

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

OMAR EL SAYED

AVALIAÇÃO DO SELÊNIO NO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBROS DE
RATOS

PONTA GROSSA

2021

OMAR EL SAYED

AVALIAÇÃO DO SELÊNIO NO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBROS DE
RATOS

Dissertação apresentada para
obtenção do título de mestre em
Ciência da Saúde na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Área de
Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Pedroso
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo
Zanetti Gomes

PONTA GROSSA

2021

E37 El Sayed, Omar
Avaliação do selênio no estresse oxidativo em cérebros de ratos / Omar El Sayed. Ponta Grossa, 2021.
82 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Pedroso.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes.

1. Estresse oxidativo. 2. Selênio. 3. Degeneração cerebral. I. Pedroso, Bruno. II. Gomes, Ricardo Zanetti. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 615


FOLHA DE APROVAÇÃO

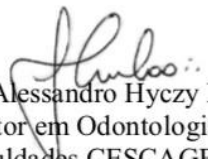
OMAR EL SAYED


AVALIAÇÃO DO SELÊNIO NO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBROS DE RATOS


Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 23 de setembro de 2021.


Prof. Dr. Bruno Pedroso – Orientador
Doutor em Educação Física
Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof. Dr. Alessandro Hyczy Lisbôa
Doutor em Odontologia
Faculdades CESCAGE


Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski
Doutor em Clínica Veterinária
Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes – Coorientador
Doutor em Medicina
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico este trabalho a minha mãe, Najet Saleh El Sayed, uma pessoa inspiradora no sentido de busca pelo conhecimento, incansável e batalhadora, com o brilho nos olhos de forma a contagiar os que estão ao seu redor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Bruno Pedroso por ter acreditado no meu trabalho, o qual admiro pela pessoa e profissionalismo, sempre tecendo os comentários mais pertinentes. Meu eterno agradecimento.

Ao Professor Dr. Ricardo Zanetti Gomes, por ter me acolhido em meio a reviravolta causada pela pandemia, o qual tenho total admiração, já previa ao início deste trabalho e que se acentuou no transcorrer do tempo, tanto pela paciência e sabedoria em guiar seus pupilos, com educação e gentileza que lhe é única.

À minha esposa, Carolina Ribas El Sayed, pelo apoio incondicional, o acolhimento e serenidade nas horas mais perturbadoras, e o amor que deixa a jornada mais tranquila.

Aos meus amados filhos, Tárik e Maya El Sayed, pelo estímulo que involuntariamente fazem com que tentemos nos tornar pessoas melhores.

Aos meus pais, Najet e Nouredine El Sayed, pelo eterno amor e força impulsionadora, sempre nos acolhendo nas horas mais críticas e vibrando com nossas conquistas.

Às minhas irmãs, Nadhia e Yasmin El Sayed, pelo carinho e amor.

RESUMO

Introdução: sabe-se que o selênio apresenta um grande efeito no estresse oxidativo das células, tanto sistêmico e principalmente cerebral. A degeneração cerebral, ocorre proveniente de diversos fatores tanto internos quanto externos no organismo humano, sendo um deles o estresse oxidativo. Sendo assim, buscam-se formas de minimizar estes efeitos degenerativos, tendo o selênio como componente importante na defesa antioxidativa do organismo. Objetivo: analisar o efeito do selênio no cérebro de ratos, analisando marcadores de estresse oxidativo séricos, dentre eles TIOL, TBARS e catalase assim como marcadores imunohistoquímicos, dentre eles caspase-3, BCL-2, NFKB, COX2, GFAP, CD68, além do padrão estrutural neural, nas lamínas em HE. Foram analisados o padrão do hemograma e bioquímica dentre eles, o Colesterol total, HDL, Triglicerídeos, TGO, TGP, Bilirrubinas totais e frações, Ferro sérico e Homocisteína. Métodos: estudo experimental, com 36 ratos. Foi realizada suplementação com selênio 0 mcg em 10 ratos, com selênio 48 mcg em 10 ratos e com selênio 96mcg em 10 ratos por 6 semanas (42 dias) e realizado autopsia e avaliação comparativa dos valores de TIOL, TBARS e catálase sérica, assim como mensuração dos marcadores imunohistoquímicos, assim como hemograma e bioquímica. Resultados: houve relevância estatística apenas nos valores de TBARS, sugerindo sua ação antioxidante. Dentre os demais marcadores de estresse oxidativo, tanto séricos como TIOL e catalase, como os marcadores imunohistoquímicos, houve pouca variabilidade em suas mensurações. Assim como também tivemos um resultado inexpressivo no hemograma e bioquímica. Conclusão: observa-se que tivemos melhora nos níveis de TBARS, porém nas demais mensurações obteve-se pouca relevância estatística. Levanta-se o questionamento sobre a dose utilizada ou a formulação e sua biodisponibilidade como pontos de influência na resposta oxidativa, sendo necessário seguimento na investigação.

Palavras chave: Degeneração cerebral. Selênio. Estresse oxidativo. Marcadores imunohistoquímico.

ABSTRACT

Introduction: it is known that selenium has a great effect on the oxidative stress of cells, both systemic and mainly cerebral. Brain degeneration occurs from several factors, both internal and external in the human body, one of them being oxidative stress. Therefore, ways are sought to minimize the effects of these degeneratives, with selenium as an important component in the body's antioxidative defense.

Objective: to analyze the effect of selenium in the brain of rats, analyzing serum oxidative stress markers, including TIOL, TBARS and catalase as well as immunohistochemical markers, including caspase-3, BCL-2, NFKB, COX2, GFAP, CD68, in addition to the neural structural pattern, in HE slides. The standard of the blood count and biochemistry were imposed, among them, the total cholesterol, HDL, Triglycerides, TGO, TGP, total bilirubins and fractions, serum iron and homocysteine.

Methods: experimental study with 36 rats. Supplementation with selenium 0 mcg in 10 rats, with selenium 48 mcg in 10 rats and with selenium 96mcg in 10 rats for 6 weeks (42 days), and an autopsy and comparative evaluation of the values of TIOL, TBARS and serum catalase were performed, as well as measurement of immunohistochemicals, as well as blood count and biochemistry.

Results: excluding the statistic only in TBARS values, suggesting its antioxidant action. Among the other oxidative stress markers, both serum such as TIOL and catalase, as well as immunohistochemical markers, there was little variability in their measurements. As well as an inexpressive result in the blood count and biochemistry.

Conclusion: it is observed that there was an improvement in TBARS levels, but in the other measurements it was obtained derived from statistics. Questions are raised about the dose used or the base and its bioavailability as points of influence on the oxidative response, and it is necessary to continue the investigation.

Keywords: Cerebral degeneration. Selenium. Oxidative stress. Immunohistochemical markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de calibração obtida com padrão de glutathiona reduzida 1mM	33
Figura 2 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável TIOL.....	39
Figura 3 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável TBARS	39
Figura 4 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável CATALASE.....	40
Figura 5 - Gráfico de boxplot da variável COX segundo os grupos.....	44
Figura 6 - Gráfico de boxplot da variável CASP segundo os grupos.....	45
Figura 7 - Gráfico de boxplot da variável BCL-2 segundo os grupos	45
Figura 8 - Gráfico de boxplot da variável NFKB segundo os grupos.....	46
Figura 9 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável GFAP.....	46
Figura 10 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável HE	46
Figura 11 - Gráfico de boxplot da variável HCT (%) segundo os grupos.....	49
Figura 12 - Gráfico de barras das médias de HCT (%) segundo os grupos.....	50
Figura 13 - Gráfico de boxplot da variável MCHC (g/dL) segundo os grupos.....	50
Figura 14 - Gráfico de barras das médias de MCHC (g/dL) segundo os grupos.....	51
Figura 15 - Gráfico de boxplot da variável PLT (10 ³ /uL) segundo os grupos	51
Figura 16 - Gráfico de barras das médias PLT (10 ³ /uL) segundo os grupos.....	52
Figura 19 - Boxplot Colesterol Total (mg/dL) de acordo com o grupo.....	53
Figura 20 - Boxplot Colesterol HDL (mg/dL) de acordo com o grupo.....	53
Figura 21 - Boxplot Triglicerídeos (mg/dL) de acordo com o grupo.....	54
Figura 22 - Boxplot TGO (mg/dL) de acordo com o grupo	55
Figura 23 - Boxplot TGP (mg/dL) de acordo com o grupo.....	55
Figura 24 - Boxplot Bilirrubina Total (mg/dL) de acordo com o grupo	56
Figura 25 - Boxplot Bilirrubina Direta (mg/dL) de acordo com o grupo	56
Figura 26 - Boxplot Bilirrubina Indireta (mg/dL) de acordo com o grupo.....	57
Figura 27 - Boxplot Ferro (mg/dL) de acordo com o grupo	57
Figura 28 - Boxplot Homocisteína (mg/dL) de acordo com o grupo.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volume de Tris/HCl 50mM por grama de amostra nos órgãos.....	32
Tabela 2 - Análise descritiva.....	38
Tabela 3 - Análise inferencial	41
Tabela 4 - Análise comparativa entre os grupos.....	42
Tabela 5 - Análises estatísticas descritivas dos marcadores imunohistoquímicos.....	42
Tabela 6 - Análises estatísticas descritivas dos marcadores separados por grupo.....	43
Tabela 7 - Análises estatísticas descritivas do hemograma.....	47
Tabela 8 - Análises estatísticas descritivas do hemograma separado por grupo.....	48
Tabela 9 - Descritiva geral do exame bioquímico	52
Tabela 10 - Descritiva do exame bioquímico de acordo com o grupo.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.2 OBJETIVOS.....	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO	15
2.1.1 Fisiologia dos radicais livres	15
2.1.2 Sistema de defesa antioxidante	18
2.1.3 Sistema enzimático	19
2.1.4 Sistema não-enzimático	20
2.1.5 Marcadores do estresse oxidativo	22
2.1.6 Fatores exógenos moduladores do estresse oxidativo	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 EXPERIMENTOS E PROCEDIMENTOS INICIAIS.....	31
3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	32
3.3 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS	35
3.4 LEITURA DAS LÂMINAS	36
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 ANÁLISE DESCRITIVA	38
4.2 ANÁLISE INFERENCIAL.....	40
4.3 ANÁLISE DO HEMOGRAMA.....	47
4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA	52
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO A - RELAÇÃO DE PESOS E MISTURAS DAS AMOSTRAS.....	81
ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	82

