que os primers de interesse utilizados para a amplificação do cDNA também foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies Inc.. Desse modo, a sequência senso e antisenso dos primers utilizados no protocolo estão enumeradas a seguir: 5'-TTCCCACTGGCTGAAAAGGT-3' e 5'-CGCAGCCGCAAATGC-3' para 36β4; 5'-TGAGAACCCCAAATCCTGCA-3' e 5'-CCCAGCCAACAGACCTAACTG A-3' para TPH2; 5'-CCCCACCTGGAG TATTTTGTG-3' e 5'-ATCACGGGCGGACAGTAGACC-3' para TH.

#### **5.4.4 Avaliação psicobiológica durante a vida adulta**

Ao atingirem 70 DPN, os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: campo aberto, labirinto em cruz elevado, natação forçada e reconhecimento de objetos. Em todos os testes, o número de animais utilizados variou de dez a doze indivíduos em cada grupo experimental.

Com exceção da avaliação mnemônica, os demais testes foram realizadas entre 19:00 e 23:00 horas. Durante cada teste, os experimentadores ficavam do lado de fora da sala de comportamento. No entanto, no intervalo entre os testes, os mesmos entravam na sala, retiravam os animais e higienizavam devidamente os aparatos com álcool 10%. Ademais, é importante salientar que todos os testes eram gravados e os parâmetros comportamentais foram analisados posteriormente por dois experientes pesquisadores. A fim de obter uma avaliação fidedigna, o teste do campo aberto e do

labirinto em cruz elevado também foram analisados pelo software Anymaze® (Stoelting Co., Wheat Dale, IL, Estados Unidos).

#### 5.4.4.1 Teste do campo aberto

Este teste é um simples protocolo, cuja avaliação dos seus componentes têm sido amplamente utilizada para determinação de emocionalidade (Roth & Katz, 1980) e da atividade locomotora espontânea e exploratória em roedores (WALSH & CUMMINS, 1976). Além disso, este teste também é considerado um excelente modelo sensível a drogas com propriedades ansiolíticas (PRUT & BELZUNG, 2003).



**Figura 11.** Teste do campo aberto

Imediatamente antes do ensaio, cada animal foi inserido individualmente no centro de uma caixa de acrílico (80 cm x 80 cm x 30 cm) dividida igualmente em 25 quadrantes distribuídos em três diferentes zonas (central, intermediária e periférica), onde os mesmos foram permitidos a explorar o ambiente por 5 minutos (figura 11). Nesse protocolo, foi avaliada a distância total percorrida, a distância percorrida em cada uma das três zonas, o número de rearings (levantamento das patas dianteiras pressionadas contra a parede da arena), episódios e tempo de grooming (autolimpeza), o tempo de permanência na zona central e nos cantos, razão central (relação entre distância percorrida no centro e distância total) e tempo de imobilidade. No final do ensaio, o número de bolos fecais também foi avaliado. Neste teste, a atividade locomotora/exploratória é indicada pela distância total percorrida e pelo número de rearings, enquanto o tempo de permanência nos cantos e o número de bolos fecais são utilizados para avaliar o grau de emocionalidade. Por fim, as respostas semelhantes à ansiedade estão ligadas ao tempo de permanência no centro e pela razão central (MCILWAIN et al., 2001).

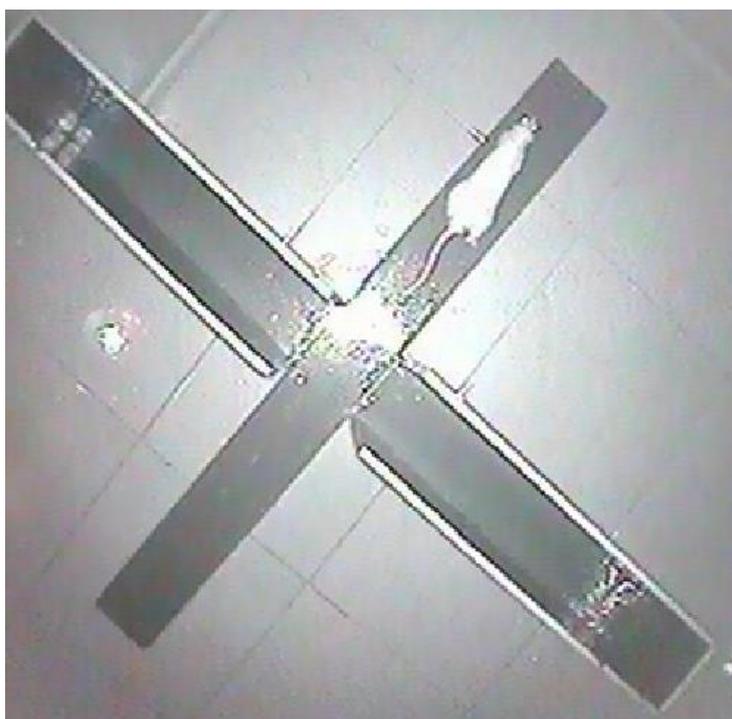
#### 5.4.4.2 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado reflete um conflito entre a preferência dos roedores por áreas protegidas e sua motivação natural de explorar novos ambientes (PELLOW et al., 1985). Dessa forma, este teste presta-se à avaliação de aspectos relacionados à ansiedade e medo (ARCHER, 1973). Além disso, durante este teste é possível avaliar aspectos que envolvem a tomada de decisão dos animais, que está diretamente

relacionado à análise de risco e, conseqüentemente, com o status de ansiedade (MIKICS et al., 2005).

O aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (50 x 10 cm) cruzados por dois braços opostos fechados com as mesmas dimensões, situados a 40 cm de altura em uma sala com luz vermelha. Os braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm), cuja estrutura é semelhante a uma cruz grega (figura 12). Desse modo, os ratos foram inseridos individualmente na plataforma central da cruz com a cabeça voltada para um dos braços fechados, sendo permitida a exploração do aparato por 5 minutos.

Durante este período, parâmetros relacionados ao comportamento semelhante à ansiedade tais como: o tempo cumulativo e a frequência de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados. No entanto, é importante frisar que somente era contabilizado como entrada aquela tentativa em que os animais posicionavam todas as patas em um dos quatro braços. Após a avaliação dos parâmetros anteriores, a porcentagem de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência na plataforma central foram calculados. Além disso, a atividade exploratória e o comportamento de tomada de decisão foram avaliados, respectivamente, pelos seguintes parâmetros: número de imersões de cabeça (head-dipping), movimentos verticais (rearing) e número de extensões das patas posteriores (SAP).



**Figura 12.** Teste do labirinto em cruz elevado

#### **5.4.4.3 Natação forçada**

Este teste baseia-se na observação de que os roedores após a execução inicial de movimentos orientados de escape desenvolvem uma postura imóvel quando colocado numa situação estressante inevitável (PORSOLT et al., 1977). Neste teste, os ratos foram introduzidos individualmente em um cilindro de polipropileno de 25 cm de diâmetro contendo água a 25°C a uma profundidade de 50 cm (figura 13). Dessa maneira, os animais eram incapazes de escapar ou tocar no fundo do cilindro. Para

reconhecimento e adaptação do teste, vinte e quatro horas antes, os ratos foram submetidos a sessões de treinamento por 30 minutos. Já no dia seguinte, os mesmos animais foram submetidos ao teste válido da natação forçada por 5 minutos. Durante esse período, foram contabilizados os seguintes parâmetros: o tempo de imobilidade, a latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de escalada. Sabe-se que a imobilidade pressupõe uma baixa capacidade de resiliência e, por conseguinte, um elevado status de comportamento semelhante à depressão (PORSOLT et al., 1979).



**Figura 13.** Natação forçada (MENCALHA, 2008).

#### **5.4.4.4 Teste de reconhecimento de objetos**

A tarefa de reconhecimento de objetos é um teste comportamental utilizado para avaliação indireta de memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido (ENNACEUR E DELACOUR, 1988).

Para este propósito, foi utilizada uma caixa plástica (60 cm x 45 cm x 45 cm) como contexto para execução desse protocolo experimental. Dessa forma, cada animal foi habituado no aparato na ausência dos objetos e outros estímulos comportamentais durante 10 minutos, por 3 dias consecutivos. No dia seguinte ao término do período de habituação, os animais foram submetidos a uma sessão de treino para aquisição de memória. Desse modo, dois objetos negros (A1 e A2), idênticos e feitos de porcelana foram colocados nos vértices do aparato usado para o teste. Cada animal era colocado individualmente no centro da arena, sendo contabilizado o tempo de exploração dos objetos familiares por 5 minutos. Após 3 horas de intervalo, os animais foram reexpostos ao contexto para realização do teste de reconhecimento de objetos. Nessa etapa usada para avaliação da capacidade de retenção de informações, foram usados um objeto familiar (A3) e um objeto novo (B), também de porcelana, mas de cor branca e com maiores dimensões. Assim como na sessão de treino, o teste de retenção também

durou 5 minutos.



**Figura 14.** Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos

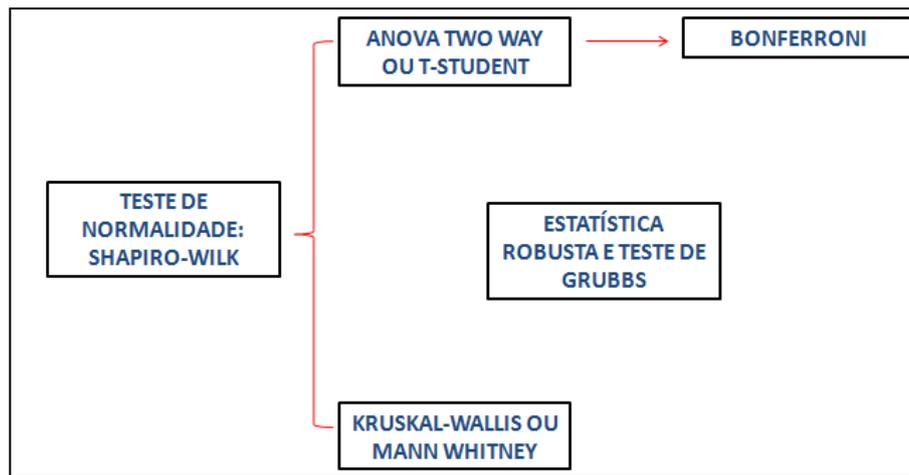
Vale ressaltar que entre cada animal testado, a arena e os objetos eram devidamente higienizados com álcool 10 e 70 %, respectivamente, a fim de anular qualquer tipo pista olfatória. Ademais, o ato de exploração dos objetos só era considerado quando os animais colocavam o focinho a uma distância de até 2 cm em direção aos objetos. Qualquer outro tipo de contato físico, como se apoiar ou subir nos objetos, não foi considerado como ato exploratório. Por fim, o tempo de exploração de cada objeto foi registrado, sendo utilizados para o cálculo dos índices de discriminação absoluto (d1) e relativos (d2 e d3). O d1 representa a diferença absoluta entre a exploração entre o objeto familiar e o objeto novo. Já o d2 é uma medida relativa da discriminação absoluta corrigida pela exploração total dos objetos (e), enquanto o d3 está relacionado à exploração percentual do objeto novo. Para fins didáticos, a tabela 2 demonstra resumidamente como esses índices são calculados.

**Tabela 2.** Fórmulas usadas na avaliação da tarefa de reconhecimento de objetos.

Exploração	Discriminação
$e = A3 + B$	$d1 = B - A3$
	$d2 = d1/e$
	$d3 = B/e$

#### 5.4.5 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram apresentados em valores de média  $\pm$  erro padrão. A suposição da distribuição normal dos dados foi avaliada com o teste Shapiro-Wilk. Dessa forma, se os dados passassem no teste de normalidade, comparações paramétricas seriam realizadas. Neste caso, para grupos submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação, os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Já para comparação entre dois grupos com um único fator de variação, utilizou-se o teste T student. Não obstante, foi usado a estatística robusta e o teste de Grubbs para detecção de valores aberrantes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de  $p < 0,05$ . Vale destacar que o software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

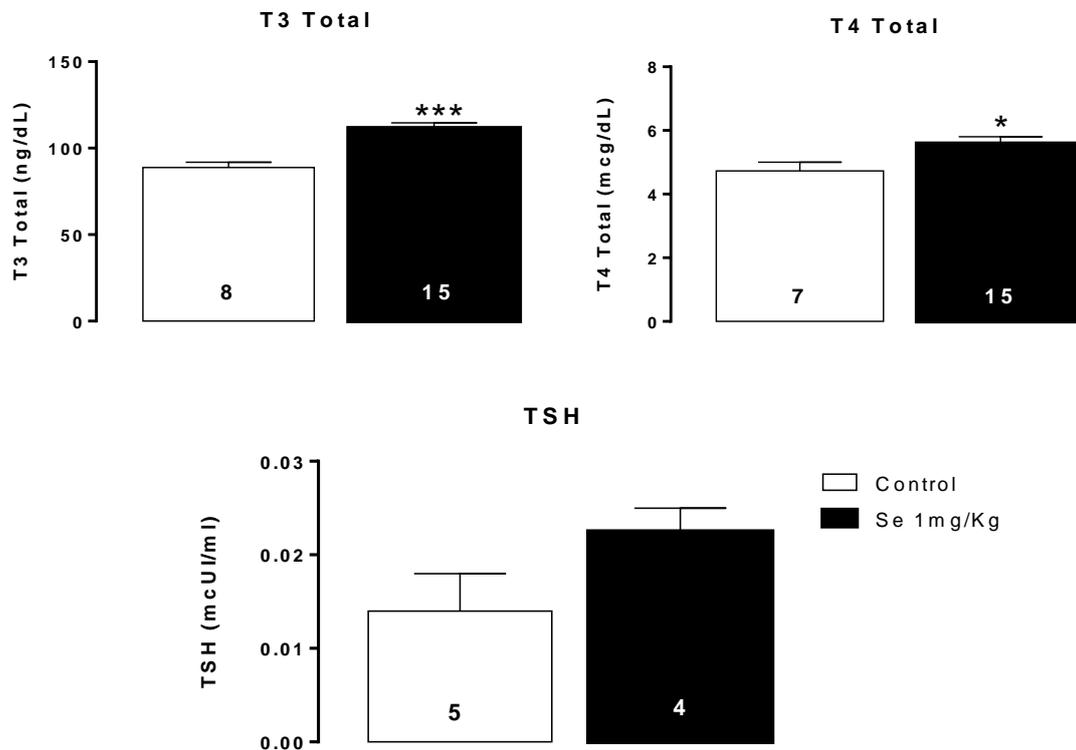


**Figura 15.** Representação esquemática dos procedimentos estatísticos adotados

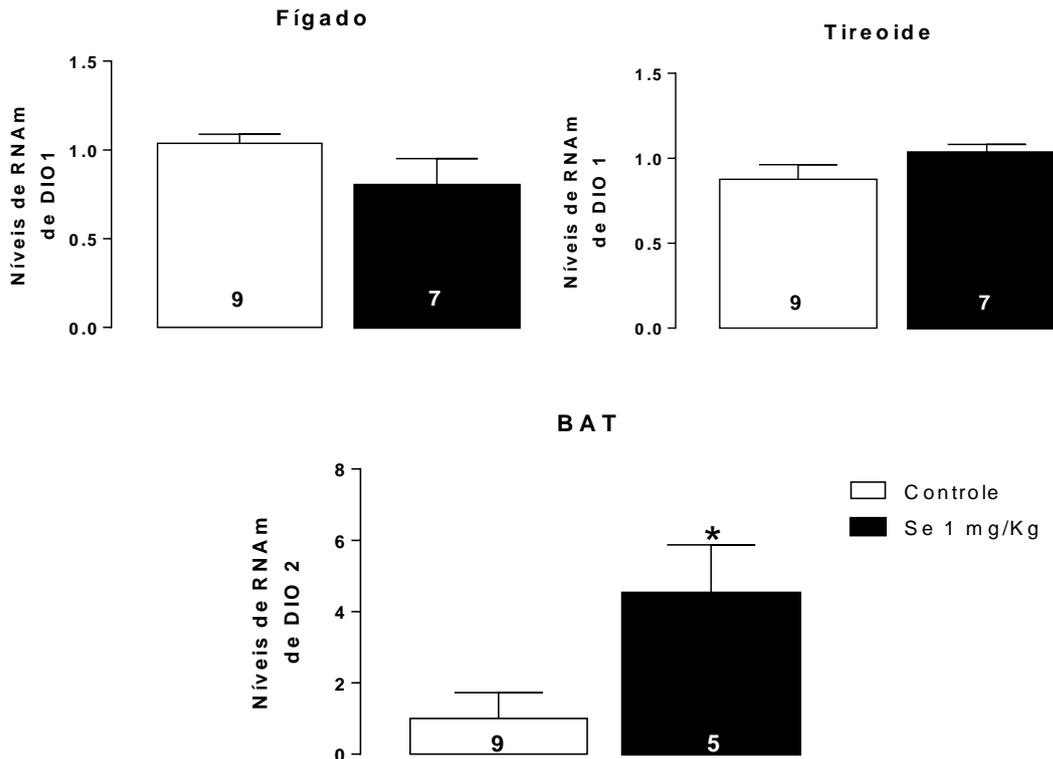
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Avaliação da função tireoidiana

De acordo com os resultados, a suplementação durante a prenhez e lactação com selenito de sódio na dose de 1mg/Kg alterou significativamente os níveis séricos de T3 total ( $111,5 \pm 3,05$  vs.  $88,88 \pm 3,04$ ;  $p=0,0001$ ) e de T4 total ( $5,58 \pm 0,21$  vs.  $4,72 \pm 0,24$ ;  $p=0,02$ ) em prole de ratas tratadas (figura 16). Ademais, o tratamento também promoveu uma diferença significativa da expressão do RNAm para DIO 2 no BAT ( $4,51 \pm 1,35$  vs.  $1,000 \pm 0,72$ ,  $p=0,02$ ). No entanto, não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de TSH nem na expressão de DIO 1 no fígado e tireoide (figura 17).