1 INTRODUÇÃO

Considerado por muitos anos um elemento tóxico para o ser humano, o selênio passou a ser visto com outros olhos após ser encontrado em uma enzima desintoxicante em 1973 e desencadeado desde então uma série de pesquisas positivas sobre o uso dele no organismo (CHEN; BERRY, 2003).

As boas novas sobre o elemento biológico permitiram que cada vez mais estudos aprofundados fossem desenvolvidos, principalmente no que diz respeito ao seu uso em diversos aspectos na saúde humana. Chen e Berry (2003) ressaltam em seu artigo que nas últimas três décadas inúmeras provas foram apresentadas sobre a função do selênio na prevenção de doenças como problemas cardiovasculares, funções imunológicas e até mesmo na prevenção de cânceres.

No que diz respeito as doenças cerebrais, por sua vez, os estudos também destacaram a importância do selênio para o cérebro e o que sua falta pode trazer de prejuízos ao órgão. A insuficiência do elemento biológico está ligada a diversos distúrbios neuromusculares como o Acidente Vascular Cerebral (AVC), Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica Familiar e Distrofia de Duchenne (CHEN; BERRY, 2003).

Um ponto importante descoberto pelos pesquisadores está no uso do selênio como um antídoto eficaz para a toxicidade de metais pesados, os quais estão ligados a doenças neurodegenerativas segundo Chen e Berry (2003). Tal afirmação também foi confirmada por Danscher (1982), que por sua vez, analisou como selênio age dentro do organismo e se une aos metais de modo a transformá-los. “Após a absorção, o selênio forma um complexo com proteínas plasmáticas e é rapidamente distribuído por todos os tecidos onde é retido e acredita-se que substitua o enxofre em compostos contendo enxofre” (DANSCHER, 1982).

Outro estudo também com o propósito de avaliar o selênio buscou descobrir os efeitos da substância e também do mercúrio em atividades enzimáticas e na peroxidação lipídica em três partes diferentes do animal como sangue, fígado e cérebro. El-Demerdash (2007) na ocasião analisou ambas as substâncias de forma diferentes e separadas para demonstrar o quanto o mercúrio poderia afetar a saúde e o selênio evitar tais complicações. Os resultados foram bastante satisfatórios e mostraram o quanto o selênio é capaz de neutralizar a toxicidade de mercúrio no corpo humano e dessa forma ser utilizado na prevenção de inúmeras doenças

degenerativas. Dentre os principais benefícios citados por El-Demerdash (2007) estiveram a proteção das membranas e a proteção contra a peroxidação lipídica espontânea.

A falta de selênio no organismo, principalmente o identificado como selênio proteínico P, influencia diretamente nos compostos hormonais e nos neurotransmissores reforça Whanger (2001) ocasionando assim mudanças no humor nos humanos e mudança de comportamento em outros animais. Um experimento criado pelo pesquisador mostra uma redução significativa em elementos como dopamina, noradrenalina e serotonina em ratos cujo a alimentação foi deficiente em selênio por 15 dias. “Estes resultados com várias regiões sugerem que a diminuição da proteção do cérebro contra o dano oxidativo pode induzir dano cerebral ao perturbar a taxa de renovação de algumas monoaminas” explica Whanger (2001).

Pillai, Uyehara-Lock e Bellinger (2014) ressaltam que a deficiência de selênio também está associada ao declínio cognitivo e ao aumento do risco de convulsões na epilepsia. Os pesquisadores enxergam na suplementação uma importante aliada tanto da diminuição das crises como também na prevenção de doenças cerebrais. Os diversos estudos que envolvem camundongos enfatizam a importância de ingestão de selênio na dieta para o funcionamento normal do cérebro e não foram poucos os realizados.

Sobre o Alzheimer os prognósticos são variados e envolvem diversos riscos genéticos e ambientais para o seu desenvolvimento. O início precoce da doença, por sua vez, pode estar relacionado a mutações autossômicas dominantes dentro do gene da proteína precursora de amiloide tendo como variante outros genes como apolipoproteína E, assim como um pobre efeito antioxidante cerebral (PILLAI; UYEHARA-LOCK; BELLINGER, 2014).

Em relação à Doença de Parkinson (DP) a maioria dos casos estão relacionados aos fatores ambientais e genéticos desconhecidos, porém alguns fatores incluem o mau funcionamento glial e fatores neurotróficos que podem causar estresse oxidativo, esse aliviado através do selênio.

O selênio pode ter um papel importante na DP ao aliviar a oxidação estresse ativo via selenoproteínas. Níveis de selênio no plasma causam diminuição em indivíduos com DP. Isso pode ser devido a maior utilização de selênio para a

produção de selenoproteína no cérebro, possivelmente para prevenir mais danos oxidativos (PILLAI; UYEHARA-LOCK; BELLINGER, 2014).

Além das doenças já citadas, a isquemia cerebral também foi base de estudo diante da falta de selênio no organismo. De acordo com Ansari et al. (2004) esse tipo de doença em humanos na maioria das vezes é resultante de uma oclusão transitória ou permanente da artéria cerebral média e traz consigo danos neurológicos e com risco de morte. As enzimas antioxidantes fornecem proteção celular vital e a ingestão de selenito de sódio pode desempenhar diretamente um papel de antioxidante, modular a atividade de complexos de transporte de elétrons III e IV, o que favorece a proteção do cérebro contra a doença (ANSARI et al., 2004).

A relação do selênio e o câncer, no entanto, ainda não está bem definida e muitos estudos estão sendo produzidos para relacionar e envolver tal relação. Um dos exemplos foi a pesquisa desenvolvida por Zhu et al. (1995), a qual avaliou efeitos antiproliferativos do selênio e o efeito biológico do elemento no crescimento de glioma de rato e linhagens de células de glioblastoma humano. Dentre os resultados obtidos pelos pesquisadores esteve a inibição do tumor no rato através do uso selênio intracelular, algo positivo e que pode ser um importante avanço no combate à doença.

Sobre o câncer Whanger (2001), ressalta que o selênio também pode ser empregado como terapia durante o tratamento juntamente com as medidas de suporte em casos de tumores cerebrais. Um experimento relatado por ele mostra que pacientes com esse tipo de doença utilizaram o elemento por 8 semanas de forma a acompanhar possíveis melhorias.

Uma melhoria definitiva em 76% dos pacientes e uma ligeira melhora no 24% dos pacientes foram observados e houve uma diminuição de sintomas como náuseas, vômitos, dores de cabeça, vertigem, marcha instável, distúrbios da fala ordens e apreensões jacksonianas. Foi concluído que o selenito pode ser empregado com oxigênio terapia, juntamente com medidas de suporte na gestão de pacientes com tumor cerebral (WHANGER, 2001)

Fato é que o selênio é um importante elemento para a saúde humana e sua deficiência pode interferir na qualidade de vida, assim como trazer riscos reais de disfunções neurológicas e morte. Burk et al. (2007), traz indagações relevantes no que se refere a Apolipoproteína E Receptor-2 (ApoER2), substância que facilita a

captação da selenoproteína P (Sepp1) pelas células de Sertoli e as distribui para o corpo.

A experiência realizada com camundongos sobre a ApoER2 mostrou que se atentar aos níveis da substância também é importante visto que a mesma pode interferir na manutenção do selênio no cérebro e contribuir para a preservação da disfunção neurológica. O estudo sugere uma interação entre ApoER e a Sepp1 no cérebro (BURK et al., 2007).

Burk et al. (1991) também já haviam desenvolvido experimentos com ratos recém nascidos, os quais tiveram como propósito avaliar experimentos fisiológicos para obter visão da função da selenoproteína P. Foram inseridos altas doses de selênio em animais com deficiência do elemento no sangue e avaliada a concentração de selenoproteína P por período específico. “Os resultados obtidos permitiram demonstrar que várias propriedades fisiológicas distinguem selenoproteína P da glutathione peroxidase” destaca Burk et al. (1991).

Em contrapartida o uso de compostos orgânicos de selênio em excesso também foi dedicado a análise por apresentar riscos de toxicidade quando o corpo fica exposto ao elemento em doses elevadas. Barbosa et al. (1998) reforça que experimentos feitos em ratos e aves permitiram descobrir alterações no fígado, rim e cérebros dos animais. “Existem alguns pontos de evidência indicando que a exposição ao selênio causa perturbação de síntese de heme in vivo em animais e humanos” destaca Barbosa et al. (1998).