**Figura 16.** Avaliação da função tireoidiana em prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. \* representa  $p<0,05$  e \*\*\*,  $p<0,001$ , quando comparados ao grupo controle.

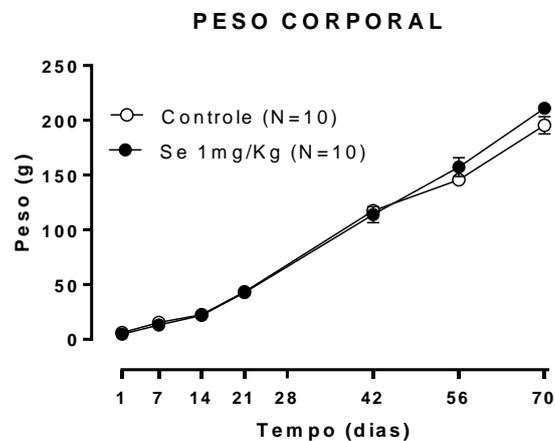


**Figura 17.** Avaliação da expressão de DIOs na tireoide, fígado e tecido adiposo marrom (BAT) em prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. \* representa  $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle.

## 6.2 Avaliação do metabolismo energético

### 6.2.1 Peso Corporal

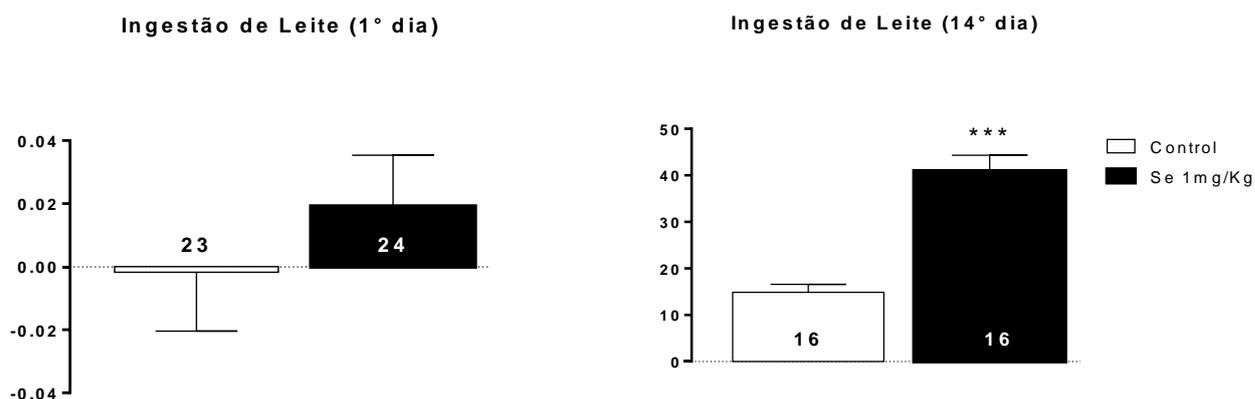
Foi realizada a análise estatística pelo método ANOVA de duas vias. Desse modo, verificou-se que não há diferenças entre os grupos experimentais no que se refere à evolução do peso corporal (figura 18).



**Figura 18.** Avaliação do peso corporal em prole ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.

## 6.2.2 Avaliação neonatal da ingestão de leite

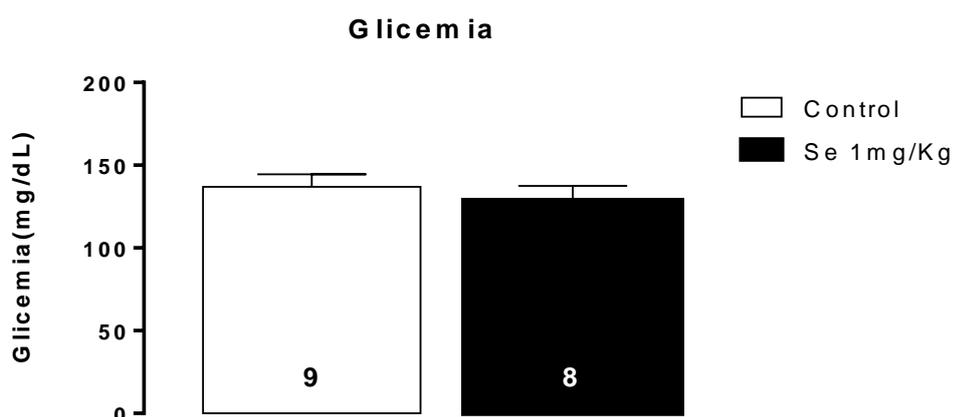
Nota-se que o tratamento com selenito de sódio promove uma alteração no perfil de ingestão de leite (figura 19). No primeiro dia pós-natal, houve uma tendência em aumentar a ingestão de leite ( $p=0,06$ ). Já no décimo quarto dia pós-natal, a diferença entre os grupos torna-se estatisticamente distinta, sendo a ingestão de leite dos indivíduos do grupo tratado claramente mais elevada ( $40,94 \pm 3,39$  vs.  $14,88 \pm 1,73$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 19.** Avaliação do perfil de ingestão prole de 1 e 14 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.\*\*\*,  $p < 0,001$ , quando comparados ao grupo controle.

## 6.2.3 Glicemia

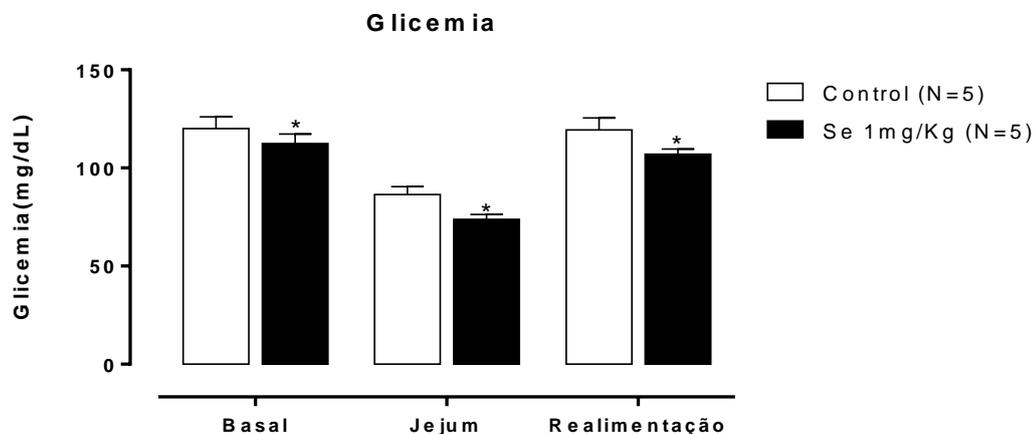
Em relação à avaliação glicêmica após o período de desmame, foi verificado que não houve diferenças significativas entre os grupos (figura 20).



**Figura 20.** Avaliação da glicemia em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.

Mas, ao completar 60 dias de idade, os animais foram novamente submetidos à avaliação da glicemia, porém em diferentes condições (basal, jejum e realimentação).

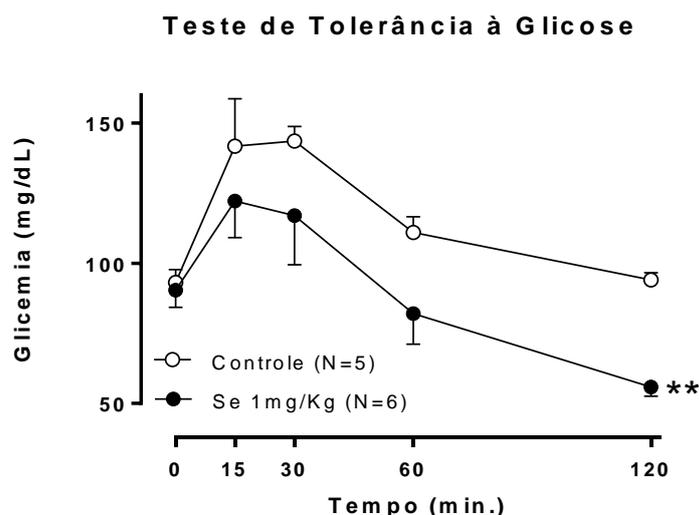
De acordo com a análise estatística pelo método do ANOVA de duas vias com médias repetidas, verificou-se um efeito ligeiramente significativo do tratamento [ $F(1, 8)= 5,71$ ;  $p= 0,04$ ] e um resultado fortemente significativo da condição experimental [ $F(2, 16)= 49,42$ ;  $p<0,0001$ ].



**Figura 21.** Avaliação da glicemia em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.

#### 6.2.4 Teste de tolerância à glicose

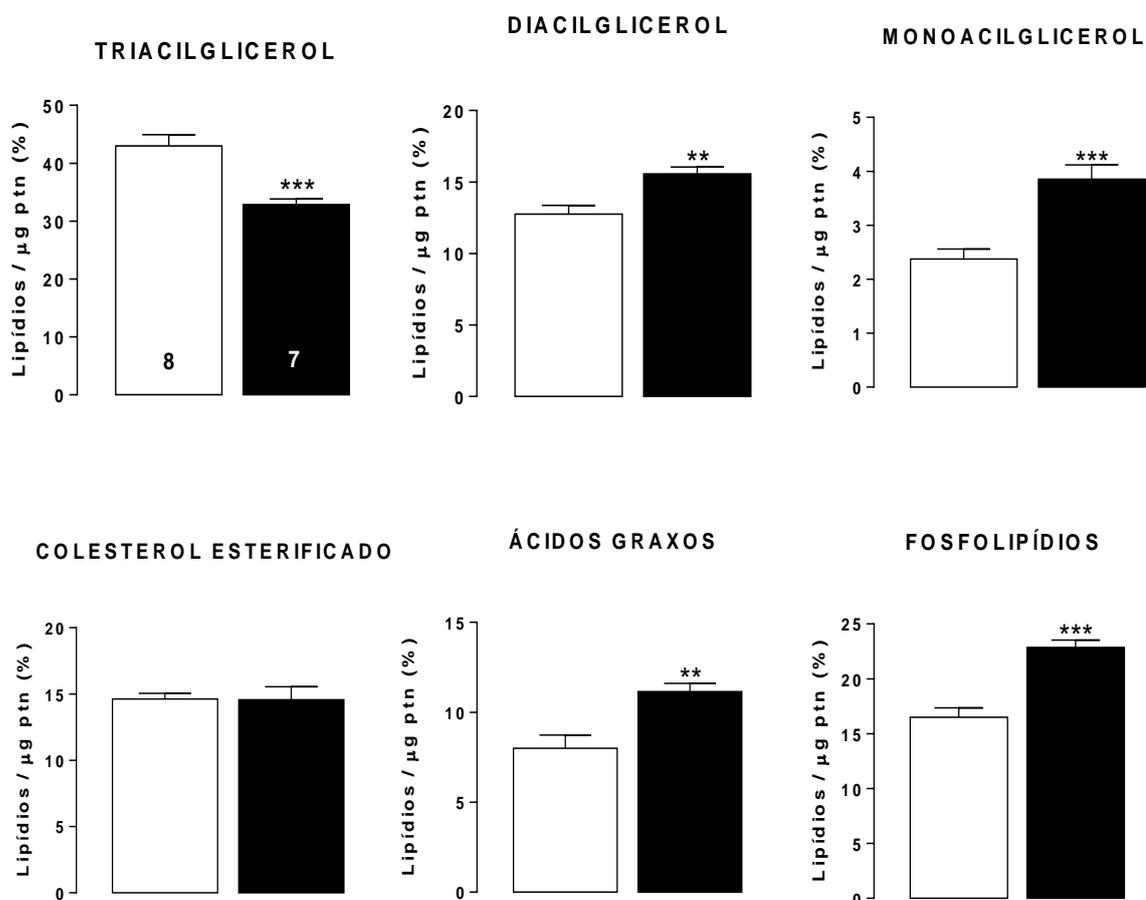
Com 24 DPN, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose a fim de verificar possíveis distúrbios glicêmicos, como diabetes e hipoglicemia. De acordo com a análise estatística realizada pelo método do ANOVA de duas vias com médias repetidas, verificou-se um efeito fortemente significativo do tratamento [ $F(1, 40)= 13,42$ ;  $p= 0,004$ ] e da condição experimental [ $F(4, 40)= 12,38$ ;  $p<0,0001$ ]. Entretanto, a interação entre as variáveis experimentais não é significativa (figura 22).



**Figura 22.** Teste de tolerância à glicose em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. \* representa  $p<0,05$ , quando comparados ao grupo controle.

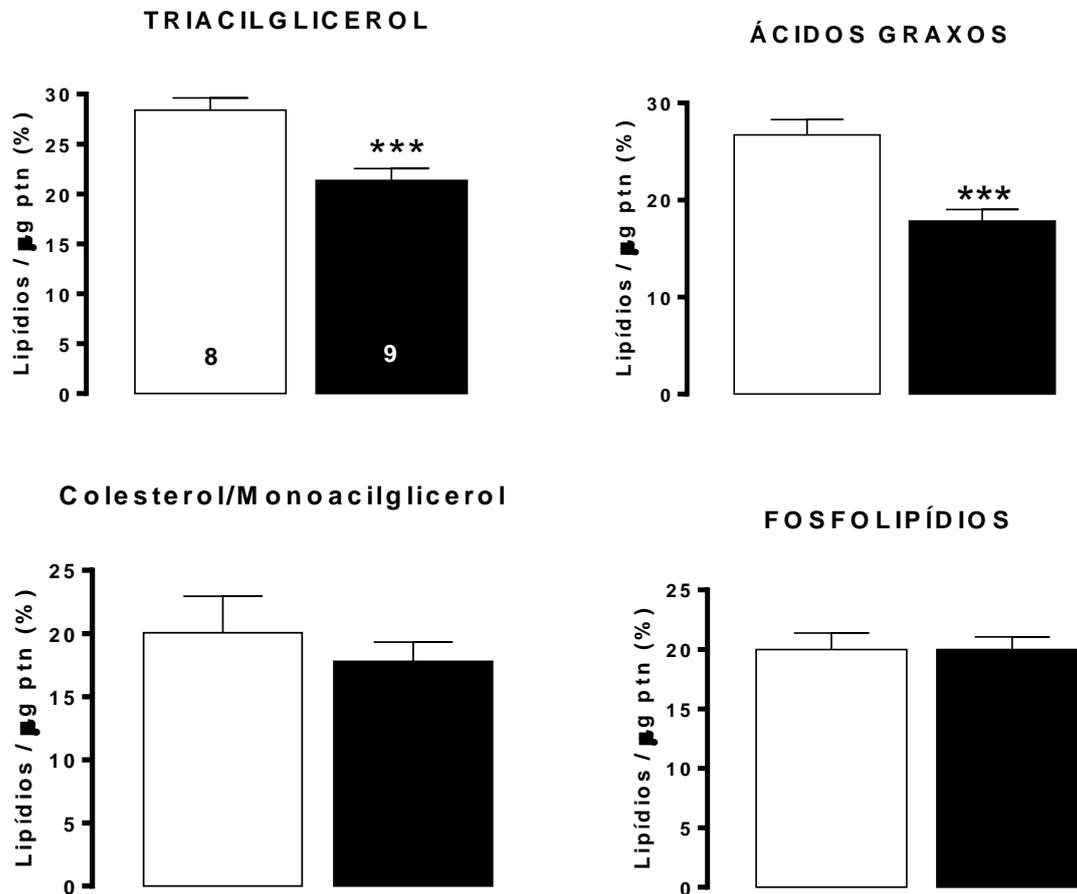
## 6.2.5 Metabolismo Lipídico

Nesse protocolo, também verificamos que o tratamento com selenito de sódio promoveu um aumento do metabolismo lipídico hepático. De acordo com os resultados, verifica-se que o tratamento com selenito de sódio proporcionou maior degradação de triglicerídeos ( $32,86 \pm 0,96$  vs.  $43,00 \pm 1,95$ ,  $p=0,0007$ ). Por conseguinte, também houve aumento dos níveis de monoacilglicerol ( $3,85 \pm 0,26$  vs.  $2,37 \pm 0,18$ ;  $p< 0,0004$ ) e de diacilglicerol ( $15,57 \pm 0,48$  vs  $12,75 \pm 0,61$ ;  $p= 0,0038$ ). Também foi verificado aumento das taxas de ácidos graxos totais ( $11,14 \pm 0,45$  vs.  $8,00 \pm 0,731$ ,  $p< 0,0038$ ) e de fosfolipídios ( $22,86 \pm 0,67$  vs.  $16,50 \pm 0,86$ ;  $p< 0,0001$ ). No entanto, não houve diferença estatística no conteúdo total de colesterol, comparand0-se o grupo controle com o grupo tratado (figura 23).



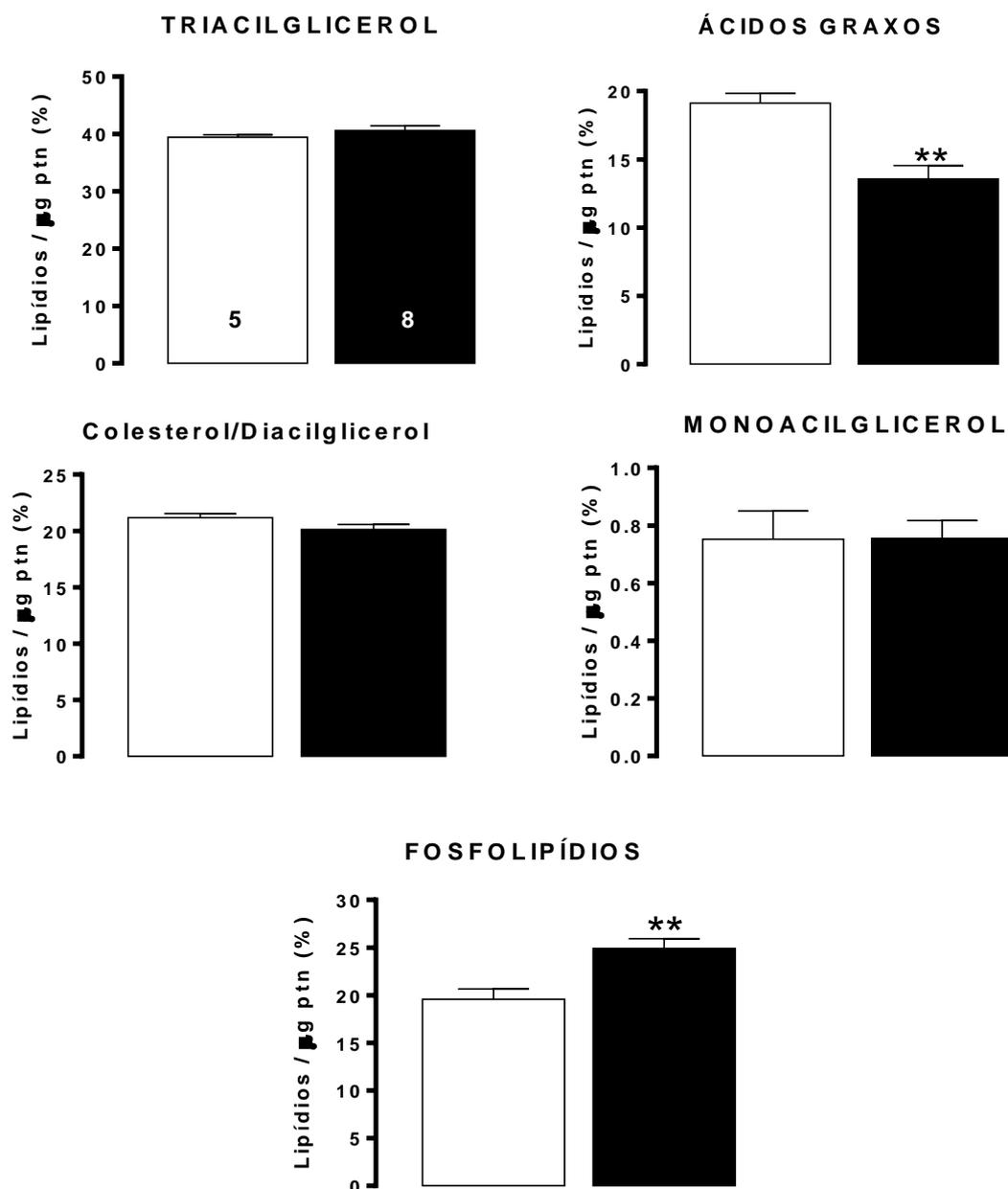
**Figura 23.** Avaliação do metabolismo hepático de lipídios em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. \*\* representa  $p<0,01$ ; \*\*\* representa  $p<0,001$ , quando comparados ao grupo controle.

Adicionalmente, foi verificado que a suplementação materna com selênio promove uma significativa redução dos níveis de triacilglicerol ( $21,37 \pm 1,19$  vs.  $28,42 \pm 1,19$ ;  $p= 0,0008$ ) e do conteúdo de ácidos graxos ( $17,84 \pm 1,17$  vs.  $26,71 \pm 1,57$ ;  $p= 0,0005$ ) no tecido adiposo. No entanto, diferentemente do que foi observado no tecido hepático, não houve diferenças significativas nos níveis de monoacilglicerol, colesterol e fosfolipídios (figura 24).



**Figura 24.** Avaliação do metabolismo de lipídios em tecido adiposo subcutâneo de prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. \*\*\* representa  $p < 0,001$ , quando comparados ao grupo controle.

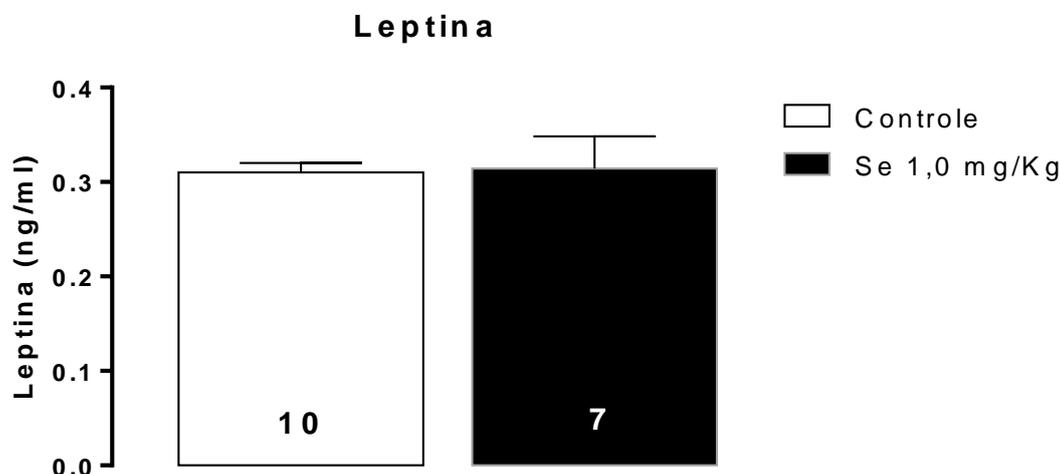
Já no BAT, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de triacilglicerol. Da mesma forma, as taxas de colesterol, diacilglicerol e monoacilglicerol não foram estatisticamente distintas entre os grupos experimentais (figura 25). No entanto, assim como demonstrado no tecido adiposo, houve uma significativa redução dos níveis de ácidos graxos no grupo tratado com selenito de sódio ( $13,57 \pm 0,98$  vs.  $19,12 \pm 0,72$ ;  $p = 0,002$ ). Adicionalmente, a suplementação materna com selenito de sódio também promoveu um acréscimo significativo dos níveis de fosfolipídios ( $24,92 \pm 1,00$  vs.  $19,59 \pm 1,08$ ;  $p = 0,005$ ).



**Figura 25.** Avaliação do metabolismo de lipídios em BAT de prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. \*\* representa  $p < 0,01$ , quando comparados ao grupo controle.

### 6.2.6 Dosagem de leptina

Mesmo com alterações bioquímicas significativas no metabolismo lipídico no tecido adiposo, não foi observado alteração na biodisponibilidade sérica de leptina (figura 26).

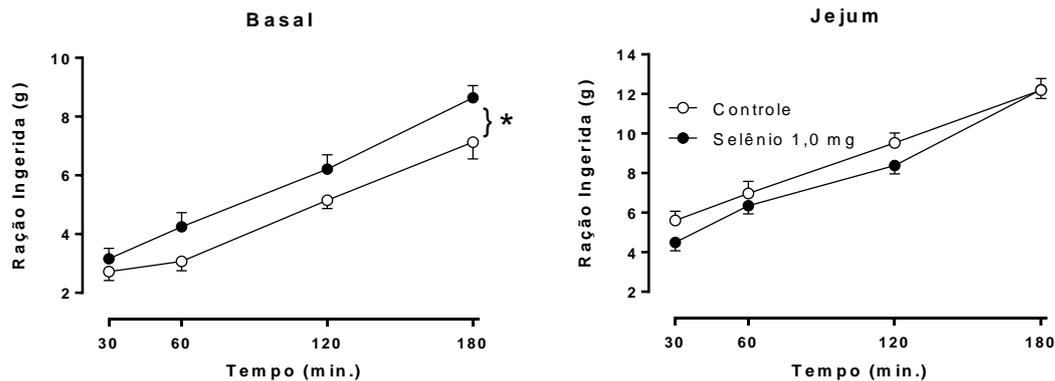


**Figura 26.** Avaliação dos níveis séricos de leptina em prole de 21 DPN oriunda de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%.

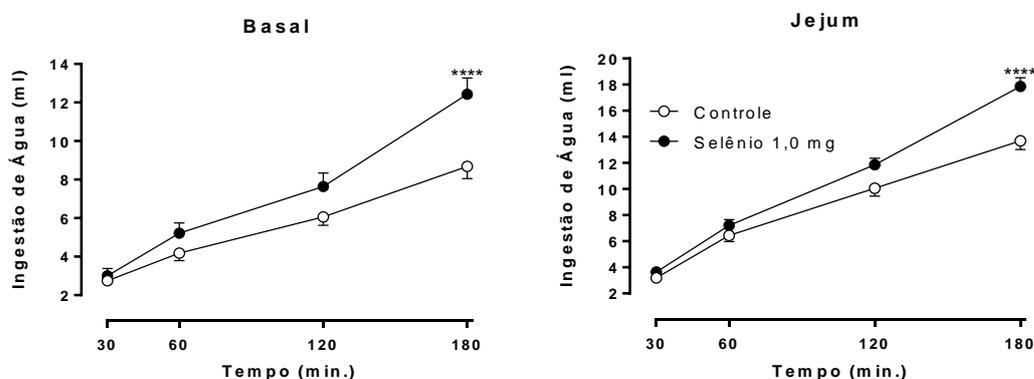
### 6.2.7 Avaliação do comportamento ingestivo na vida adulta

Nesse protocolo, foi demonstrado que o tratamento com selenito de sódio durante o período de prenhez e lactação aumentou significativamente a ingestão de ração em condições basais, mas não em paradigma experimental de jejum (figura 27). Utilizando o teste do ANOVA de duas vias com médias repetidas, verificou-se um efeito estatisticamente significativo do tratamento [ $F(1, 13) = 4,89$ ;  $p = 0,045$ ] e do tempo [ $F(3, 39) = 124,10$ ;  $p < 0,0001$ ], embora não houvesse diferença estatística na interação entre as variáveis experimentais.

Quanto à ingestão, foi caracterizado que os animais do grupo oriundo de matrizes suplementadas com selenito de sódio apresentaram maior ingestão de água tanto em condições basais quanto ao serem submetidos a jejum alimentar (figura 28). De acordo com a análise estatística pelo método do ANOVA de duas vias com médias repetidas, em condições basais, verificou-se um efeito expressivo do tratamento [ $F(1, 13) = 6,09$ ;  $p = 0,02$ ], do tempo [ $F(3, 39) = 240,26$ ;  $p < 0,0001$ ] e da interação entre as variáveis experimentais [ $F(3, 39) = 12,35$ ;  $p < 0,0001$ ]. Já em condição de jejum, também foi verificado um efeito significativo do tratamento [ $F(1, 13) = 8,21$ ;  $p = 0,01$ ], do tempo [ $F(3, 39) = 694,94$ ;  $p < 0,0001$ ] e da interação entre as variáveis experimentais [ $F(3, 39) = 17,23$ ;  $p < 0,0001$ ].



**Figura 27.** Avaliação da ingestão de ração em condições basais e ao serem submetidos a jejum alimentar em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 80 DPN durante 180 minutos.\* representa  $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle.

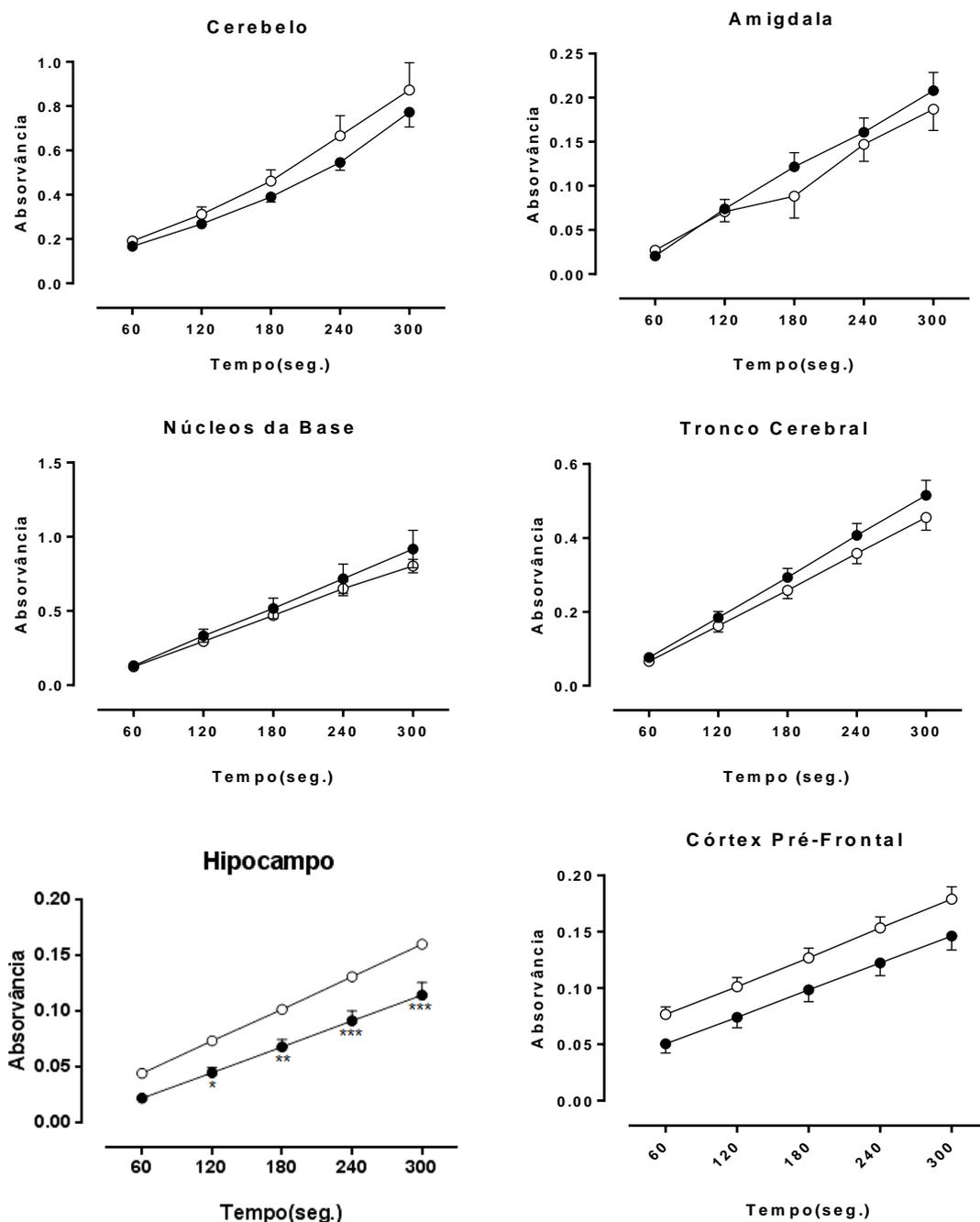


**Figura 28.** Avaliação da ingestão de água em condições basais e ao serem submetidos a jejum alimentar em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 80 DPN durante 180 minutos.\*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ , quando comparados ao grupo controle.