Não são poucos os estudos que relacionam a deficiência do selênio com danos neurológicos e não é à toa que desenvolvimento de experimentos e pesquisas se fazem necessário para aguçá-la a saúde cerebral e garantir possíveis tratamentos mais eficazes. O cérebro é um dos órgãos privilegiados em termos de retenção de selênio, mas o baixo estado nutricional do elemento e declínio da capacidade intelectual pode ser crucial para a qualidade de vida dos seres humanos (STEINBRENNER; SIES, 2013)

Sendo assim, a avaliação do efeito do selênio na estrutura neuronal de ratos, assim como impacto nas células inflamatórias, se torna importante, como alternativa na prevenção da degeneração cerebral.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Analisar a estresse oxidativo com e sem suplementação de selênio, assim como analisar bioquimicamente e histomorfologicamente a influência da suplementação com selênio no processo degenerativo cerebral.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito do selênio em ratos, analisando marcadores séricos de estresse oxidativo, dentre eles, TIOL, TBARS e caspase;
- Analisar o efeito do selênio no cérebro de ratos, analisando marcadores imunohistoquímicos, dentre eles, caspase-3, BCL-2, NFkB, COX2, GFAP, CD68, além do padrão estrutural neural, nas lâminas em HE;
- Analisar o padrão do hemograma frente a suplementação do selênio
- Analisar o padrão bioquímico, dentre eles o Colesterol total, HDL, Triglicerídeos, TGO, TGP, Bilirrubinas totais e frações, Ferro sérico, homocisteína sérica, frente a suplementação do selênio
- Determinar a influencia do selênio como alterador no processo degenerativo cerebral.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. A cronicidade do processo em questão tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer. A geração de radicais livres desencadeia eventos patológicos que, por sua vez, estão envolvidos nos processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos (BARBOSA et al., 2010).

2.1.1 Fisiologia dos radicais livres

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. A mitocôndria, por meio da

cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (BARBOSA et al., 2010).

Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do O_2 , no decorrer deste texto utilizaremos o termo "espécies reativas do metabolismo do oxigênio" (ERMO) para referirmo-nos a eles. ERMO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERMO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as ERMO) e o sistema de defesa antioxidante. Como vimos, esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O_2 ¹⁶. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (a-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a

citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo *c* removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O_2 para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

Em face da redução univalente do O_2 são gerados os radicais superóxido (O_2^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da reação de geração de OH^{\cdot} tem ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro (Barbosa et al, 2010).

Além da capacidade do O_2^{\cdot} em participar de reações de geração de OH^{\cdot} , pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico (NO^{\cdot}), gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito ($ONOO$), também potencialmente reativa (BARBOSA et al., 2010).

Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à geração de radical OH^{\cdot} , por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical O_2^{\cdot} , a fim de gerar, da mesma forma, o radical OH^{\cdot} (BARBOSA et al., 2010).

A ligação do ferro e cobre às proteínas específicas: transferrina, ferritina e ceruloplasmina, por meio da quais estes são transportados, utilizados e estocados, previne e/ou minimiza as reações de geração de radicais livres catalisadas por esses metais. No citoplasma de células hepáticas, o ferro livre (não ligado à ferritina) é facilmente dissociado na forma de íon, o que o torna cataliticamente ativo e apto

para participar de reações de óxido-redução e, conseqüentemente, de geração de radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

Os ácidos graxos poli-insaturados contidos nas membranas celulares fazem com que essas sejam potentes geradoras de radicais livres, alcoxila (LO^{\bullet}) e peroxila (LO_2^{\bullet}), por meio da lipoperoxidação. Tal processo constitui-se de reações em cadeia, representadas pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (BARBOSA et al., 2010).

O radical OH^{\bullet} , por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal iniciador de tal processo. Entretanto, a participação do ferro também é considerada fator determinante, ressaltando-se a importância da relação equimolar entre Fe^{3+}/Fe^{2+} , para possibilitar a iniciação desse processo. Os íons ferro agem como catalisadores da conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais LO^{\bullet} e LO_2^{\bullet} , que, por serem potencialmente reativos, iniciam uma nova cadeia de reações, as quais podem ser rápidas ou lentas, de acordo com a valência do ferro (SCHEINER et al., 2004).

Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases*). Essas se referem a proteínas transmembrana que têm, por excelência, a função de transferir os elétrons através das membranas celulares. Geralmente, o aceptor de elétrons é o oxigênio e, dessa forma, em decorrência desse processo, gera-se o radical O_2^{\bullet} . Tais enzimas existem em pelo menos seis isoformas, diferindo quanto ao local de expressão e co-fatores necessários para a sua ativação (BEDARD; KRAUSE, 2007).

2.1.2 Sistema de defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (HALLIWELL et al., 2004).

Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (CLARKSON; THOMPSON, 2000).

2.1.3 Sistema enzimático

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical OH^{\bullet} , contra o qual não há sistema enzimático de defesa (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O referido radical (OH^{\bullet}) vem sendo indicado como o de maior potencial reativo e com extrema instabilidade (vida média de 10^{-9} segundos). Essas características os capacitam como o radical livre mais propício na produção de danos oxidativos. Além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica. Seu ataque ao DNA possibilita a ocorrência de mutações (WELCH et al., 2002).

Considerando a potencialidade do radical OH^{\bullet} e o fato da não existência de defesa enzimática especializada, é de extrema importância a manutenção do

perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, com o propósito de promover a manutenção da integralidade celular. Assim, a GPx merece atenção especial, uma vez que sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutatona, por meio do controle da relação entre glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (JÚNIOR ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2001).

A atividade das enzimas em questão muitas vezes depende da participação de cofatores enzimáticos, especialmente antioxidantes de origem dietética. Tais cofatores podem diferir de acordo com os compartimentos celulares de ação das enzimas. A SOD pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), enquanto na mitocôndria, necessita do manganês como co-fator (SOD-Mn). A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

2.1.4 Sistema não-enzimático

O sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. Outros carotenóides sem atividade de vitamina A, como licopeno, luteína e zeaxantina, também o são. Entre os minerais destacam--se o zinco, cobre, selênio e magnésio (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Usualmente, os estudos que se referem à ação de compostos antioxidantes limitam-nos à avaliação de nutrientes e/ou alimentos isolados, em detrimento da consideração dos padrões dietéticos. Tal fato consiste em relevante limitação metodológica, uma vez que não se considera a interação entre os vários nutrientes e alimentos que podem atuar em sinergia na proteção contra os danos oxidativos às células e aos tecidos. Assim, pode-se incorrer em erros na interpretação dos resultados referentes ao potencial antioxidante dos compostos estudados (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A vitamina C e E, em um estudo experimental, realizado por El-Demerdash (2001), demonstrou que as vitaminas causaram uma redução significativa de dano oxidativo em eritrócitos em diferentes concentrações, como evidenciado pelo

aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), nos conteúdos de grupos sulfidríla (grupos SH) e nas atividades de acetilcolinesterase (AChE), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST). A resposta dependia da concentração. Em conclusão, vitaminas antioxidantes, especialmente vitamina E, podem ser capazes de melhorar o estresse oxidativo (EL-DEMERDASH, 2001).

A vitamina C é, por excelência, um antioxidante em potencial. No entanto, a presença de metais de transição como o ferro possibilita sua ação oxidante, tornando-a capaz de produzir espécies radicais (OH^{\bullet}) e não-radicais (H_2O_2) (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Estudo realizado com cultura de células mostrou que essas, quando incubadas em H_2O_2 , sofreram danos em resposta à ação oxidativa dessa espécie. A vitamina C, em presença de ferro, aumentou a expressão dos danos referidos. Os autores sugerem o envolvimento da vitamina C na regulação do metabolismo de ferro, aumentando sua absorção e tornando-o mais apto a desempenhar sua ação catalítica sobre as reações de *Fenton*, resultando na conversão do H_2O_2 em radicais OH^{\bullet} , potencialmente mais reativos. Também ressaltaram que, concomitantemente, ocorre a modulação da expressão de dois genes relacionados aos receptores de transferrina e ferritina (DUARTE; JONES, 2007).

Outra interação diz respeito ao composto quercetina, flavonóide amplamente encontrado no vinho tinto. Tal composto é potencialmente antioxidante. Entretanto, pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

As vitaminas C e E, por sua vez, demonstram interação cooperativa na inibição da peroxidação lipídica e na proteção contra danos oxidativos ao DNA. No entanto, Huang et al. (2009), não encontraram efeito sinérgico ($p=0,12$) entre a ação das vitaminas C (500mg/dia) e E (400 IU de α -tocoferol/dia) suplementadas durante dois meses, nos níveis urinários de PGF2-alfa-8-isoprostano, marcador da peroxidação lipídica (HUANG et al, 2009).