### 6.3 Avaliação neuroquímica indireta

#### 6.3.1 Atividade da colinesterase

Nesse protocolo, foi demonstrado que o tratamento com selenito de sódio durante o período de prenhez e lactação reduziu a atividade da AChE apenas no hipocampo (figura 29). Utilizando o teste do ANOVA de duas vias com médias repetidas, verificou-se um efeito estatisticamente significativo do tratamento [ $F(1, 40) = 18,18$ ;  $p = 0,0017$ ], do tempo [ $F(4, 40) = 279,17$ ;  $p < 0,0001$ ] e da interação entre as variáveis experimentais [ $F(4, 40) = 3,47$ ;  $p = 0,01$ ].

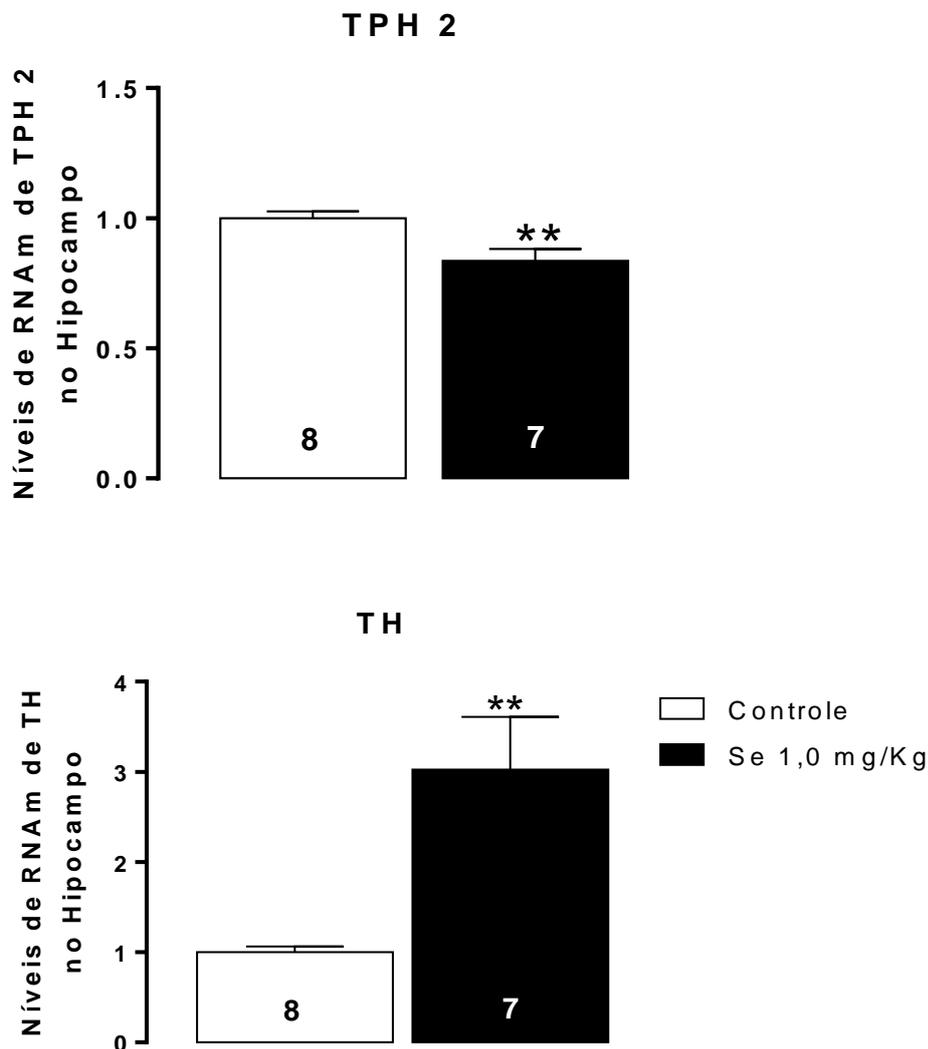


**Figura 29.** Avaliação da atividade da AChE em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio. Protocolo realizado com 60 dias pós-natal durante 300 segundos. \* representa  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , quando comparados ao grupo controle.

### 6.3.2 Expressão das enzimas TH e TPH2

Ainda de acordo com os resultados obtidos, foi verificado na figura 30, além de uma redução significativa da atividade da colinesterase hipocampal, uma redução estatisticamente significativa da expressão de TPH2 nessa mesma estrutura límbica ( $1,00 \pm 0,02$  vs.  $0,83 \pm 0,04$ ;  $p = 0,007$ ). No entanto, em relação à TH, foi observado um aumento fortemente significativo da expressão dessa enzima no hipocampo de animais

provenientes de matrizes tratadas com selenito de sódio ( $3,02 \pm 0,58$  vs.  $1,00 \pm 0,06$ ;  $p = 0,002$ )



**Figura 30.** Avaliação da expressão de TPH2 e TH em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%; \*\*,  $p < 0,01$ .

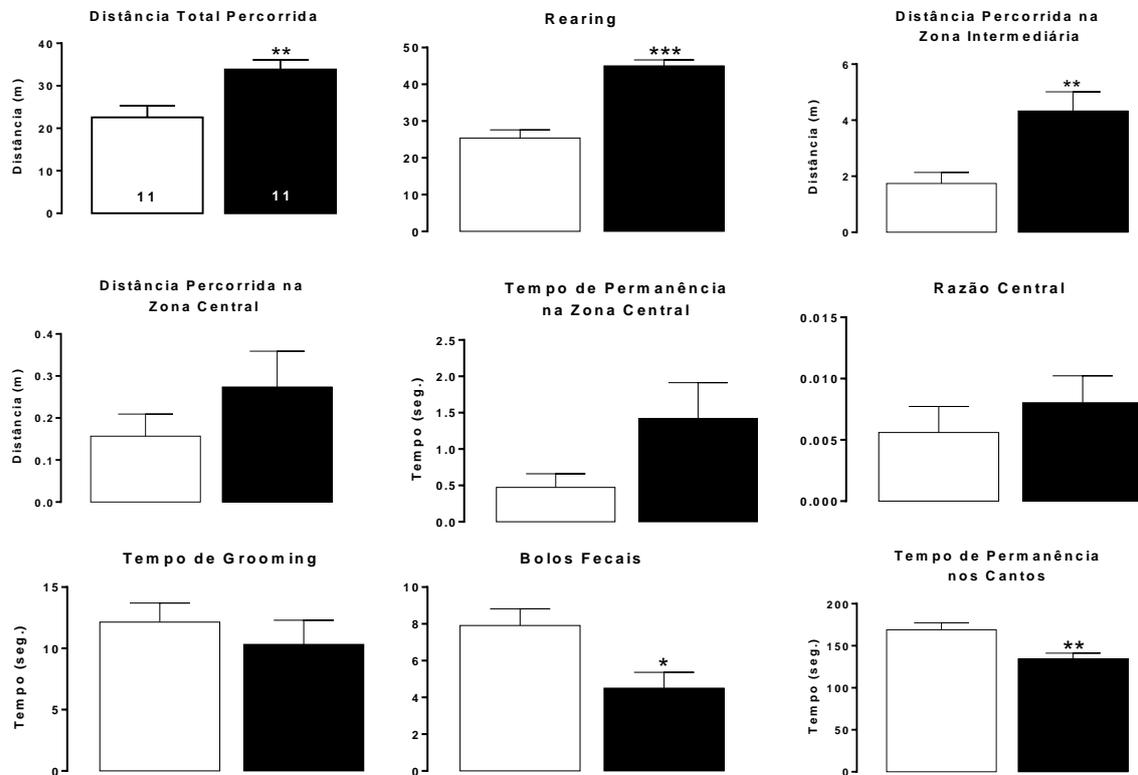
## 6.4 Avaliação psicobiológica durante a vida adulta

### 6.4.1 Teste do campo aberto

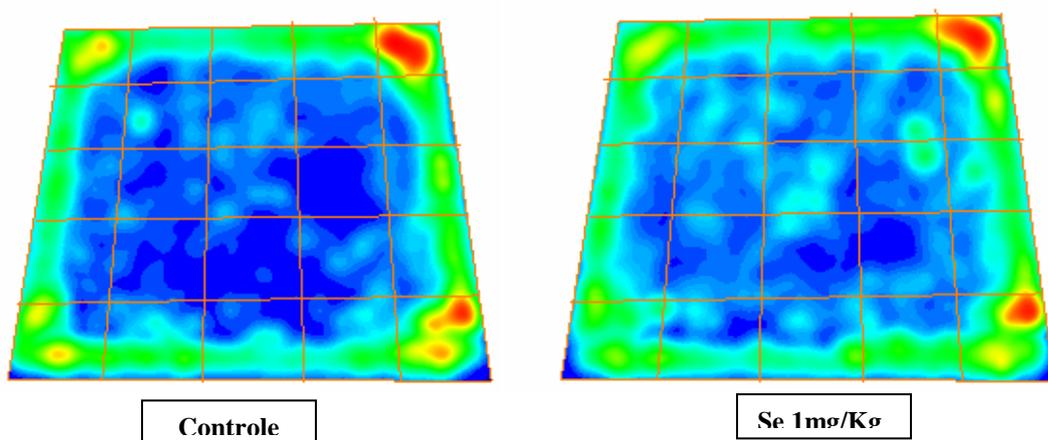
Nesse protocolo, pode-se ressaltar que a possível programação com selenito de sódio alterou o perfil de exploração e de emocionalidade dos indivíduos quando comparados ao grupo controle (figura 31). O grupo tratado teve maior distância percorrida durante a avaliação ( $33,85 \pm 2,26$  vs.  $22,56 \pm 2,76$ ,  $p=0,0049$ ) e maior número de “rearings” ( $45,00 \pm 1,63$  vs.  $25,42 \pm 2,19$ ,  $p < 0,0001$ ). Por outro lado, o grupo tratado obteve maior distância percorrida na zona intermediária do campo aberto ( $4,328 \pm 0,68$  vs.  $1,743 \pm 0,39$ ,  $p+0,003$ ). Quanto aos parâmetros relacionados à ansiedade, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. No entanto, nos parâmetros relacionados à emocionalidade, foi demonstrado que os animais tratados apresentam

menor tempo de permanência nos cantos ( $134,2 \pm 7,47$  vs.  $169,0 \pm 8,29$ ,  $p=0,005$ ) e menor número de bolos fecais ( $4,50 \pm 0,86$  vs.  $7,90 \pm 0,90$ ).

Na figura 32, é demonstrado o padrão de ocupação média do grupo tratado com selenito de sódio em relação ao grupo controle nesse protocolo.



**Figura 31.** Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do campo aberto em prole de ratos Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 60 dias pós-natal durante 300 segundos. \* representa  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$  e \*\*\*,  $p<0,001$ , quando comparados ao grupo controle.

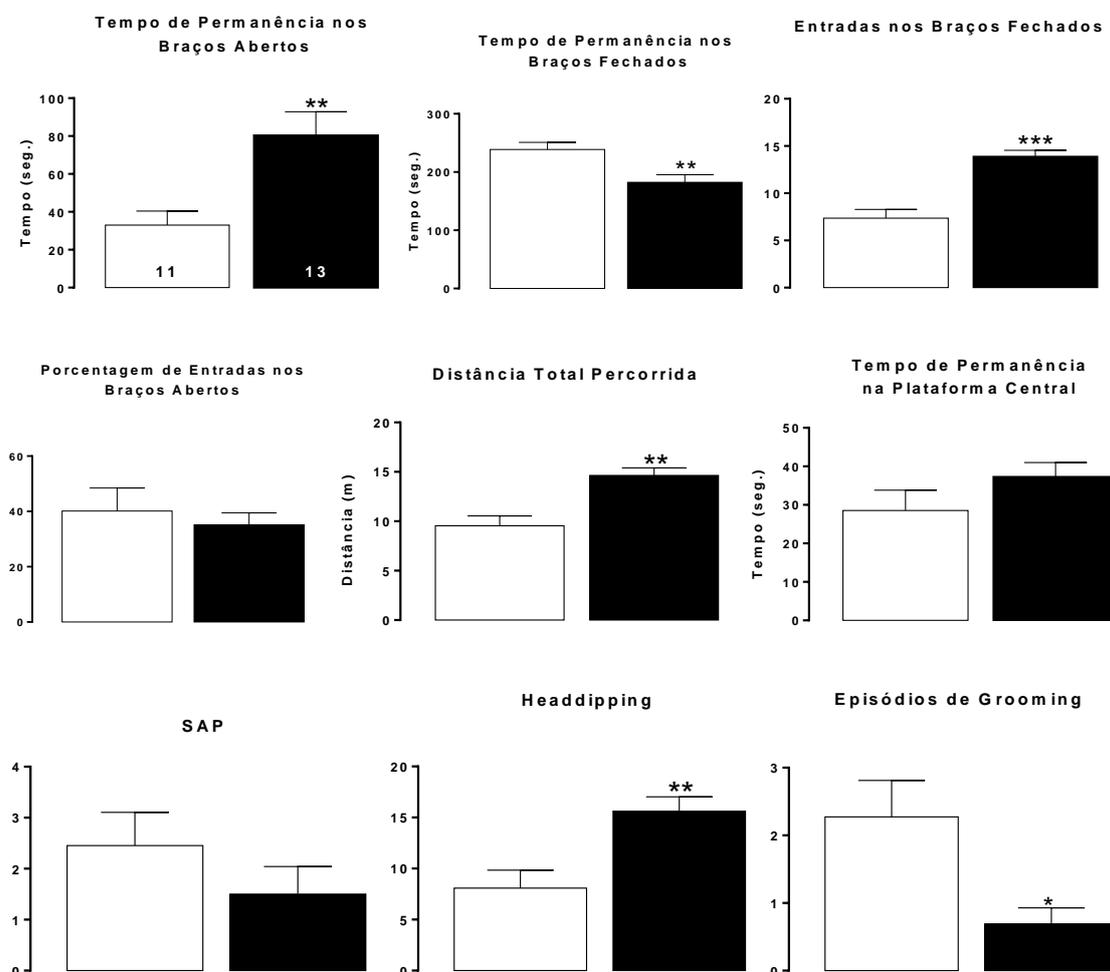


**Figura 32.** Gráfico de ocupação média dos grupos experimentais no teste do campo aberto. Cores quentes expressam maior ocupação, enquanto cores frias, menor ocupação.

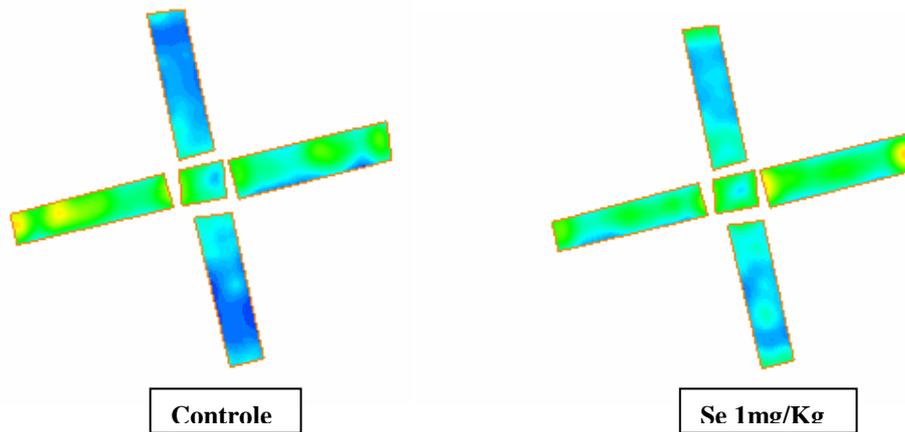
## 6.4.2 Labirinto em cruz elevado

Foi observado que a prole de fêmeas submetidas ao tratamento crônico com selenito de sódio teve uma clara redução do comportamento semelhante à ansiedade (figura 33). De acordo com os resultados, houve um aumento do tempo de permanência nos braços abertos ( $80,30 \pm 12,51$  vs.  $33,00 \pm 7,39$ ;  $p=0,005$ ) e redução do tempo de permanência nos braços fechados ( $182,30 \pm 13,00$  vs.  $238,81 \pm 13,00$ ;  $p=0,004$ ). Não houve diferença na porcentagem de entrada nos braços abertos. Ademais, os animais do grupo tratado também apresentaram maior atividade locomotora nesse protocolo demonstrada através do maior número de entradas nos braços fechados ( $13,92 \pm 0,61$  vs.  $7,36 \pm 0,91$ ;  $p<0,0001$ ) e pela distância total percorrida propriamente dita ( $14,64 \pm 0,75$  vs.  $9,55 \pm 0,99$ ;  $p = 0,001$ ). Por fim, os animais tratados também tiveram maior número de episódios de headdipping ( $15,61 \pm 1,40$  vs.  $8,09 \pm 1,75$ ;  $p = 0,002$ ) e menor número de grooming ( $0,69 \pm 0,23$  vs.  $2,27 \pm 0,54$ ;  $p = 0,01$ ).

Na figura 34, é demonstrado o padrão de ocupação média do grupo tratado com selenito de sódio em relação ao grupo controle nesse protocolo.



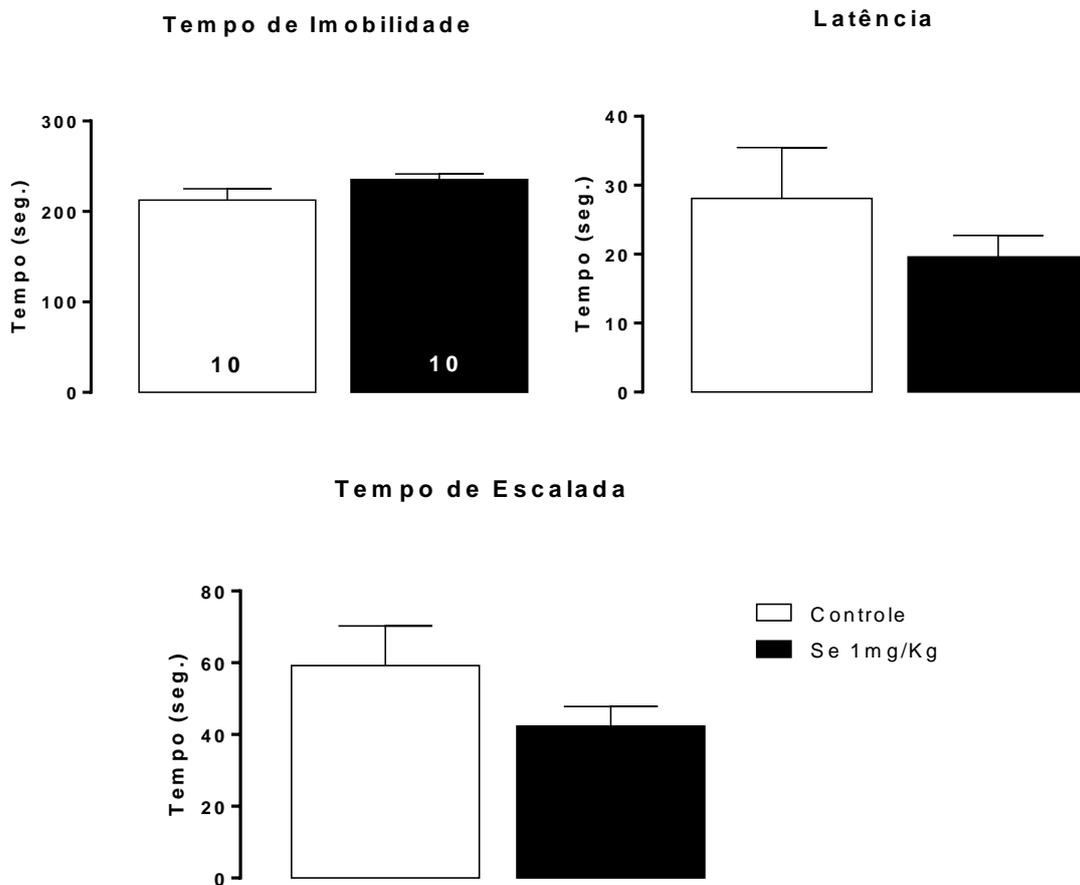
**Figura 33.** Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 60 DPN durante 300 segundos. \* representa  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$  e \*\*\*  $p<0,001$ , quando comparados ao grupo controle.



**Figura 34.** Gráfico de ocupação média dos grupos experimentais no teste do labirinto em cruz elevado. Cores quentes expressam maior ocupação, enquanto cores frias, menor ocupação.

### 6.4.3 Teste do Nado Forçado

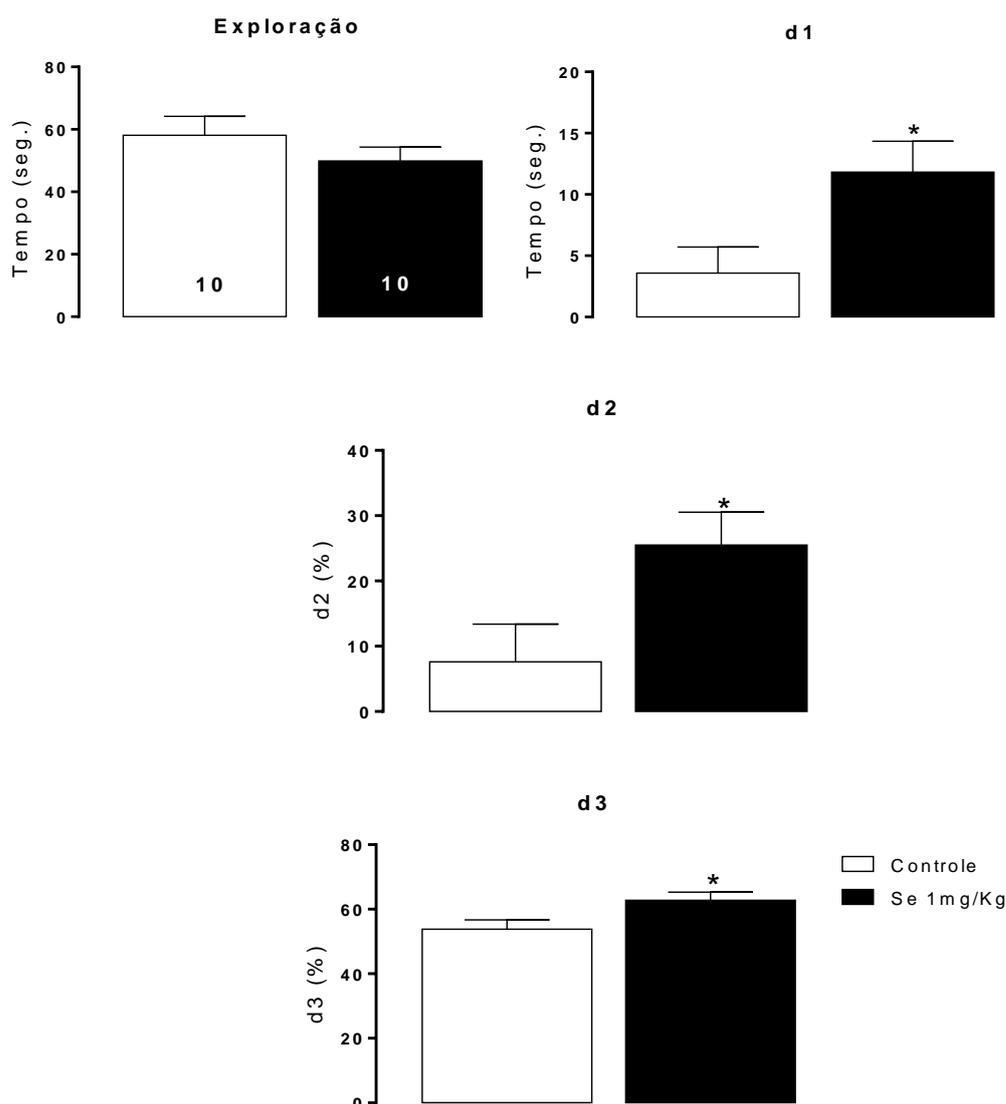
Neste teste clássico de avaliação de comportamento semelhante à depressão, não foi demonstrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (figura 35).



**Figura 35.** Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste da natação forçada em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 60 DPN durante 300 segundos.

#### 6.4.4 Tarefa de reconhecimento de objetos

Em concordância com os dados obtidos, foi demonstrado que a suplementação materna com selenito de sódio altera parâmetros relacionados à cognição e aprendizagem dos animais na tarefa de reconhecimento de objetos (figura 36). Dessa forma, os animais do grupo tratado apresentou maior preferência pelos objetos novos do que pelos familiares, indicando, assim, uma maior capacidade mnemônica. Foi observado que os animais tratados apresentaram um aumento estatisticamente expressivo no d1 ( $11,82 \pm 2,53$  vs.  $3,58 \pm 2,15$ ;  $p = 0,02$ ), no d2 ( $25,48 \pm 5,06$  vs.  $7,61 \pm 5,78$ ;  $p = 0,03$ ) e no d3 ( $62,74 \pm 2,53$  vs.  $53,81 \pm 2,53$ ;  $p = 0,03$ ). No entanto, não houve diferença significativa quanto à exploração total dos objetos.



**Figura 36.** Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos em prole de ratas Wistar tratadas durante a prenhez e lactação com selenito de sódio ou salina 0,9%. Protocolo realizado com 60 DPN durante 300 segundos. . \* representa  $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Avaliação da função tireoidiana

A glândula tireoide contém mais selênio por grama de peso do que qualquer outro órgão. Dessa forma, assim como o iodo, o selênio desempenha um papel crucial na homeostase dos hormônios tireoidianos (DICKSON & TOMLINSON, 1967). Além de agir como um importante agente antioxidante, esse micronutriente exerce um papel crucial na regulação da síntese de T3 através das enzimas desiodases (SCHOMBURG, 2011).

De fato, muitos estudos demonstraram relação entre a suplementação com Se e a concentração plasmática de hormônios tireoidianos em seres humanos, em diferentes faixas etárias, principalmente em idosos, que frequentemente apresentam alimentação desbalanceada e deficiente em uma gama de nutrientes (KÖHRLE, 2005). Nesse contexto, dois trabalhos relatam uma forte associação entre dieta deficiente em Se e alterações plasmáticas dos hormônios tireoidianos em idosos, tipicamente relacionada à redução da produção de T3 pela DIO 1 e, por conseguinte, por uma alta razão dos níveis de T4/T3 (LASSEN & HØRDER, 1994; OLIVIERI et al., 1995). Alterações semelhantes ocorrem em pacientes fenilcetonúricos (CALOMME et al., 1995) ou com fibrose cística (KAUF et al., 1994), sendo que em todos esses casos, os parâmetros hormonais foram normalizados mediante a suplementação com Se.

Em roedores, os efeitos da deficiência de Se no metabolismo tireoidiano são relativamente modestos e parecem estar restritos a poucos tecidos (ARTHUR et al., 1990; CHANOINE et al., 1992). Os efeitos mais notáveis incluem uma marcante redução na atividade da DIO 1 hepática e renal em cerca de 90 %, além de aumento significativo dos níveis séricos de T4 (BECKETT et al., 1989). No entanto, não são verificadas diferenças significativas nas taxas de T3, TSH e na atividade da DIO 1 na tireoide (CHANOINE et al., 1993; MEINHOLD et al., 1993). A atividade de DIO 2 no cérebro desses animais se encontra reduzida, porém este efeito é principalmente atribuído às ações genômicas da T4 do que pela deficiência de Se propriamente dita (LEONARD et al., 1984; ST. GERMAIN, 1989; CHANOINE et al., 1992). Desse modo, todos esses achados sugerem fortemente que a tireoide e o cérebro apresentam mecanismos para conservação dos níveis de Se (BUCKMAN et al., 1993; VADHANAVIKIT & GANTHER, 1993).

Já as respostas típicas à suplementação com Se em doses não tóxicas em roedores são um aumento dos níveis de T3 e redução das taxas de T4, rT3 e TSH. Estas alterações são também usualmente interpretadas como resultado de uma maior atividade da DIO 1 hepática, bem como por uma maior produção de hormônios tireoidianos (KÖHRLE, 2005).

Desse modo, embora nossos resultados não indiquem diferenças significativas na expressão de DIO 1 no fígado e na tireoide, a suplementação com selenito de sódio durante os períodos críticos de prenhez e lactação é capaz de alterar a expressão da DIO 2 no BAT da prole. Essa enzima é considerada a principal conversora de T4 em T3 devido sua elevada afinidade por seu substrato ( $K_m \sim 2nM$  de T4 vs.  $1\mu M$  de t4 para a DIO 1). Fisiologicamente, a DIO 2 é fundamental na regulação dos níveis intracelulares de T3. No entanto, em humanos saudáveis, essa enzima também pode promover uma importante regulação desse hormônio no plasma, sendo responsável por cerca de 70% da produção extratireoidea de T3 (BIANCO et al., 2002). Dentre inúmeras funções, a DIO 2 desenvolve um papel crítico na embriogênese cerebral, na secreção de TSH na

hipófise e no desacoplamento mitocondrial no tecido adiposo marrom (ST GERMAIN & GALTON, 1997).

A importância do Se no metabolismo tireoidiano e especialmente para a atividade adequada da DIO 2 pode ser facilmente compreendida ao se analisar clinicamente seres humanos que apresentam mutações para o gene que expressa SBP 2 (DUMITRESCU et al., 2005). Tais indivíduos apresentam fenótipo semelhantes ao de camundongos com deleção do gene responsável pela expressão de DIO 2 (SCHNEIDER et al., 2001). De uma maneira geral, há uma elevação nos níveis de T4, TSH e rT3 associados a redução das taxas séricas de T3, Se, GPX e Sepp 1 (KÖHRLE, 2005).

Assim, de acordo com os dados obtidos, sugerimos que a diferença estatística observada entre os grupos experimentais no tocante aos níveis de T4 pode estar relacionada com um possível aumento do aporte materno desse mesmo hormônio à prole. Por conseguinte, essa alteração associada ao aumento da expressão da DIO 2 no BAT podem facilmente explicar o acréscimo na biodisponibilidade de T3 em prole de fêmeas suplementadas com selenito de sódio. Adicionalmente, apesar das diferenças destacadas anteriormente, não verificamos mudanças significativas nos níveis séricos de TSH. Tais valores podem ser considerados até mesmo inconclusivos haja vista o número baixo de indivíduos usados nesse protocolo experimental e à baixa sensibilidade do método escolhido para determinação desse hormônio hipofisário.

## **7.2 Avaliação do metabolismo energético**

Como previamente pontuado, as propriedades anti-diabetogênicas e insulino-miméticas do Se tem sido muito destacadas. Todavia, estudos epidemiológicos recentes demonstraram que a suplementação com diferentes fontes de Se pode ser um importante fator de risco para a incidência de síndromes metabólicas, como o diabetes (STEINBRENNER et al., 2011). A razão da existência de resultados tão antagônicos na literatura reside em importantes diferenças metodológicas empregadas nos estudos, tais como: o modelo experimental usado, o tempo de tratamento e, sobretudo, o composto a base Se utilizado para suplementação.

Partindo desse pressuposto, foi realizada a avaliação da glicemia e o teste de tolerância à glicose em prole de fêmeas suplementadas com selenito de sódio. Diferentemente de muitos trabalhos que indicam que o Se apresenta ações diabetogênicas, foi verificado que a suplementação com este elemento traço não causou alteração na glicemia em condições basais. Pelo contrário, o grupo tratado com Se apresentou maior eficiência homeostática no teste de tolerância à glicose, restabelecendo muito mais rapidamente a glicemia após este desafio. Já na fase adulta, este parâmetro bioquímico foi reavaliado e notamos que os animais tratados apresentaram índices glicêmicos ligeiramente inferiores ao grupo controle em diferentes circunstâncias metabólicas. Assim, devido aos efeitos hipoglicemiantes aqui descritos sugerimos que o Se aumenta a sensibilidade à insulina, reforçando a ideia de que este micronutriente pode apresentar ações insulino-miméticas.