A avaliação do potencial antioxidante *in vivo* dos compostos não-enzimáticos depende de algumas variáveis, entre elas: absorção e biodisponibilidade em condições fisiológicas; concentração plasmática ideal para desempenhar sua atividade antioxidante; tipos de radicais livres gerados no processo oxidativo; em qual compartimento celular foram gerados e como foram gerados (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A ação de determinado antioxidante pode, portanto, variar de acordo com o compartimento celular ou tecido no qual atua. A vitamina C apresenta intensa atividade antioxidante contra radicais livres gerados em meio hidrofílico. No entanto, tal vitamina pode não ser capaz de inibir os radicais livres que propagam as reações de peroxidação lipídica em meios lipofílicos. Já os flavonóides são capazes de agir como antioxidantes, inativando radicais livres em ambos os compartimentos celulares, hidrofílico e lipofílico (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Segundo Huang *et al.*, a vitamina C ($p=0,01$) mostrou-se capaz de aumentar a capacidade antioxidante total do soro (*serum oxygenradical absorbance capacity - ORAC*), o que não ocorreu com a vitamina E ($p=0,52$). Os autores ressaltam que esse resultado reflete o fato de a vitamina C, ao contrário da E, desempenhar melhor atividade antioxidante em meios hidrofílicos (HUANG *et al.*, 2009).

2.1.5 Marcadores do estresse oxidativo

Quando a produção de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes, se favorece a oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados. Tais marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídeos, proteínas e Ácido Desoxirribonucléico (DNA), sendo os primeiros os de maior expressão. Outra forma de abordar a avaliação do estresse oxidativo é a que emprega métodos indiretos, baseados na capacidade antioxidante (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Cada vez há maior evidência científica de que o estresse oxidativo desencadeia relevantes implicações sobre os mecanismos que culminam com o desenvolvimento da síndrome metabólica. Dentre os vários fatores que modulam o estresse oxidativo, destaca-se a dieta. Assim, os marcadores do estresse oxidativo constituem ferramentas notáveis na avaliação dos possíveis efeitos e implicações da dieta sobre o referido processo (MAYNE, 2003).

Dentre as técnicas mais significativas e de relevância na quantificação de danos oxidativo em lipídios, baseia-se em medir, por meio de métodos colorimétricos, as substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid – TBA). A quantificação de isoprostanos, também vem sendo proposta como uma técnica promissora (MAYNE, 2003).

Os aldeídos são substâncias que se destacam como metabólitos secundários da oxidação de lipídios. Dentre estes compostos, o malondialdeído é um dos mais abundantes, resultante da peroxidação lipídica tecidual, principalmente dos ácidos graxos araquidônico, eicosapentaenoico e docosaenoico. Para a sua dosagem são empregados métodos colorimétricos, como no teste do TBA. Em tal teste uma molécula de malondialdeído reage com duas de TBA, formando-se um complexo de cor vermelha que é lido em um comprimento de onda específico (532-535nm). A concentração plasmática de malondialdeído é expressa em nmol/mL de plasma (MAYNE, 2003).

Apesar de sua simplicidade e facilidade de execução, o teste do TBA não é específico para o malondialdeído, reagindo com uma ampla variedade de compostos, entre eles, outros aldeídos que não o malondialdeído e ainda, açúcares, aminoácidos, proteína, aminas e bilirrubina. Por este motivo é também denominado teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances – TBARS) (MAYNE, 2003).

O teste de TBARS, apesar de sabidamente inespecífico, ainda apresenta ampla aplicação, devido especialmente, à sua facilidade de execução e baixo custo. A possibilidade de reação do TBA com substâncias intervenientes tem como conseqüência superestimar a extensão do processo de peroxidação lipídica, decorrente da detecção não só do malondialdeído, mas também de compostos interferentes. (MAYNE, 2003).

2.1.6 Fatores exógenos moduladores do estresse oxidativo

Na Dieta, Paniz et al. (2007), demonstraram que os níveis plasmáticos de vitamina C correlacionaram-se positivamente com os de albumina ($r=0,317$; $p=0,009$) e com a ALA-D (*δ -aminolevulinate dehydratase activity*) ($r=0,308$; $p=0,011$). Conforme supõem esses autores, a vitamina C tem ação protetora sobre os grupos tiol (-SH) dessas proteínas, uma vez que esses são suscetíveis de oxidação. Observou-se, ainda, correlação negativa ($r=-0,241$; $p=0,042$) entre a ALA-D e os grupos carbonila (PANIZ et al., 2007).

Em estudo com cultura de células, foram administradas as vitaminas C (60mM) e E (2mM) a eritrócitos de ratos previamente incubados com H₂O₂. Os resultados mostraram que ambas as vitaminas diminuíram efetivamente ($p<0,05$) a

concentração plasmática de malondialdeído, também marcador da peroxidação lipídica (REDDY et al., 2007).

Huang et al. (2009) avaliaram, em adultos não fumantes, o efeito isolado das vitaminas C (500mg/dia) e E (400 IU de α -tocoferol/dia), suplementadas durante dois meses, bem como o efeito da interação entre elas. Não foi observado efeito sinérgico entre a ação das vitaminas C e E em nenhum dos marcadores avaliados: malondialdeído ($p=0,46$), F2-isoprostanos ($p=0,23$) e capacidade antioxidante total do soro (ORAC) ($p=0,13$). Em relação ao efeito isolado, a vitamina C e não a E se mostrou capaz de agir em pelo menos um dos marcadores em questão, aumentando a ORAC ($M=194$, $DP=75\mu\text{mol Trolox/L}$; $p=0,01$) (HUANG et al, 2009).

Prasad et al. (2007) referem-se ao zinco como um agente antioxidante altamente eficiente. Estes autores testaram, em indivíduos entre 55 e 87 anos de idade, o efeito antioxidante da suplementação de zinco (45mg de zinco elementar). Após seis meses de suplementação, o zinco mostrou-se capaz de diminuir os níveis plasmáticos de malondialdeído ($M=1,66$, $DP=0,34$ versus $M=1,35$, $DP=0,18$; $p=0,002$) e 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8HdG) ($M=0,63$, $DP=0,16$ versus $M=0,50$, $DP=0,14$; $p=0,030$). O composto 8-OHdG tem sido apontado como o marcador de maior relevância na avaliação do dano oxidativo ao DNA (PRASAD et al., 2007).

Bruno et al. (2007), testaram, em ratos *Sprague Dawley*, o efeito de dietas adequadas (AZ; 50mg de Zn/kg de dieta; $n=12$) e deficientes em zinco (DZ; $<0,05\text{mg}$ de Zn/kg de dieta; $n=12$), administradas por 21 dias. O grupo DZ mostrou menores níveis plasmáticos de F2-isoprostanos ($p<0,05$) e menor *Ferritin-reducing Ability of Plasma* (FRAP) ($p=0,039$). Além do efeito sobre esses marcadores, associaram-se à DZ menores níveis plasmáticos dos antioxidantes: vitamina C ($p=0,003$) e α -tocoferol ($p<0,001$). O FRAP diz respeito a uma medida da capacidade antioxidante do plasma, pois menor FRAP indica menor capacidade de ligação da ferritina ao ferro e, conseqüentemente, maior quantidade de ferro livre, capaz de catalisar a geração de radicais OH^{\bullet} , por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss (BRUNO et al., 2007).

Oteiza et al. (1995) também testaram em ratos *Sprague Dawley* o efeito de dieta deficiente em zinco (DZ; $0,5\mu\text{gZn/g}$ de dieta; $n=10$) sobre marcadores do estresse oxidativo. Após 14 dias, o grupo DZ, quando comparado ao que recebeu dieta adequada em zinco (AZ; $25\mu\text{gZn/g}$ de dieta; $n=10$), mostrou maiores níveis plasmáticos de grupos carbonila ($M=3,6$, $DP=0,2$ versus $M=2,4$, $DP=0,2$; $p<0,05$) e

TBARS (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*) ($M=39$, $DP=3$ versus $M=25$, $DP=2$; $p<0,05$). No entanto, não houve efeito significativo sobre o marcador da oxidação ao DNA, o composto 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina ($M=8,9$, $DP=1$ versus $M=6,8$, $DP=1$; $p>0,05$). O TBARS, teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, dosa os aldeídos, substâncias que se destacam como metabólitos secundários da oxidação de lipídeos. Dentre esses, o malondialdeído é um dos mais abundantes (OTEIZA et al., 1995).

Karlsen et al. (2007), avaliaram o efeito da ingestão diária de uma taça de vinho tinto sobre marcadores do estresse oxidativo. Sugere-se que a ação protetora do vinho sobre o estresse oxidativo se dá, especialmente, pela presença dos compostos fenólicos. O estudo foi realizado com 94 indivíduos (31 homens e 57 mulheres) com idade entre 37 e 70 anos. Estes foram divididos em dois grupos: teste (150mL/dia de vinho tinto) e controle. Independente do sexo, o vinho tinto não foi capaz de exercer efeito sobre nenhum dos marcadores avaliados: FRAP e níveis plasmáticos dos antioxidantes, α -tocoferol, β -caroteno, glutathione e compostos fenólicos totais. Cabe ressaltar que tal estudo teve os seguintes critérios de exclusão: presença de doenças crônicas não transmissíveis, tabagismo, uso de medicamentos (estatinas e aspirinas) e consumo de álcool além do presente no vinho. Estes foram estabelecidos com o objetivo de promover maior homogeneidade da amostra e minimizar os efeitos de possíveis vieses. Destaca-se, aqui, a ampla faixa etária da população estudada e a ausência de controle dos hábitos dietéticos e de atividade física (KARLSEN et al., 2007).

Outros fatores dietéticos que não a suplementação de antioxidantes também se mostraram capazes de exercer efeitos sobre o estresse oxidativo. Dentre esses, o de maior expressão é a adequação da ingestão energética.

Burneiko et al. (2006) destacam que a ingestão de dietas hiperenergéticas se associa com o desenvolvimento de câncer, doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento, dislipidemia, aterosclerose e doenças cardiovasculares. Os autores ressaltam que o estresse oxidativo vem sendo considerado importante elo em tais associações e que os efeitos benéficos da restrição energética podem estar associados à redução do peso corporal (BURNEIKO et al., 2006).

Avaliou-se em ratos *Wistar* o efeito de Dieta Hiperenergética (DH) sobre marcadores do estresse oxidativo. Após oito semanas de experimentação, compararam-se os grupos DH e controle, não havendo diferenças em relação aos

marcadores avaliados: níveis plasmáticos totais de compostos antioxidantes e atividades das enzimas catalase e glutathione peroxidase. Nesse mesmo estudo, os autores encontraram que a interação entre DH e atividade física (natação 2 e 3 vezes/semana) tiveram efeito pró-oxidante, diminuindo a atividade enzimática da catalase mediante análise do fígado dos animais (BURNEIKO et al., 2006).

Johnson et al. (2007) investigaram o efeito da ingestão de dieta com restrição energética sobre marcadores do estresse oxidativo. Participaram do estudo dez indivíduos obesos ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), os quais receberam, em dias alternados, Dieta Restritiva (DR) com 20% de redução da ingestão energética normal e Dieta Normal (DN), irrestrita. O grupo DR, comparado ao DN, mostrou menores níveis plasmáticos de grupos carbonila e F2-isoprostanos, após 2, 4 e 8 semanas de intervenção (JOHNSON et al., 2007).

Durante uma atividade física intensa, o consumo total de oxigênio é aumentado em, aproximadamente, dez a vinte vezes. A captação do oxigênio pelo tecido muscular também sofre aumento relevante, da ordem de cem a duzentas vezes. Tais alterações no metabolismo de oxigênio favorecem a geração de radicais livres e/ou espécies reativas não-radicais. A atividade física intensa é capaz de gerar as espécies em questão, por meio da ativação de, pelo menos, três mecanismos principais: produção mitocondrial, citoplasmática e favorecida pelos íons ferro e cobre (KOURY; DONANGELO, 2003).

A atividade física intensa, em razão do incremento do consumo de oxigênio, é um fator que predispõe à geração de agentes oxidantes. No entanto, é também hábil em promover mecanismos de adaptação capazes de mitigar os danos oxidativos causados pela ação de tais agentes. Esses mecanismos estão relacionados ao sistema de defesa enzimático e não-enzimático (SCHNEIDER et al, 2004).

Em decorrência da resposta adaptativa mediada pela atividade física, as espécies reativas geradas têm ação de sinalizadores celulares capazes de ativar vias de regulação de genes relacionados à expressão de enzimas e proteínas específicas responsáveis por manter o equilíbrio intracelular entre oxidantes e antioxidantes. A enzima xantina oxidase está envolvida na produção do radical superóxido (O_2^{\cdot}). No entanto, a geração de proteínas com atividade quinase³⁶, entre outras ações, é responsável pelo aumento da expressão da superóxido dismutase, defesa antioxidante contra o radical O_2^{\cdot} (SOUZA JÚNIOR; OLIVERIA; PEREIRA, 2005).

Souza Júnior, Oliveria e Pereira (2005) ao testar o efeito da atividade física intensa sobre marcadores do estresse oxidativo, observaram que, comparado ao repouso, a corrida em esteira rolante determinou aumento nos níveis plasmáticos de malondialdeído, principalmente decorridos 23 (M=0,21m DP=0,012 *versus* M=1,5, DP=0,009; aumento de 714%; $p<0,01$) e 26 minutos (M=0,21, DP=0,012 *versus* M=1,6, DP=0,013; aumento de 761%; $p<0,01$). Os autores ainda ressaltaram que os níveis de malondialdeído relacionaram-se negativamente com a capacidade total do plasma, sendo que esta sofreu redução de 52% (M=483, DP=88 *versus* M=233, DP=12); $p<0,01$) e 59% (M=483, DP=88 *versus* M=200, DP=14; $p<0,01$), aos 23 e 26 minutos, respectivamente (SOUZA JÚNIOR; OLIVERIA; PEREIRA, 2005).

Clarkson e Thompson (2000) ressaltam que a atividade física intensa exerce efeitos sobre os aumentos dos níveis plasmáticos de malondialdeído e concentração de pentano exalado no ar expirado. Esse último marcador, segundo Knutson *et al.*³⁹, decorre da quantificação de compostos voláteis que constitui em outra técnica de aferição da oxidação lipídica. Entre tais compostos destacam-se, principalmente, os hidrocarbonetos etano e pentano, formados mediante peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 e 6, respectivamente (CLARKSON; THOMPSON, 2000).

Burneiko et al. (2006) estudaram, em ratos *Wistar*, o efeito da atividade física sobre o estresse oxidativo. Os ratos foram distribuídos em três grupos (n=8): sedentário (S), praticantes de atividade física por dois dias/semana (AT2) e cinco dias/semana (AT5). A atividade física eleita foi a natação. Após oito semanas de experimentação, independentemente da frequência de realização da atividade física, o grupo dos ratos ativos mostrou maiores níveis séricos totais de substâncias antioxidantes: AT2 *versus* S (M=24,5, DP=2,8 *versus* M=18,9, DP=1,4; $p<0,05$) e AT5 *versus* S (M=30,4, DP=4,4 *versus* M=18,9, DP=1,4; $p<0,05$). Tais resultados (aumento dos níveis séricos totais de substâncias antioxidantes) sugerem a ocorrência da resposta adaptativa mediante a realização de atividade física (BURNEIKO et al., 2006).

Clarkson e Thompson (2000) ainda destacam que, mediante a realização de atividade física intensa, a suplementação de antioxidantes, especialmente as vitaminas C e E, é capaz de exercer efeitos sobre a redução de marcadores do estresse oxidativo. No entanto, esses autores discutem a necessidade de tais

suplementos diante da existência de resposta adaptativa mediada pela atividade física, hábil em promover mecanismos de proteção contra a geração excessiva de espécies reativas capazes de causar danos às células e aos tecidos (CLARKSON; THOMPSON, 2000).

Referente a outros fatores, Segundo Park, Park e Gwak (1998), o fumo é capaz de alterar os marcadores da peroxidação lipídica, oxidar os grupos tiois das proteínas e aumentar os níveis plasmáticos dos grupos carbonila. Sua ação sobre a oxidação do DNA promove o aumento da geração dos compostos 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina. Ressaltam ainda que os níveis plasmáticos de vitamina C e E encontram-se reduzidos em indivíduos fumantes (PARK; PARK; GWAK, 1998).

Park, Park e Gwak (1998), testaram, em ratos *Sprague Dawley*, o efeito do fumo sobre marcadores do estresse oxidativo. Os ratos foram submetidos à inalação de fumaça de cigarro, durante um mês, com a frequência de três vezes ao dia. A análise de tecidos de pulmão de ratos do grupo-teste, quando comparado ao controle, mostrou maiores níveis de glutatona oxidada (GSSG; M=0,74, DP=0,06 *versus* M=0,09, DP=0,05; $p<0,001$), contrastando com menores níveis de glutatona reduzida (GSH; M=7,92, DP=0,83 *versus* M=14,40, DP=0,58; $p<0,001$). O composto 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina esteve presente em maiores quantidades nos tecidos de pulmonares ($p<0,05$), hepáticos ($p<0,005$) e cardíacos ($p<0,05$) de ratos do grupo teste (PARK; PARK; GWAK, 1998).

Lykkesleldt (2007), em estudo de revisão, apontou que os níveis dos marcadores de peroxidação lipídica, *Thiobarbituric Acid-Reactive Substances* (TBARS) e malondialdeído, correlacionaram-se positivamente com o hábito de fumar. Entre os 45 estudos revisados, 33 revelaram resultados com significância estatística, a pelo menos, 5% de probabilidade. Tais resultados referem-se aos maiores níveis dos marcadores em questão, no grupo de indivíduos fumantes quando comparado aos não-fumantes. Os referidos estudos foram todos realizados em humanos. No entanto, variaram quanto ao número de indivíduos participantes, tempo de acompanhamento, número de cigarros, métodos de aferição dos marcadores e fluido biológico no qual estes foram medidos (plasma, soro, saliva ou urina) (LYKKESLELDT, 2007).

Os efeitos do álcool sobre o estresse oxidativo podem ser diretos ou ainda mediados por seus metabólitos secundários, sendo marcante sua atuação sobre a redução dos níveis plasmáticos ou séricos dos antioxidantes dietéticos, entre eles: α -

tocoferol, ácido ascórbico e selênio. Das e Vasudevan (2007), sugeriram que o metabolismo do etanol está diretamente envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como na depleção dos componentes do sistema antioxidante e aumento nos níveis de marcadores específicos, sobretudo malondialdeído (DAS; VASUDEVAN, 2007).