A fim de reforçar essa proposta, sabe-se que camundongos que superexpressam a enzima GPx1 possuem maior densidade de células  $\beta$  e hipertrofia das ilhotas pancreáticas, possibilitando uma produção mais pronunciada de insulina quando comparados ao grupo controle. Todavia, ao atingirem a fase adulta, esses animais desenvolvem hiperinsulinemia, resistência insulínica e obesidade (MCCLUNG et al., 2004). Esse perfil metabólico é decorrente de mecanismos epigenéticos que favorecem

o aumento da expressão do RNAm para PDX, que é um fator de transcrição associado com a diferenciação e maturação das células  $\beta$  (WANG et al., 2008). Desse modo, acreditamos que a suplementação com selenito de sódio pode promover um significativo aumento da biodisponibilidade GPx1. Por conseguinte, uma maior atividade dessa enzima antioxidante poderia causar uma programação metabólica relacionada com a síntese de insulina, sendo esse processo possivelmente mediado pelo fator de transcrição PDX 1. Nesse contexto, essa resposta proporcionaria efeitos benéficos associados aos mecanismos que regulam a homeostase glicêmica.

Nossos resultados também indicam que a prole de fêmeas suplementadas com Se apresentam maior demanda metabólica por substratos lipídicos. No fígado e no tecido adiposo, foi observado um claro aumento da mobilização de triglicerídeos. Tais dados associados à redução das taxas de ácidos graxos no tecido adiposo e no BAT indicam que a programação com Se modula positivamente vias bioquímicas relacionadas com a lipólise e oxidação de ácidos graxos. Curiosamente, também foi observado diferença significativa na concentração de fosfolipídios. Dessa maneira, acreditamos que esta alteração seja causada por uma maior atividade da GPx 4, que é responsável pela degradação de hidroperóxidos de fosfolipídios. Entretanto, é importante salientar que não foi encontrada diferença nos níveis de leptina.

Estes resultados corroboram com dados presentes na literatura, nos quais há fortes indicativos de que a suplementação com Se apresenta efeitos terapêuticos na redução dos níveis de triglicerídeos em ratos submetidos à dieta hipercalórica (KAUR & BENSAL, 2009). Semelhantemente, em modelo animal de indução de diabetes pela administração de estreptozotocina, o tratamento com Se também reduz os níveis de colesterol, triglicerídeos e HDL (ROY et al., 2011). Além disso, em linhagem de ratos obesos OLETF, a suplementação com Se induziu a expressão de genes envolvidos com o processo de  $\beta$ -oxidação no tecido adiposo. Conseqüentemente, foi observado mais uma vez redução dos níveis de triglicerídeos, colesterol, LDL, assim como inibição da hipertrofia adipocitária e do acúmulo de tecido adiposo abdominal (KIM et al., 2012).

Nesse contexto, conjecturamos que os efeitos metabólicos aqui descritos podem estar relacionados com o aumento significativo dos níveis de T3 e T4, assim como pela maior atividade da DIO 2 no BAT.

Sabe-se que os hormônios tireoidianos regulam positivamente a homeostase metabólica, apresentando inúmeros efeitos, principalmente observados em indivíduos com hipertireoidismo, dentre os quais se destacam: aumento da gliconeogênese hepática (BRATUSCH-MARRAIN, 1983), da lipogênese e da lipólise no tecido adiposo (OPPENHEIMER et al., 1991; BLENNEMANN et al., 1992), bem como acréscimo da expressão do RNAm para GLUT 4 no músculo esquelético (TORRANCE et al., 1997). Os hormônios tireoidianos também são capazes de aumentar a expressão e fosforilação da AMPK e da enzima acetil-CoA carboxilase nos músculos esqueléticos, porém reduz os níveis de malonil-CoA (VETTOR, 2005). Curiosamente, a administração central de T3 em concentrações nanomolares promove ações não genômicas que culminam na ativação da via PI3 cinase/AKT, que também participa da cascata de sinalização da insulina (HIROI et al., 2006).

Diante de tais efeitos no metabolismo energético, não é surpreendente que os hormônios tireoidianos também afetem a sensibilidade sistêmica à insulina e a tolerância à glicose. Desse modo, ao realizar uma avaliação metabólica mais detalhada após o teste de tolerância à glicose, foi verificado que pacientes com hipertireoidismo apresentam: hiperinsulinemia após administração de glicose, aumento da produção hepática basal de glicose e, mesmo após a administração de insulina, produção hepática de glicose não é suprimida (SHEN et al., 1988). Outros estudos também demonstram

hiperinsulinemia mesmo em condições de jejum em pacientes com hipertireoidismo (DOAR et al., 1969). De forma semelhante, pacientes saudáveis tratados com T3 por quatorze dias, culminando em níveis plasmáticos deste hormônio semelhantes à de indivíduos com tireotoxicose espontânea, apresentaram aumento da produção e da depuração de insulina (DIMITRIADIS et al., 1985). Portanto, estes dados sugerem que os hormônios tireoidianos em determinadas concentrações podem induzir resistência insulínica em longo prazo.

Por outro lado, é importante ressaltar o papel da DIO 2 na regulação dos níveis intracelulares de T3 e, por conseguinte, no controle da homeostase metabólica. Neste contexto, animais com deleção do gene que expressa DIO 2 apresentam maior ganho de peso quando submetidos à dieta hipercalórica, parecem ter maior dependência de carboidratos como fonte energética, baixa capacidade de mobilização de lipídios, menor expressão de genes envolvidos com o metabolismo lipídico e maior susceptibilidade em desenvolver resistência insulínica (MARSILI et al., 2011). Já em seres humanos, polimorfismo no gene que expressa DIO 2 (Thr92Ala) está fortemente associado com a prevalência de resistência insulínica (MENTUCCIA et al., 2002; CANANI et al., 2005).

Nesse âmbito, os efeitos metabólicos da suplementação com Se através dos hormônios tireoidianos e da própria atividade da DIO 2 podem ser mediados pelo aumento da expressão de fatores de transcrição associados com o controle do metabolismo oxidativo de glicose e lipídios na mitocôndria, tais como: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , NRF1 e PGC-1 (WEITZEL et al., 2003; MCCLURE et al., 2005). Partindo desse pressuposto, essa hipótese poderia facilmente explicar o aumento da demanda energética e, por conseguinte, o maior consumo neonatal de leite e de ração na fase adulta em prole de fêmeas suplementadas com Se. Vale ressaltar que apesar das alterações metabólicas demonstradas, não foram observadas diferenças significativas na progressão do peso corporal entre os grupos experimentais.

Em relação ao significativo aumento da ingestão hídrica pelo grupo tratado tanto em condições basais quanto em jejum alimentar, acreditamos que este comportamento esteja relacionado com o desencadeamento de uma resposta osmossódio-sensível mais efetiva após a ingestão de ração. Esse mecanismo sensorial promove sede extracelular a partir de uma maior secreção de vasopressina em neurônios localizados nos núcleos hipotalâmicos paraventricular e supraóptico (MCKINLEY & JOHNSON, 2004). Contudo, inúmeros experimentos deverão ser realizados a fim de verificar o papel da programação Se na homeostase hidroeletrólítica.

Assim, o nosso trabalho é o primeiro a correlacionar as consequências metabólicas da suplementação com Se e as alterações dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos. No entanto, não descartamos a participação de outras selenoproteínas na modulação do metabolismo energético, principalmente as antioxidantes, uma vez que a síntese de formas reativas de oxigênio é fundamental para a ativação da cascata de sinalização da insulina (GOLDSTEIN et al., 2005).

### **7.3 Avaliação neuroquímica indireta**

O Se é um micronutriente essencial na manutenção das funções fisiológicas no sistema nervoso central. Baseado em estudos anteriores realizados em modelos animais e em testes clínicos, fica claro que algumas selenoproteínas, como Sepp, GPx e TrxR, possuem um papel crítico na proteção do sistema nervoso contra processos degenerativos, através do controle do status redox e da ativação de vias antioxidantes (ZHANG et al., 2010).

Desse modo, é importante ressaltar que o hipocampo é uma das estruturas encefálicas que mais expressa RNAm para TrxR e para Sepp em ratos (LIPPOLDT et al., 1995; SAIJOH et al., 1995). Semelhantemente, também há uma forte reatividade à GPx em neurônios da área CA1 hipocampal em camundongos (TREPANIER et al., 1996). Em consequência da vulnerabilidade do hipocampo aos efeitos deletérios dos radicais livres, acredita-se que a elevada expressão de selenoproteínas antioxidantes seja essencial para os processos de reparação em neurônios expostos aos danos oxidativos (PELLMAR et al., 1992).

Ademais, em um estudo similar ao nosso, foi demonstrado que prole de ratas suplementadas com Se possui concentrações significativamente maiores deste elemento no cerebelo, córtex, hipotálamo e hipocampo (BOU-RESLI et al., 2002).

Partindo de tais pressupostos, decidimos avaliar se a suplementação materna com Se é capaz de alterar determinados padrões neuroquímicos no hipocampo. Destarte, foi demonstrado que a prole oriunda de fêmeas suplementadas com Se apresenta redução da atividade da AChE, aumento significativo na expressão de TH e menores níveis de RNAm para TPH 2 no hipocampo. Conquanto, existem poucos trabalhos que expliquem a associação entre a biodisponibilidade do Se e das selenoproteínas e as alterações neuroquímicas em diferentes regiões encefálicas.

Segundo a literatura, a dieta pobre em Se causa aumento significativo da atividade da enzima TH e, conseqüentemente, da taxa de renovação de dopamina no hipocampo (CASTAÑO et al., 1995), no córtex pré-frontal (CASTAÑO et al., 1997) e na substantia nigra de ratas (CASTAÑO et al., 1993). De forma similar, os mesmos animais apresentam aumento da taxa de renovação da serotonina no córtex pré-frontal (CASTAÑO et al., 1997) e no corpo estriado (CASTAÑO et al., 1993). Ademais, nesses mesmos trabalhos, foi demonstrado que os animais submetidos à dieta deficiente de Se tinham redução significativa da atividade das enzimas glutatona redutase e GPx. Portanto, acredita-se que a baixa capacidade antioxidante de tais indivíduos poderia desencadear uma cascata de reações, que acelerariam processos degenerativos uma vez que o aumento da taxa de renovação dopaminérgica causa aumento da produção de formas reativas do oxigênio, que seriam provenientes da atividade da enzima MAO (CASTAÑO et al., 1995).

Não obstante, foi demonstrado que o pré-tratamento com Se por 7 dias reduz de maneira dose dependente os efeitos deletérios causados pela administração de 6-hidroxdopamina, sendo esta uma neurotoxina específica para neurônios catecolaminérgicos, muito utilizada para induzir modelo de Parkinson em roedores. Nesse estudo, foi comprovado que o Se previne a redução da atividade da GPx causado pela administração de 6-hidroxdopamina e aumenta a biodisponibilidade da dopamina. Acredita-se, nesse caso, que as enzimas antioxidantes podem reduzir a auto-oxidação da dopamina (ZAFAR et al., 2003).

Em relação à atividade da AChE, sabe-se que o Se inibe de maneira dose dependente a atividade desta enzima na área pré-óptica (AHMAD et al., 2005). Além disso, o tratamento com Se foi capaz de reverter o aumento da atividade da AChE em camundongos submetidos à administração central de estreptozotocina (ISHRAT et al., 2009). Usando este mesmo paradigma experimental, só que realizado em ratos, foi comprovado que a suplementação com Se aumenta a atividade da enzima colina acetiltransferase (PINTON et al., 2010). Sendo assim, acredita-se fortemente que o Se pode modular a neurotransmissão colinérgica. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda precisam ser mais bem elucidados.

Portanto, esse maior acúmulo de Se e a elevada expressão de selenoproteínas em regiões hipocampais podem explicar as alterações neuroquímicas observadas em nossos

resultados. Partindo desse princípio, conjecturamos que as selenoproteínas podem ativar vias intracelulares que modulam a dinâmica de renovação de determinados neurotransmissores e até mesmo regular diretamente a expressão gênica das enzimas chaves para este processo. Também não descartamos que essas alterações neuroquímicas possam estar relacionadas com ações genômicas causadas pelos hormônios tireoidianos. No entanto, os mecanismos envolvidos nessa programação ainda precisam ser mais bem elucidados.

#### **7.4 Avaliação psicobiológica na fase adulta**

Nossos resultados indicam que a suplementação com Se durante o período de prenhez e lactação afeta em longo prazo o comportamento da prole. Dessa maneira, animais supostamente programados com selenito de sódio apresentaram maior atividade locomotora e exploratória, assim como menor emocionalidade no teste do campo aberto e do labirinto em cruz elevado. Neste teste, também foi demonstrado que o mesmo grupo experimental teve uma clara redução do comportamento semelhante à ansiedade e menor responsividade ao estresse gerado pelo protocolo. Não obstante, foi verificado que os animais do grupo tratado com Se possuem maior capacidade cognitiva e mnemônica na tarefa de reconhecimento de objetos. Entretanto, nenhuma diferença significativa quanto ao comportamento semelhante à depressão foi observada no teste da natação forçada.

Em consonância com a literatura, apenas fêmeas oriundas de camundongos submetidos à dieta deficiente em Se por tempo prolongado exibem menor atividade locomotora, maior número de bolos fecais e menos entradas nos quadrantes centrais no teste do campo aberto (WATANABE & SATOH, 1995). Por outro lado, neste mesmo teste, camundongos suplementados com selenito de sódio na dose de 1mg/Kg apresentam um aumento significativo da atividade locomotora (BOYLAN et al., 1990). De forma semelhante, o tratamento com selenito de sódio por 7 dias na dose de 0,2 mg/Kg também aumenta atividade locomotora em ratos Wistar (AHMAD et al., 2005). Levando em consideração o aumento da atividade locomotora e exploratória também observada em nossos resultados, acreditamos que os efeitos promovidos pelo Se podem ser desencadeados pelo aumento da neurotransmissão colinérgica e dopaminérgica. Ressalta-se que a dopamina é crucial para atividade locomotora e exploratória, sendo que sua liberação e a taxa de disparo de neurônios no corpo estriado são moduladas respectivamente por fibras colinérgicas oriundos de regiões prosencefálicas e do troco cerebral (PATEL et al., 2012).

Quanto ao comportamento semelhante à ansiedade, verifica-se que o tratamento com disseleneto de difenila aumenta o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos. No entanto, esse comportamento ansiolítico foi completamente revertido pela administração de bicuculina e ritanserina, que são respectivamente antagonistas seletivos para receptores GABA A e 5HT2A (GHISLENI et al., 2008). Portanto, os efeitos ansiolíticos promovidos por este composto orgânico de Se podem ser mediados pelos sistemas gabaérgico e serotoninérgico. A administração dessa mesma droga em ratos Wistar durante o período de prenhez também promove aumento no tempo de permanência e no número de entradas nos braços abertos na prole com 28 DPN. Porém, este efeito só foi observado nas fêmeas (FAVERO et al., 2006).

Em contrapartida, mesmo com a redução da expressão do RNAm para TPH 2 no hipocampo, não verificamos diferenças significativas no teste do nado forçado. Apesar disso, muitos trabalhos descrevem ações antidepressivas promovidas por compostos orgânicos de Se. Dessa forma, foi comprovado que a administração oral de disseleneto

reduz o comportamento semelhante à depressão em ratos submetidos à modelo de dor neuropática (JESS et al., 2010). Além disso, o tratamento com difenil disseleneto promove redução do tempo de imobilidade tanto no teste da natação forçada quanto na suspensão pela cauda em camundongos. Todavia, o pré-tratamento com haloperidol, que é um antagonista para receptor D2, reverte esse efeito, o que indica os efeitos antidepressivos causados pela administração de difenil disseleneto podem ser mediados pelo sistema dopaminérgico (SARTORI-OLIVEIRA et al., 2012). Outro trabalho verificou que o disseleneto inibe a atividade da MAO e que seus efeitos antidepressivos também podem ser revertidos por drogas que interferem diretamente nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico. Assim, acredita-se que os efeitos antidepressivos promovidos por formas orgânicas de Se sejam mediadas a partir da modulação do sistema monoaminérgico central (SAVEGNAGO et al., 2007).