Lecomte et al (1994); demonstraram que, independente do estado nutricional, o álcool exerce efeito sobre os níveis plasmáticos de vitaminas e minerais antioxidantes, bem como sobre marcadores específicos. Foram estudados 417 homens, entre 29 e 49 anos de idade, consumidores leves (<33g/dia; M=1, DP=10,6 - 9,2g/dia) e moderados (>33g/dia; M=1, DP=59,0 - 25,7g/dia) de álcool. Comparados a 102 pacientes alcoólatras sem complicações hepáticas, as concentrações plasmáticas de α -tocoferol, ácido ascórbico e selênio foram maiores ($p \leq 0,001$) nos bebedores leves, ao passo que as de malondialdeído foram menores ($p \leq 0,001$) (LECOMTE et al., 1994).

Huang et al. (2009) ratificaram o efeito do álcool sobre o estresse oxidativo, analisando em 76 indivíduos alcoólatras, marcadores específicos. Tal análise, quando comparada a do grupo controle (19 indivíduos saudáveis, não bebedores), mostrou níveis séricos significativamente maiores de malondialdeído, enquanto que menor atividade da SOD (HUANG et al., 2009).

Entre os fatores exógenos, potencialmente geradores de radicais livres, destacam-se ainda os xenobióticos, radiações ionizantes, metais pesados, entre outros (LYKKESLELDT, 2007).

Os xenobióticos promovem, via citocromo P-450 ou ciclo redox, a produção de espécies reativas de oxigênio. Um mediador de baixo peso molecular do ciclo redox, usualmente flavina adenina dinucleotídeo, age como acceptor de elétrons do xenobiótico em questão e sequencialmente, transfere este elétron a outro acceptor, desta vez o oxigênio, gerando assim radicais superóxido. Na presença de antimicina A (antibiótico produzido por bactérias do gênero *Streptomyces*), alguns intermediários da cadeia transportadora de elétrons, como a ubiquinona, se auto-oxidam dando lugar à perda de elétrons e consequente formação de radicais superóxido. Os anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) induzem a geração de radicais superóxido, via ativação da NADPH oxidase, complexo enzimático transmembrana gerador do radical superóxido. Li et al. (2008), demonstraram que mediante a administração AINE houve aumento na expressão de NADPH oxidase e

P22phox (subunidade necessária a ativação enzimática) em tecido cardíaco e aorta de ratos hipertensivos. Os autores ainda evidenciaram tais resultados em células endoteliais humanas (LI et al., 2008).

As radiações ionizantes promovem a instauração do estresse oxidativo, entre os mecanismos propostos destacam-se: a ativação das NADPH oxidases, a disfunção da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e a redução da atividade das enzimas antioxidantes, sobretudo da SOD-Mn. Lemon, Rollo e Boreham (2008). demonstraram maiores níveis de *8-Hidroxiyl-2'-Deoxyguanosine* (8-OHdG), marcador de dano oxidativo ao DNA (ácido nucléico guanina), em ratos submetidos à radiação gama (γ H2AX) proveniente de uma fonte radiotiva de césio (^{137}Cs). Outros estudos ratificam o efeito das radiações ionizantes sobre marcadores do estresse oxidativo, sobretudo os referentes ao dano oxidativo ao DNA, decorrentes dos processos mutagênicos, aberrações cromossômicas, instabilidade genômica e alterações teloméricas (LEMON; ROLLO; BOREHAM, 2008).

O acúmulo de metais pesados em um sistema biológico propicia a catálise de reações que culminam na geração de espécies reativas de oxigênio, e ainda pode exercer influência sobre os mecanismos de defesa antioxidante, sobretudo o enzimático. Farombi, Adelowo e Ajimoko (2007), por meio de espectrofotometria de absorção atômica, evidenciaram a presença de altos níveis de metais pesados (arsênio, chumbo, cádmio, cobre e zinco) nas águas do rio Ogun (Nigéria, África). Posteriormente, demonstraram que nos peixes nativos deste rio houve diminuição da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, alterações no ciclo redox da glutathiona e, ainda, indução da peroxidação lipídica (FAROMBI; ADELOWO; AJIMOKO, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTOS E PROCEDIMENTOS INICIAIS

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado utilizando o GPower 3.1.9.4 (FAUL, 2007). O objetivo do estudo foi verificar as diferenças entre 3 grupos de animais suplementados com selênio. Foi utilizado um poder de amostra de 80% e um erro de 10% para medidas quantitativas e amostras dependentes, considerando cenário de expectativa de diferenças de 50%.

O uso dos ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) no processo 2020/0241818 sob o protocolo 20.000016330-1. Dessa forma, 48 animais provieram do Biotério Central da UEPG de tal forma que 36 eram ratas (fêmeas) com idade de 3 meses com peso médio de $232,7\text{g} \pm 17,4$ (IC 95%; $p = 0,09$) variando entre 226,7g e 238,5g. Todo o material biológico foi mantido no biotério supracitado em constantes condições de luminosidade (12h luz/12h escuro) e ambiente climatizado.

Os animais foram acondicionados em caixas-padrão com forragem de maravalha e disponibilidade de água e ração comercial constantes. As ratas foram divididas em 3 grupos de acordo com a suplementação de selênio, de modo que cada grupo contou com 12 ratas, a saber:

- G0 (grupo controle): recebeu 0,5 mL de soro fisiológico por gavagem;
- G1 (grupo 1): recebeu 0,2 mL de selênio quelado (48 μg) dissolvidos em 0,3 mL de soro fisiológico por gavagem;
- G2 (grupo 2): recebeu 0,4 mL de selênio quelado (96 μg) dissolvidos em 0,1 mL de soro fisiológico por gavagem.

Cada grupo foi subdividido em 4 caixas com 3 ratas cada. Para identificação das ratas, realizou-se marcação nos rabos com caneta atóxica (ausência de marcação, um anel ou dois anéis).

A duração total do experimento foi de seis semanas.

Entre a segunda e a sexta semana, realizou-se, também, gavagem. Para isto, utilizou-se agulha de gavagem, seringa 1 mL, soro fisiológico para diluição e selênio quelado 240 $\mu\text{g/L}$ solubilizado em glicerol. No início da 5ª semana, houve exposição

aos machos, sendo um rato em cada caixa. Esta fase ocorreu durante duas semanas.

Ao final da 6ª semana, realizou-se a eutanásia das ratas. Nesta, imergiu-se os animais em recipiente contendo anestésico inalatório isoflurano 1 mL/mL e, após a anestesia, cada rata foi submetida a transecção toracoabdominal através de bisturi. Posteriormente, realizou-se punção cardíaca para coleta sanguínea e análise bioquímica. Houve a retirada do fígado, pulmão, ovário e útero para outros trabalhos. Além disso, foi realizada a decapitação dos animais para a retirada do cérebro. O lobo frontal foi encaminhado para análise imunohistoquímica, enquanto o restante do órgão foi preservado para análises histológicas e de estresse oxidativo. As amostras destinadas para a análise histológica foram armazenadas em formol em temperatura ambiente, enquanto as destinadas para a análise bioquímica foram acondicionadas em soro fisiológico 0,9% e armazenadas em supercongelador a -80°C. Todo material colhido foi devidamente identificado a fim de evitar vieses.

3. 2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após serem descongelados para os ensaios bioquímicos do estresse oxidativo, os órgãos foram colocados em Eppendorf, e o peso de cada amostra foi obtida (ANEXO A). Então, foi realizado o preparo dos tecidos (homogenato), em que foram homogeneizados em tampão Tris/HCl 50mM pH 7.4 na seguinte proporção (Tabela 1):

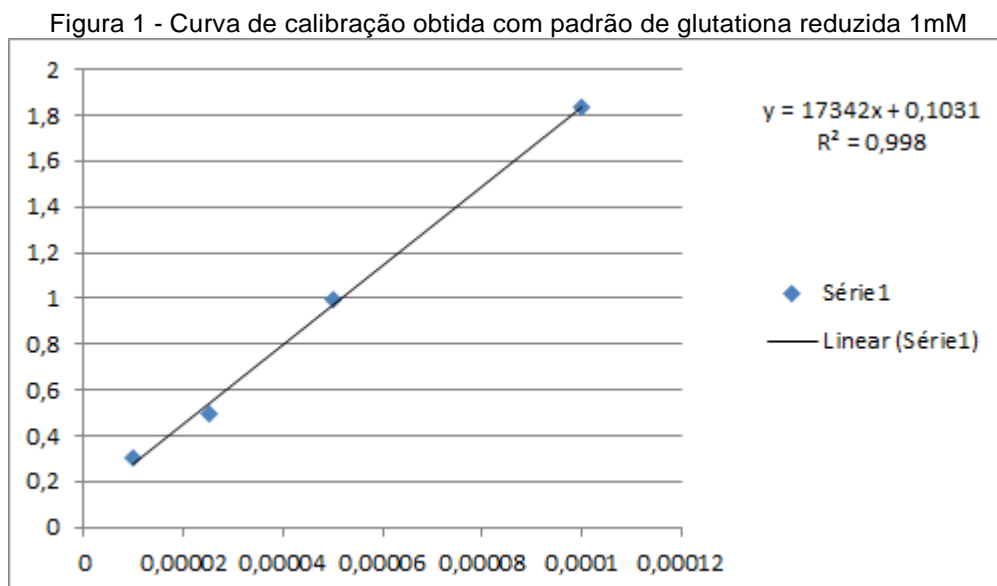
Tabela 1 - Volume de Tris/HCl 50mM por grama de amostra nos órgãos

Órgão	Volume de Tris/HCl 50mM por grama de amostra
Cérebro	5ml
Fígado	10ml
Pulmão	5ml
Ovário	10ml

Fonte: O autor

Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm, pelo equipamento vórtex. O sobrenadante foi coletado e denominado como S1.