Em relação aos efeitos do Se na capacidade cognitiva e mnemônicas em roedores, sabe-se que a administração de selenito de sódio melhora a disfunção mnemônica causada pela exposição crônica ao chumbo (LIU et al., 2013). Ademais, resultados obtidos através da realização de diferentes paradigmas experimentais indica que a administração aguda de disseleneto atenua o déficit mnemônico causado pelo tratamento com reserpina (BORTOLATTO et al., 2013). Já a administração aguda de selenato de sódio reverte a disfunção cognitiva em camundongos submetidos a modelo experimental de Doença de Alzheimer (COROCORAN et al., 2010). Sendo assim, acreditamos fortemente que o Se pode modular a neurotransmissão colinérgica, otimizando a consolidação celular da memória e o aprendizado em estruturas septo-hipocampais.

Logo, com exceção dos efeitos antidepressivos provocados pelo Se, as demais alterações comportamentais descritas na literatura demonstram grande consonância com os resultados obtidos em nosso trabalho. Destarte, acreditamos que o perfil comportamental observado em prole de ratas suplementadas com selenito de sódio pode ser explicado por prováveis alterações neuroquímicas durante o período crítico de embriogênese do sistema nervoso central, envolvendo especialmente os sistemas monoaminérgico e colinérgico. Consequentemente, conjecturamos que esses sistemas podem modular a atividade neuronal de importantes áreas encefálicas envolvidas com o aprendizado e com a expressão de comportamentos afetivos na fase adulta.

## **7.5 Considerações finais**

É importante ressaltar a necessidade da realização de mais estudos com elevada qualidade metodológica a fim de verificar os possíveis mecanismos epigenéticos pelos quais a suplementação com Se afeta a ontogenia de diferentes sistemas fisiológicos. Destarte, pretendemos elucidar se o Se e as selenoproteínas são capazes de interferir na expressão gênica de importantes fatores de transcrição associados com a homeostase e a programação neuroendócrina e metabólica. Ademais, a determinação do padrão neuroquímico e o mapeamento citoarquitetônico em diferentes regiões encefálicas são imprescindíveis para estabelecer como a suplementação com Se afeta a expressão de comportamentos afetivos e motivacionais.

Portanto, para estabelecermos de fato se a suplementação com Se pode ser uma variável de risco à integridade homeostática de animais e seres humanos, deveremos realizar estudos mais meticulosos que envolvam os demais sistemas fisiológicos, dentre os quais destacamos aqueles relacionados com a função cardiovascular e renal.

## 8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a suplementação com selenito de sódio durante o período de prenhez e lactação afeta o desenvolvimento ontogênico da prole, proporcionando alterações:

- Na função tireoidiana, caracterizada por uma significativa hipertiroxinemia e maior produção de T3, possivelmente mediada pela atividade da DIO 2 no BAT;
- Na homeostase energética, ativando mecanismos que norteiam vias metabólicas relacionadas com a mobilização de lipídios e com o controle da glicemia;
- No apetite e na saciedade do neonato, em virtude da maior ingestão de leite;
- Na expressão de comportamentos motivados em condições basais e de jejum, indicando que as modificações causadas pela programação metabólica se perpetuam até a fase adulta;
- Na neuroquímica hipocampal, afetando a atividade e expressão de enzimas relacionadas com inúmeras funções neurais;
- Na atividade locomotora e exploratória, bem como na redução de emocionalidade no teste do campo aberto;
- Na expressão de comportamentos afetivos, refletido em um perfil ansiolítico observado no teste do labirinto em cruz elevado;
- Na capacidade cognitiva e mnemônica durante a tarefa de reconhecimento de objetos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, I. C. **Avaliação dos perfis proteico e lipídico na resposta de *Rhipicephalis microplus* à infecção com fungos**, 2011. 141f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2011.

AHMAD, A. S. et al. Sodium selenite stimulates neurobehavior and neurochemical activities in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 103, n. 1, p. 59-68, 2005.

ARTHUR, J. R.; NICOL, F.; HUTCHINSON, A. R.; BECKETT, G. J. The effects of selenium depletion and repletion on the metabolism of thyroid hormones in the rat. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 101-108, 1990.

BATES, J. M.; SPATE, V. L.; MORRIS, J. S.; GERMAIN, D. L. S.; GALTON, V. A. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2490-2500, 2000.

BAQUI, M. M; GEREKEN, B.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R.; BIANCO, A. C. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4309-4312, 2000.

BAQUI, M.; BOTERO, D.; GEREKEN, B.; CURCIO, C.; HARNEY, J. W.; SALVATORE, D.; SORIMACHI, K.; LARSEN, P. R.; BIANCO, A. C. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p.1206–1211, 2003.

BECKETT, G. J.; MACDOUGALL, D. A.; NICOL, F.; ARTHUR, R. Inhibition of type I and type II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. **Biochemistry Journal**, v. 259, p. 887-892, 1989.

BLENNEMANN, B.; MOON, Y. K.; FREAKE, H. C. Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. **Endocrinology**, v. 130, n. 2, p. 637-643, 1992.

BLEYS, J.; AVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E. Selenium and diabetes: more bad news for supplements. **Annals of Internal Medicine**, v. 147, n. 4, p. 271-272, 2007.

BLEYS, J.; Navas-Acien, A.; Stranges, S.; Menke, A.; Miller, E. R.; Guallar, E. Serum selenium and serum lipids in US adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 416-423, 2008.

BORTOLATTO, C. F. et al. Acute Treatment with Bis Selenide, an Organic Compound Containing the Trace Element Selenium, Prevents Memory Deficits Induced by Reserpine in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 151, n. 1, p. 92-99, 2013.

BOU-RESLI, M. N.; Mathew, T. C.; DASHTI, H. M.; AL-ZAID, N. S. Brain selenium accumulation in rat pups of selenium supplemented mothers. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 31, n. 4, p. 228-231, 2002.

BOYLAN, L. M.; COGAN, D.; HUFFMAN, N.; SPALLHOLZ, J. E. Behavioral characteristics in open field testing of mice fed selenium-deficient and selenium-supplemented diets. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 3, n. 2, p. 157-165, 1990.

BRATUSCH-MARRAIN, P. R. Insulin-counteracting hormones: their impact on glucose metabolism. **Diabetologia**, v. 24, n. 2, p. 74-79, 1983.

BROWN, K. M. & ARTHUR, J. R. "Selenium, selenoproteins and human health: a review." **Public Health Nutrition**, v.4, p. 593-600, 2001.

BURBANO, X. et al. Impact of a selenium chemoprevention clinical trial on hospital admissions of HIV-infected participants. **HIV clinical trials**, v. 3, n. 6, p. 483-491, 2002.

BUCKMAN, T. D.; SUTPHIN, M. S.; ECKHERT, C. D. A comparison of the effects of dietary selenium on selenoproteins expression in the rat brain and liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1163, p. 176 – 184, 1993.

BURK, R. F.; HILL, K. E. Selenoprotein P—expression, functions, and roles in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1441-1447, 2009.

BURTIS, Carl. **Tietz Fundamentos da Química Clínica**. Elsevier Editora Ltda., 2011.

BUTLER, J.A.; WHANGER, P.D. Influence of dietary methionine on the metabolism of selenomethionine in rat. **Journal of Nutrition**, v.119, p.1001-1009, 1989.

CALOMME, M. R.; VANDERPAS, J.B.; FRANCOIS, B.; VAN CAILLE-BERTRAND, M.; HERCHUELZ, A.; VANOEVERVELT, N.; VAN HOOREBEKE, C.; VANDEN BERGHE, D.A. Thyroid function parameters during a selenium repletion/depletion study in phenylketonuric subjects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 51, n. 12, p. 1208-1215, 1995.

CANANI, Luis Henrique et al. The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 6, p. 3472-3478, 2005.

CASTAÑO, A.; AYALA, A.; ANTONIO RODRÍGUEZ-GÓMEZ, J.; HERRERA, A. J.; CANO, J.; MACHADO, A. Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. **Neurochemistry International**, v. 30, n. 6, p. 549-555, 1997.

CASTAÑO, A.; AYALA, A.; RODRIGUEZ-GOMEZ, J. A.; DE LA CRUZ, C. P.; REVILLA, E.; CANO, J.; MACHADO, A. Increase in dopamine turnover and tyrosine

hydroxylase enzyme in hippocampus of rats fed on low selenium diet. **Journal of Neuroscience Research**, v. 42, n. 5, p. 684-691, 1995.

CASTAÑO, A.; CANO, J.; MACHADO, A. Low selenium diet affects monoamine turnover differentially in substantia nigra and striatum. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 4, p. 1302-1307, 1993.

CAZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de Nutrientes. Editora Manole, 2005.

CHANOINE, J. P.; SAFRAN, M.; FARWELL, A. P.; TRANTER, P.; EKENBARGER, D. M.; DUBORD, S.; ALEX, S.; ARTHUR, J. R.; BECKER, G. J.; BRAVERMAN, L. E.; LEONARD, J. L. Selenium deficiency and type II 5' deiodinase regulation in the euthyroid and hypothyroid rat: evidence of a direct effect of thyroxine. **Endocrinology**, v.130, p. 479 – 484, 1992.

CHANOINE, J.; BRAVERMAN, L. E.; FARWELL, A. P.; SAFRAN, M.; ALEX, S.; DUBORD, S.; LEONARD, J. L. The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p.2709 –2713, 1993.

CHANOINE, J.; SAFRAN, M.; FARWELL, A.P.; DUBORD, S.; ALEX, S.; STONE, S.; ARTHUR, J. R.; BRAVERMAN, L. E.; LEONARD, J. L. Effects of selenium deficiency on thyroid hormone economy in rats. **Endocrinology**, v. 131, p. 1787–1792, 1992.

CHANOINE, J.P., SAFRAN, M., FARWELL, A.P., TRANTER, P., EKENBARGER, S.M., DUBORD, S., ALEX, S. Selenium deficiency and type II 5-deiodinase regulation in the euthyroid and hypothyroid rat. **Endocrinology**, v.130, p.479–484,1992.

CHEN, J. & BERRY, M.J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n. 1, p. 1-12, 2003.

CHMURZYNSKA, A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. **Nutrition Reviews**, v.68(2), p. 87-98, 2010.

CONTEMPRE, B., DUMONT, J.E., DENEFF, J.F., MANY, M.C. Effects of selenium deficiency on thyroid necrosis, fibrosis and proliferation: a possible role in myxoedematous cretinism. **European Journal of Endocrinology**, v.133, p. 99–109, 1995.

CORCORAN, N. M. et al. Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1025-1033, 2010.

DANIELS, L.A. Selenium metabolism and bioavailability. **Biological Trace Element Research**, v.54, p.185-199, 1996.

DARRAS, V. M. & VAN HERCK, S. L. Iodothyronine deiodinase structure and function: from ascidians to humans. **Journal of Endocrinology**, v. 215, n. 2, p. 189-206, 2012.

DICKSON, R.C. & TOMLINSON, R.H. Selenium in blood and human tissues. **Clinica Chimica Acta**, v.16: 311–321, 1967.

DIMITRIADIS, G.; BAKER, B.; MARSH, H.; MANDARINO, L.; RIZZA, R.; BERGMAN, R.; GERICH, J. Effect of thyroid hormone excess on action, secretion, and metabolism of insulin in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 248, n. 5, p. 593-601, 1985.

DOAR, J. W. H.; STAMP, T. C. B.; WYNN, V.; PATH, F. C.; AUDHYA, T. K. Effects of oral and intravenous glucose loading in thyrotoxicosis: studies of plasma glucose, free fatty acid, plasma insulin and blood pyruvate levels. **Diabetes**, v. 18, n. 9, p. 633-639, 1969.

DOBZYNSKI, W.; TRAFIKOWSKA, U.; TRAFIKOWSKA, A.; PILECKI, A.; SZYMANSKI, W.; ZACHARA, B.A. Decreased selenium concentration in maternal and cord blood in preterm compared to term deliveries. **Analyst**, v.123, p: 93-97, 1998.

DUFFIELD, A. J., THOMSON, C. D.; HILL, K. E.; WILLIAMS, S. An estimation of selenium requirements for New Zealanders. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 896-903, 1999.

DUMITRESCU, A. M.; LIAO, X. H.; ABDULLAH, M. H. S.; LADO-ABEAL, J.; MAJED, F. A; MOELLER, L. C.; BORAN, G.; SCHOMBURG, L.; WEISS, R. E.; REFETOFF, S. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. **Nature Genetics**, v. 37, n. 11, p. 1247-1252, 2005.

ELEUTERIO, N. M. et al. Relationship between adiponectin and nitrite in healthy and preeclampsia pregnancies. **Clinica Chimica Acta**, 2013.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p. 88-95, 1961.

ENNACEUR, A.; CAVOY, A.; COSTA, J. C.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. II: Effects of piracetam and pramiracetam. **Behavioural Brain Research**, v. 33, n. 2, p. 197-207, 1989.

ESAKI, N.; NAKAMURA, T.; TANAKA, H.; SUZUKI, T.; MORINO, Y.; SODA, K. ENZYMIC synthesis of selenocysteine in rat liver. **Biochemistry**, v. 20, n. 15, p. 4492-4496, 1981

EWAN, R.C. Effect of selenium on rat growth, growth hormones and diet utilization. **Journal of Nutrition**, v.106, p. 702-709, 1976.

EZAKI, O. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p. 1124–1128, 1990.

FAVERO, A. M.; WEIS, S. N.; ZENI, G.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, n. 5, p. 607-616, 2006.

FRANCESCONI, K.A.; PANNIER, F. Selenium metabolites in urine: a critical overview of past work and current status. **Clinical Chemistry**, v.50, p.2240-2253, 2004.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1508-1515, 2008.

GOLDSTEIN, B.J., MAHADEV, K., WU, X. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. **Diabetes**, v.54, p. 311–321, 2005.

GROZOVSKY, Renata. **Substratos do receptor de insulina-1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) na tireóide e no fígado—estudo do dimorfismo sexual**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

HILL, K.E.; LYONS, P.R.; BURK, R.F. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.185, p. 260–263, 1992.

HILL, K.E.; ZHOU, J.; MCMAHAN, W.J.; MOTLEY, A.K.; BURK, R.F. Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of selenoprotein P gene. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p.157–161, 2004.

HIROI, Y. et al. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 38, p. 14104-14109, 2006.

HOFFMAN, D.J.; HEINZ, G.H. Embriotoxicity and teratogenic effects of selenium in the diet of mallards. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.24, p. 477-490, 1988.

HORWITZ, J.; PERLMAN, R. L. Measurement of inositol phospholipid metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. **Methods in Enzymology**, v. 141, p. 169-175, 1987.

ISHRAT, T.; PARVEEN, K.; KHAN, M. M.; KHUWAJA, G.; KHAN, M. B.; YOUSUF, S.; ISLAM, F. Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Brain Research**, v. 1281, p. 117-127, 2009.

IVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

JACOBS, M.; FORST, C. Toxicological effects of sodium selenite in Sprague-Dawley rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 8, n. 4, p. 575-585, 1981.

JESSE, C. R.; WILHELM, E. A.; NOGUEIRA, C. W. Depression-like behavior and mechanical allodynia are reduced by bis selenide treatment in mice with chronic constriction injury: a comparison with fluoxetine, amitriptyline, and bupropion. **Psychopharmacology**, v. 212, n. 4, p. 513-522, 2010.

KAUF, E.; DAWCZYNSKI, H.; JAHREIS, G.; JANITZKY, E.; WINNEFELD, K. Sodium selenite therapy and thyroid-hormone status in cystic fibrosis and congenital hypothyroidism. **Biological Trace Element Research**, v. 40, n. 3, p. 247-253, 1994.

KAUR, H. D. & BANSAL, M.P. Studies on HDL associated enzymes under experimental hypercholesterolemia: possible modulation on selenium supplementation. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p. 55, 2009.

KIM, J. E.; CHOI, S. I.; LEE, H. R.; HWANG, I. S.; LEE, Y. J.; AN, B. S.; HWANG, D. Y. Selenium significantly inhibits adipocyte hypertrophy and abdominal fat accumulation in OLEFT rats via induction of fatty acid  $\beta$ -oxidation. **Biological Trace Element Research**, v. 150, n. 1-3, p. 360-370, 2012.

KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L. et al. Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer. **Biological Trace Element Research**, v. 73, n. 2, p. 97-111, 2000.

KÖHRLE, J. Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. **Thyroid**, v. 15, n. 8, p. 841-853, 2005.

KÖHRLE, J., JAKOB, F., CONTEMPRE, B. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. **Endocrine Reviews**, v. 26(7), p.944-984, 2005.

KREHL, W.A. Selenium: The Maddening Mineral. **Nutrition Today**, v.5(4), p. 26-32, 1932.