Para a determinação da concentração do tiol não proteico (NPSH), realizou-se a quantificação de grupos sulfídricos não-protéicos (SH-NP) nos tecidos dos ratos (ELLMAN, 1959). Uma alíquota do S1 foi misturada (1:1) com ácido tricloroacético (TCA) 10% (500 μ L do S1+ 500 μ L de TCA 10%), homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. Os grupos sulfídricos não protéicos foram determinados a partir do sobrenadante. A esta fração de sobrenadante foi adicionado o tampão fosfato de potássio 1M, pH 7.4, e DTNB 10mM (*5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)*). A mistura foi agitada e lida em espectrofotômetro a $\lambda = 412$ nm (triplicata). Uma curva de calibração (Tabela 2) foi obtida com padrão de glutatona reduzida 1mM (GSH, Sigma Aldrich[®]) e os resultados expressos como micrograma de SH-NP/grama de tecido (μ g SH-NP. g tecido⁻¹):



Para quantificação de grupos sulfidrídricos não-proteicos (SH-NP) no soro dos ratos, a partir de 25 μ L de soro, adicionou-se 625 μ L de tampão Tris/HCl (0,1 M, pH 8,2), 75 μ L de água destilada e 25 μ L de DTNB (*5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*) (0,124 mM). A mistura foi agitada, incubada por 15 minutos ao abrigo da luz e a absorbância lida em espectrofotômetro a $\lambda=412$ nm (as leituras foram feitas em triplicata). Os resultados foram expressos em micromol de SH-NP/ mililitro de soro (μ mol SH-NP.mL soro⁻¹) (ELLMAN, 1959).

A determinação dos níveis de lipoperoxidação (TBARS) foi realizada a partir da fração de 200 μ L de S1, no qual foram adicionados uma mistura de 500 μ L de

ácido tiobarbitúrico (0,8%), 200 µL de sódio dodecilsulfato (8,1%) e 500 µL de tampão ácido acético (pH 3,4). Estas misturas foram incubadas durante 2 horas a 95°C. O Malondialdeído (MDA), formado como um produto final da lipoperoxidação, serviu como índice da intensidade da lipoperoxidação. Como o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico gerando um produto colorido, foi então medido a concentração de MDA por tecido, através de análise óptica na comprimento de onda de 532 nm. Uma curva de calibração foi obtida com padrão de MDA 0,3 nM e os resultados expressos como nanomoles de MDA por miligrama de tecido (ACKER, 2012).

Através da espectrofotometria realizou-se a determinação da atividade da catalase (CAT), a qual avalia a depreciação do peróxido de hidrogênio no homogenato (S1) em 420 nm (PACKER, 1984). A reação enzimática iniciou-se pela adição de 100 µL de S1 e peróxido de hidrogênio 0,3 mM para um meio contendo tampão de fosfato de Potássio 50 mM pH 7.0. A atividade da catalase é obtida por meio da diferença da absorvância das leituras entre o intervalo de tempo 0 e 120 segundos, proporcional a velocidade da reação enzimática catalisada pela catalase.

A determinação de concentração de peróxido foi realizada a partir de 4 métodos diferentes (mM H₂O₂/g de tecido/min; mM H₂O₂/ml de S1/min; k/g/min; k/min):

- O cálculo da atividade da catalase foi realizado segundo a seguinte equação (MINOZZO, 2015; RAVISKI, 2016):

(1)

$$CAT = \Delta_{abs(min)} / (V * C)$$

Onde:

$\Delta_{abs(min)}$ = $Abs^0 - Abs^{120}$ ($\Delta_{abs(min)}$ – variação das absorvâncias em minutos, Abs^0 = absorvância no tempo zero e Abs^{120} = absorvância em 120 segundos);

$V = v * d$ (V = volume de amostra utilizada, v = volume em mL, d = diluição da amostra);

C = coeficiente de Extinção do peróxido de hidrogênio.

Os resultados foram expressos em mM H₂O₂/g de tecido/min (MINOZZO, 2015) e em mM H₂O₂/ml de S1/min (RAVISKI, 2016).

A atividade enzimática foi expressa como unidades por miligrama de tecido (1 U decompõe 1 mmol de H₂O₂ por minuto pH 7.0 e 25°C) (ACKER, 2012).

A velocidade com que H₂O₂ é degradado pela catalase é a medida do desempenho da enzima, o que leva a redução da absorbância em 240nm (NETO, 2008). Em um espaço de tempo, através do intervalo entre as leituras das absorbâncias a 240nm, pode-se determinar a velocidade de redução do peróxido de hidrogênio, que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT (NETO, 2008).

O cálculo da atividade da CAT foi feito pela seguinte equação (NETO, 2008; PACKER, 1984):

(2)

$(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log a_1/a_2)$ Onde:

Δt é a variação do tempo de reação (120s), a é o volume de S1 na cubeta, b é a quantidade de tecido na amostra em g/dL, a_1 é o valor da absorbância no tempo zero ($t = 0$) e a_2 é o valor da absorbância no tempo final ($t = 120s$). A unidade final expressa-se em k/g/min. Outro cálculo utilizado para aferição da atividade da CAT foi (COHEN, 1970):

(3)

$$k = \text{Log} (S_0/S_2) \times 2,3/t,$$

Onde:

t é tempo (2 min), S_0 é o valor da absorbância no tempo zero ($t = 0$) e S_2 é o valor da absorbância no tempo final ($t = 2\text{min}$), os resultados são expressos em termos da constante de reação de primeira ordem (k/min).

3.3 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

Os encéfalos foram fixados em Paraformaldeído 4%, em PBS, pH 7,4, por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em Xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5 μ m dos encéfalos foram depositados em lâminas carregada positivamente (Imunoslide, Easypath®). Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol, e processados para coloração panocítica

de hematoxilina e eosina e imunohistoquímica. Na imunomarcção os cortes reidratados foram incubados com 3% H₂O₂ em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato de Sódio 10 mM, pH 6.0, à 95° C, por 40 minutos. Possíveis ligações não específicas, bem como radicais aldeídicos livres foram bloqueados pela incubação de 5 minutos com PBS contendo 1% de BSA e por PBS contendo 0,1M de Glicina, respectivamente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 12 horas à 4°C com os anticorpos primários. Os anticorpos primários utilizados e suas diluições foram: anti-NF Kaopa Beta (Santa Cruz IgG policlonal de coelho, diluído 1:200), Caspase-3 (Biocare Medical CP229, IgG de Coelho, diluído 1:100), COX-2 (Biocare Medical CRM 306 A, IgG de Coelho, diluído 1:100), CD68 (Cell Marque KP1 monoclonal de camundongo, diluído 1:500), GFAP (Cell Marque policlonal de coelho, diluído 1:500), BCL-2 (Cell Marque 124 monoclonal de camundongo, diluído 1:200).

Após o término do tempo de incubação, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários específicos (exceto a proteína de ligação, pois já é biotinilada e nesse caso foi incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos). Os anticorpos secundários utilizados foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo eles: anticorpo secundário biotinilado de coelho contra IgG de cabra (Vector Laboratories, BA-500, diluído 1:200), após a incubação com os respectivos anticorpos secundários foi realizada a incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos. A revelação da ligação dos anticorpos primários foi realizada com DAB ("3,3'-diaminobenzidine).

3.4 LEITURA DAS LÂMINAS

Foram avaliadas 245 laminas analisadas provenientes de 25 cérebros, visto que, houve perda de material, ou seja, um cérebro foi avariado. Utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica, com aumento de lente de 200 vezes, separando em seis quadrantes de 5000 pixels, visando padronizar a contagem das células.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva das variáveis com estimativa de média, mediana, desvio padrão e intervalo interquartil das variáveis no geral. Em seguida, realizou-se o teste Shapiro-Wilk para distribuição normal e optou-se pela abordagem não paramétrica dos dados quando $p < 0,05$ e abordagem paramétrica quando $p > 0,05$. As diferenças entre grupos foram verificadas com ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido de Tukey ou Dunn como comparações múltiplas. Para melhor visualização dos resultados, produziu-se gráficos do tipo boxplot diferenciando-se entre os grupos. Os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$ e as análises foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2019).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Frente à análise descritiva, observa-se que os marcadores de estresse oxidativo, apresentaram pouca variação entre as amostras.

Como mostra a Tabela 1, em relação ao marcador TIOL, obteve-se uma média de 45,553 com desvio Padrão de 22,907 e mediana de 44,643. O marcador TBARS, obtivemos uma média de 0,470 com desvio padrão de 0,443 e mediana 0,425. O marcador Catalase 1, obtivemos uma média 0,069 com desvio padrão 0,035 e mediana 0,071. O marcador Catalase 2, obtivemos uma média 0,014 com desvio padrão 0,007 e mediana 0,014. O marcador Catalase 3, obtivemos uma média 0,023 com desvio padrão 0,011 e mediana 0,024. Já o marcador Catalase 4, obtivemos uma média 0,046 com desvio padrão 0,022 e mediana 0,048.