KUEHNELT, D.; JURESA, D.; KIENZL, N.; FRANCESCONI, K. A. Marked individual variability in the levels of trimethylselenonium ion in human urine determined by HPLC/ICPMS and HPLC/vapor generation/ICPMS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 7, p. 2207-2212, 2006.

KYRIAKOPOULOS, A.; ROTHLEIN, D.; PFEIFER, H.; BERTELSMANN, H.; KAPPLER, S.; BEHNE, D. Detection of small selenium-containing proteins in tissues of the rat. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 14, p. 179-183, 2000.

LANE, H.W., STRENGTH, R., JOHNSON, J., WHITE, M. Effect of chemical form of selenium on tissue glutathione peroxidase activity in developing rats. **Journal of Nutrition**, v.121 (1), p. 80-86, 1991.

LASSEN, K. & HØRDER, M. Selenium status and the effect of organic and inorganic selenium supplementation in a group of elderly people in Denmark. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 54, n. 8, p. 585-590, 1994.

LEI X.G., CHENG W.H., MCCLUNG J.P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p:41-61, 2007.

LEONARD, J. L.; SILVA, J. E.; KAPLAN, M. M.; MELLEN, S. A.; VISSER, T. J.; LARSEN, P. R. Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'-deiodinases by thyroid hormone. **Endocrinology**, v.114, p. 998–1004, 1984.

LIPPOLDT, A.; PADILLA, C. A.; GERST, H.; ANDBJER, B.; RICHTER, E.; HOLMGREN, A.; FUXE, K. Localization of thioredoxin in the rat brain and functional implications. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 6747-6756, 1995.

LIU, M. et al. The Effect of Sodium Selenite on Lead Induced Cognitive Dysfunction. **Neurotoxicology**, 2013.

LOH, K.; DENG, H.; FUKUSHIMA, A.; CAI, X.; BOIVIN, B.; GALIC, S.; TIGANIS, T. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 4, p. 260-272, 2009.

MACHADO, D. S.; SABET, A.; SANTIAGO, L. A.; SIDHAYE, A. R.; CHIAMOLERA, M. I.; ORTIGA-CARVALHO, T. M.; WONDISFORD, F. E. A thyroid hormone receptor mutation that dissociates thyroid hormone regulation of gene expression in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 23, p. 9441-9446, 2009.

MACHADO, J. S. R. **Quantificação dos níveis de adiponectina e leptina em mulheres com pré eclampsia**. 2009. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia. Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto, 2009.

MAHADEV, K., MOTOSHIMA, H., WU, X. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction. **Molecular and Cellular Biology**, v.24, p. 1844–1854, 2004.

MAHADEV, K., ZILBERING, A., ZHU, L., GOLDSTEIN, B.J. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits proteintyrosine phosphatase 1B in vivo and enhances the early insulin action cascade. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p. 21938–21942, 2001.

MARSILI, A. et al. Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. 208-232, 2011.

MCCLUNG, J.P., RONEKER, C.A., MU, W. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101: 8852–8857, 2004.

MCCLURE, T. D. et al. Thyroid hormone interacts with PPAR $\alpha$  and PGC-1 during mitochondrial maturation in sheep heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 5, p. H2258-H2264, 2005.

MCCONNELL, K. P. & ROTH, D. M. Respiratory excretion of selenium. In: **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)**. Royal Society of Medicine, v.123 (3), p. 919-921, 1966.

MCCONNELL, K. P. & Hoffman, J.L. Methionine-selenomethionine parallels in rat liver polypeptide chain synthesis. **FEBS letters**, v. 24, n. 1, p. 60, 1972.

MCILWAIN, K. L.; MERRIWEATHER, M. Y.; YUVA-PAYLOR, L. A.; PAYLOR, R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2004.

MEHTA, A.; REBSCH, C. M.; KINZY, S. A.; FLETCHER, J. E.; COPELAND, P. R. Efficiency of mammalian selenocysteine incorporation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37852-37859, 2004.

MEINHOLD, H.; CAMPOS-BARROS, A.; WALZOG, B.; KOHLER, R.; MULLER, F.; BEHNE, D. Effects of selenium and iodine deficiency on type I, type II, and type III iodothyronine deiodinases and circulating thyroid hormones in the rat. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 101, p. 87-93, 1993.

MELLOR, J.W. Química Inorgânica Moderna. Editora Globo, 3<sup>a</sup> edição, p: 919-920, 1955.

MENCALHA, R. **Depleção cerebral de serotonina durante o período neonatal programa a homeostase metabólica energética e a expressão comportamental de ratos adultos**. 2008. 81p Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

MENTUCCIA, D.; PROIETTI-PANNUNZI, L.; TANNER, K.; BACCI, V.; POLLIN, T. I.; POEHLMAN, E. T.; CELI, F. S. Association Between a Novel Variant of the Human Type 2 Deiodinase Gene Thr92Ala and Insulin Resistance Evidence of Interaction With the Trp64Arg Variant of the  $\beta$ -3-Adrenergic Receptor. **Diabetes**, v. 51, n. 3, p. 880-883, 2002.

MIKICS, E; BARSY, B; BARSVÁRI, B; HALLER, J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones & Behavior**, v. 48, n. 2, p. 152-62, 2005.

MUELLER, A.S., PALLAUF, J. Compendium of the antidiabetic effects of supranutritional selenate doses. In vivo and in vitro investigations with type II diabetic db/db mice. **Journal of Nutritional Biochemistry** V.17 : 548–560, 2006.

MUELLER, A.S., PALLAUF, J., RAFAEL, J. The chemical form of selenium affects insulinomimetic properties of the trace element: investigations in type II diabetic db/db mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p. 637–647, 2003.

NAVARRO-ALARCON M. & CABRERA-VIQUE C. Selenium in food and the human body: a review. **Science of the Total Environment**, v.400: 115-141, 2008.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Science of the Total Environment**, v.249, p. 347-371, 2000.

OLIVIERI, O.; GIRELLI, D.; AZZINI, M.; STANZIAL, A. M.; RUSSO, C.; FERRONI, M.; CORROCHER, R. Low selenium status in the elderly influences thyroid hormones. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 89, n. 6, p. 637, 1995.

OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L.; LANE, J. T.; THOMPSON, M. P. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 1, p. 125, 1991.

PALMER, I.S.; ARNOLD, R.L.; CARLSON, C.W. Toxicity of various selenium derivatives to chick embryos. **Poultry Science**, v.52, p. 1841-1846, 1973.

PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

PATEL, J. C.; ROSSIGNOL, E.; RICE, M. E.; MACHOLD, R. P. Opposing regulation of dopaminergic activity and exploratory motor behavior by forebrain and brainstem cholinergic circuits. **Nature communications**, v. 3, p. 1172, 2012.

PELLMAR, T. C.; RONEY, D.; LEPINSKI, D. L. Role of glutathione in repair of free radical damage in hippocampus in vitro. **Brain Research**, v. 583, n. 1, p. 194-200, 1992.

PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, S.E; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14 (3): 149-67, 1985.

PEPPER, M. P.; VATAMANIUK, M. Z.; YAN, X.; RONEKER, C. A.; LEI, X. G. Impacts of dietary selenium deficiency on metabolic phenotypes of diet-restricted GPX1-overexpressing mice. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 3, p. 383-390, 2011.

PERILLAN, C; COSTALES, M; VIJANDE, M; ARGUELLES, J. Maternal RAS influence on the ontogeny of thirst. **Physiology & Behavior**, v. 92, p: 554-59, 2007.

PINTON, S.; DA ROCHA, J. T.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W. Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity. **Neuroscience Letters**, v. 472, n. 1, p. 56-60, 2010.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; BLAVET, N.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v.57, n.2, p. 201-210, 1979.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, 1977.

POSTGATE, J.R. Competitive and noncompetitive inhibitors of bacterial sulphate reduction. **Journal of General Microbiology**, v. 6, p.128-142, 1952.

PROHASKA, J.R. & GANTHER, H.E. Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 27, 1379–1387, 1976.

PRUT, L & BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviour: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAYMAN, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 2, p. 254-268, 2008.

RAYMAN, M. P.; INFANTE, H.G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, v.100 (2), p. 238-253, 2008.

RENKO, K.; WERNER, M.; RENNER-MÜLLER, I.; COOPER, T. G.; YEUNG, C. H.; HOLLENBACH, B.; SCHWEIZER, U. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. **Biochemical Journal**, v. 409, n. 3, p. 741-749, 2010.

RODEN, M., PRSKAVEC, M., FÜRNSINN, C. Metabolic effect of sodium selenite: insulin-like inhibition of glucagon-stimulated glycogenolysis in the isolated perfused rat liver. **Hepatology**, v.22: 169–174, 1995.

ROTH, K. A. & KATZ, R. J. Stress, behavioral arousal, and open field activity—a reexamination of emotionality in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 3, n. 4, p. 247-263, 1980.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G.; HOEKSTRA, W. G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179 (73), p.588, 1973.

ROY, S.; DONTAMALLA, S. K.; MONDRU, A. K.; SANNIGRAHI, S.; VEERAREDDY, P. R. Downregulation of apoptosis and modulation of TGF- $\beta$ 1 by sodium selenate prevents streptozotocin-induced diabetic rat renal impairment. **Biological Trace Element Research**, v. 139, p. 55–71, 2011.

RUIZ, J. I.; OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **Journal of Lipid Research**, v. 38, n. 7, p. 1482-1489, 1997.

RUNDLÖF, A.; ARNÉR, E. S. J. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 6, n. 1, p. 41-52, 2004.

SAIJOH, K.; SAITO, N.; JIN LEE, M.; FUJII, M.; KOBAYASHI, T.; SUMINO, K. Molecular cloning of cDNA encoding a bovine selenoprotein P-like protein containing 12 selenocysteines and a (His-Pro) rich domain insertion, and its regional expression. **Molecular Brain Research**, v. 30, n. 2, p. 301-311, 1995.

SARTORI-OLIVEIRA, C. E.; MOZZAQUATRO GAI, B.; GODOI, B.; ZENI, G.; WAYNE NOGUEIRA, C. The antidepressant-like action of a simple selenium-containing molecule, methyl phenyl selenide, in mice. **European Journal of Pharmacology**, 2012.

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C. R.; PINTO, L. G.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 6, p. 1261-1269, 2007.

SCHMUTZLER, C., MENTRUP, B., SCHOMBURG, L. Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. **Biological Chemistry**, v.388(10): 1053–1059, 2007.

SCHNEIDER, M. J.; FIERING, S. N.; PALLUD, S. E.; PARLOW, A. F.; GERMAIN, D. L. S.; GALTON, V. A. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 12, p. 2137-2148, 2001.

SCHOMBURG, Lutz. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, 2011.

SCHWARZ, K. & FOLTZ, C.M. Factor 3 activity of selenium compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v.233, p. 245-25, 1958.

SCHWARZ, K.; BIERI, J. G.; BRIGGS, G. M.; SCOTT, M. L. Prevention of exudative diathesis in chicks by factor 3 and selenium. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.95 (4), p: 621-625, 1957.

SCHWEIZER, U., CHIU, J., KÖHRLE, J. Peroxides and enzymes in the thyroid. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10(9): 1577–1592, 2008.

SCHWEIZER, U.; SCHOMBURG, L.; SAVASKAN, N.E. The neurobiology of selenium: lessons from transgenic mice. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 707–710, 2004.

SHEN, D. C.; DAVIDSON, M. B.; KUO, S. W.; SHEU, W. H. H. Peripheral and hepatic insulin antagonism in hyperthyroidism. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 66, n. 3, p. 565-569, 1988.

SMITH A.M.; PICCIANO M.F. Evidence for increased selenium requirement for the rat during pregnancy and lactation. **Journal of Nutrition**, v.116 (6), p. 1068–1079, 1986.

SPALLHOLZ, J. E.. Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. **Biomedical and Environmental Sciences: BES**, v. 10, n. 2-3, p. 260, 1997.

ST. GERMAIN, D. L. & GALTON, V. A. The deiodinase family of selenoproteins. **Thyroid**, v. 7, n. 4, p. 655-668, 1997.

ST. GERMAIN, D.L. The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thioldisulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase. **Endocrinology**, v.122, p.1860-1868,1988.

STEINBRENNER, H.; SPECKMANN, B.; PINTO, A.; SIES, H. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 40, 2011.

SULTANA, R., PERLUIGI, M., BUTTERFIELD, D.A. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, p.2021-2037, 2006.

SUN, Q. A.; WU, Y.; ZAPPACOSTA, F.; JEANG, K. T.; LEE, B. J.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 35, p. 24522-24530, 1999.

SUZUKI, K. T. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. **Journal of Health Science**, v. 51, n. 2, p. 107-114, 2005.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57(3), p. 134-144, 2003.

TAYLOR, J.B., FINLEY, J.W., CATON, J.S. Effect of the chemical form of supranutritional selenium on selenium load and selenoprotein activities in virgin, pregnant, and lactating rats. **Journal of Animal Science**, v.83, p. 422–429, 2005.

TEMPLE, N.G. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research**, v. 20 (3), p. 449-459, 2000.

- TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. **Toxicology Letters**, v.137, p. 103-110, 2003.
- TONG, W.M., WANG, F. Alterations in rat pancreatic islet  $\beta$  cells induced by Keshan disease pathogenic factors: protective action of selenium and vitamin E. **Metabolism**, v.47: 415–419, 1998.
- TORRANCE, C. J.; JONES, J. P.; DOHM, G. L. Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1204-1214, 1997.
- TOULIS, K.; ANASTASILAKIS, A. D.; TZELLOS, T. G.; GOULIS, D. G.; KOUVELAS, D. Selenium supplementation in the treatment of Hashimoto's thyroiditis: a systematic review and a meta-analysis. **Thyroid**, v. 20, n. 10, p. 1163-1173, 2010.
- TREPANIER, G.; FURLING, D.; PUYMIRAT, J.; MIRAULT, M. E. Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 75, n. 1, p. 231-243, 1996.
- URSINI, F.; BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.44, p. 255-276, 1987.
- URSINI, F.; BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.44, p. 255-276, 1987.
- USAMI, M.; TABATA, H.; OHNO, Y. Effects of ascorbic acid on selenium teratogenicity in cultured rat embryos. **Toxicology Letters**, v.105, p. 123-128, 1999.
- VADHANAVIKIT, S.; GANTHER, H. E. Selenium requirements of rats for normal hepatic and thyroidal 5'-deiodinase (type I) activities. **Journal of Nutrition**, v.123, p. 1124 –1128, 1993.
- VANDERPAS, J.B., CONTEMPRE, B., DUALE, N.L. Selenium deficiency mitigates hypothyroxinemia in iodine-deficient subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.271S–275S, 1993.
- VENDELAND, S.C.; DEAGEN, J.T.; BUTLER, J.A.; WHANGER, P.D. Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. **Biometals**, v. 7, p. 305-312, 1994.
- VETTOR, R. The metabolic actions of thyroid hormone and leptin: a mandatory interplay or not?. **Diabetologia**, v. 48, n. 4, p. 621-623, 2005.
- WALSH, R.N. & CUMMINS, R.A. The open field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, p. 481–504, 1976.
- WANG, X.D., VATAMANIUK, M.Z., WANG, S.K., RONEKER, C.A., SIMMONS, R.A., LEI, X.G. Molecular mechanisms for hyperinsulinaemia induced by

overproduction of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in mice. **Diabetologia**, v.51, p. 1515–1524, 2008.

WATANABE, C. & SATOH, H. Effects of prolonged selenium deficiency on open field behavior and Morris water maze performance in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 51, n. 4, p. 747-752, 1995.

WEITZEL, Joachim M.; IWEN, K. A.; SEITZ, Hans J. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. **Experimental Physiology**, v. 88, n. 1, p. 121-128, 2003.

WIRTH, J.B; EPSTEIN, A.N. Ontogeny of thirst in infant rat. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 230, n. 1, p: 188-98, 1976.

YANG, G. Q.; WANG, S. Z.; ZHOU, R. H.; SUN, S. Z. Endemic selenium intoxication of humans in China. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 37(5), p. 872-88, 1983.

YONEMOTO, J.; SATO, H.; HIMENO, S.; SUZUKI, T. Toxic effects of sodium selenite on pregnant mice and modification of the effects by vitamin E or reduced glutathione. **Teratology**, v. 28, p. 333-340, 1983.\

ZAFAR, K. S.; SIDDIQUI, A.; SAYEED, I.; AHMAD, M.; SALIM, S.; ISLAM, F. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, n. 3, p. 438-446, 2003.

ZHANG, S; ROCOURT, C.; CHENG, W. Selenoproteins and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131(4), p. 253-260, 2010.