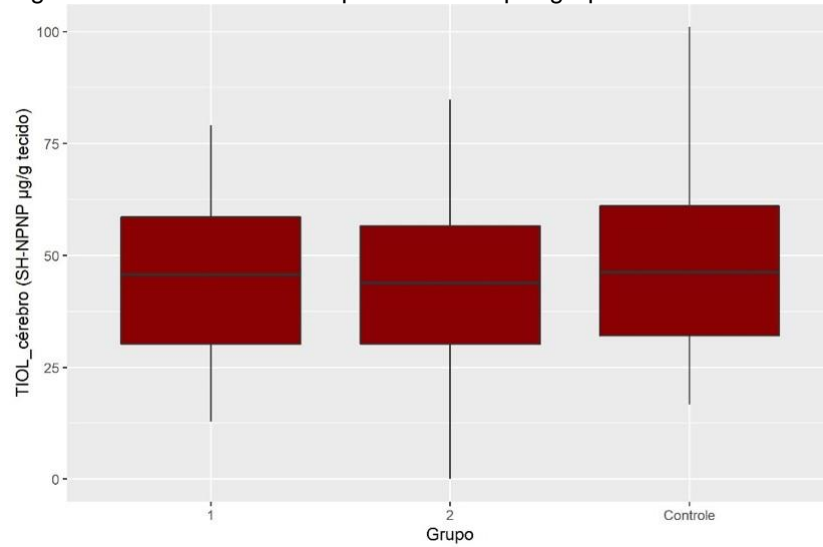
Tabela 2 - Análise descritiva

ENCÉFALO	Média	DP	Mediana	1Q	3Q	p-valor	Simetria
TIOL (SH-NPNP µg/g tecido ou µg/ml de soro)	45,553	22,907	44,643	29,264	62,032	0,97	Normal
TBARS (nM)	0,470	0,443	0,425	0,003	0,767	0,00	Assimétrico
CATALASE 1 (µ mol H ₂ O ₂ / g de tecido / minuto)	0,069	0,035	0,071	0,039	0,098	0,45	Normal
CATALASE 2 (µ mol H ₂ O ₂ / ml S1 / minuto)	0,014	0,007	0,014	0,008	0,020	0,45	Normal
CATALASE 3 (k/g/min)	0,023	0,011	0,024	0,014	0,031	0,43	Normal
CATALASE 4 (k/min)	0,046	0,022	0,048	0,028	0,062	0,43	Normal

Fonte: O autor

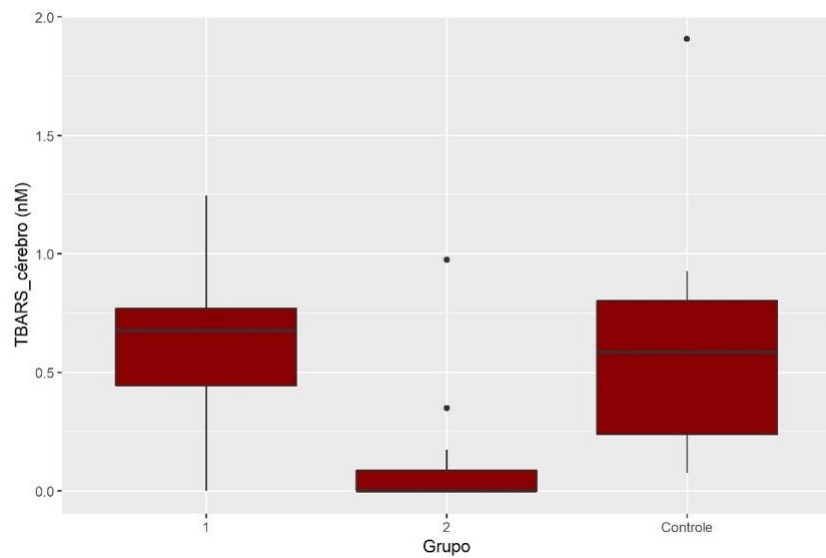
Abaixo demonstramos em gráficos tipo boxplot, para melhor visualização dos resultados, de cada marcador e sua mensuração em cada grupo.

Figura 2 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável TIOL



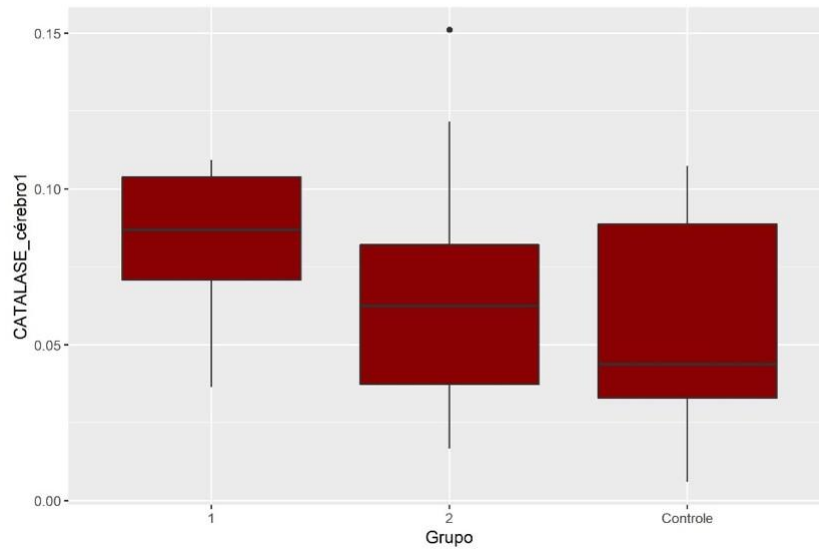
Fonte: O autor

Figura 3 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável TBARS



Fonte: O autor

Figura 4 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável CATALASE



Fonte: O autor

4.2 ANÁLISE INFERENCIAL

Na análise inferencial, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as variáveis do TIOL e catalase em quaisquer dos métodos utilizados ($p > 0,05$), demonstrada na Tabela 2.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no TBARS no cérebro ($p = 0,003$). No cérebro, o grupo 2 foi significativamente inferior ao grupo controle ($0,010$) e grupo 1 ($0,005$), entre o grupo 1 e o controle não houve diferença significativa ($p = 0,726$), demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise inferencial

ENCEFALO	Grupo															p-valor entre grupos
	1					2					Controle					
	M	MD	1Q	3Q	DP	M	MD	1Q	3Q	DP	M	MD	1Q	3Q	DP	
TIOL	44,36	45,71	28,34	59,86	21,16	44,37	43,87	29,26	62,03	24,74	47,83	46,22	27,99	61,43	24,68	0,919
TBARS	0,64	0,68	0,44	0,77	0,32	0,14	0,00	0,00	0,17	0,30	0,61	0,59	0,20	0,84	0,51	0,003
CATALASE 1	0,08	0,09	0,07	0,10	0,02	0,07	0,06	0,04	0,09	0,04	0,06	0,04	0,03	0,09	0,04	0,147
CATALASE 2	0,02	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,147
CATALASE 3	0,03	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,01	0,551
CATALASE 4	0,05	0,06	0,04	0,06	0,01	0,04	0,04	0,02	0,06	0,03	0,04	0,04	0,03	0,06	0,02	0,551

Fonte: O autor

Tabela 4 - Análise comparativa entre os grupos
P-VALOR COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS **TBARS CÉREBRO**

1 x 2	0,005
Controle x 1	0,726
Controle x 2	0,010

Fonte: O autor

Com relação aos resultados da análise estatística descritiva dos sete marcadores imunohistoquímicos, demonstrado na Tabela 4, temos o marcador BCL-2 com média de 6,1%, mediana de 2,3%, desvio padrão de 8,2% e p-valor teste de normalidade < 0,001. O marcador HE temos com média de 18,7%, mediana de 18,7%, desvio padrão de 7,4% e p-valor teste de normalidade 0,94. O marcador CASP com média de 1,1%, mediana de 0,0%, desvio padrão de 3,7% e p-valor teste de normalidade < 0,001. O marcador CD68, com média de 21,1%, mediana de 20,8%, desvio padrão de 10,9% e p-valor teste de normalidade 0,10. O marcador COX com média de 8,1%, mediana de 7,0%, desvio padrão de 8,1% e p-valor teste de normalidade < 0,001. O marcador NFkB, com média de 7,3%, mediana de 6,1%, desvio padrão de 7,9% e p-valor teste de normalidade < 0,001. Já o marcador GFAP, obteve como média de 21,6%, mediana de 20,6%, desvio padrão de 9,8% e p-valor teste de normalidade 0,35.

Tabela 5 - Análises estatísticas descritivas dos marcadores imunohistoquímicos

Variável	N	M	MD	Mín	Máx	DP	1Q	3Q	IIQ	p-valor teste de normalidade*
BCL-2	35	6,1%	2,3%	0,0%	27,3%	8,2%	0,0%	9,1%	9,1%	<0,001
HE	35	18,7%	19,4%	3,4%	33,9%	7,4%	13,9%	22,7%	8,7%	0,94
CASP	35	1,1%	0,0%	0,0%	14,3%	3,7%	0,0%	0,0%	0,0%	<0,001
CD68	34	21,1%	20,8%	0,0%	38,0%	10,9%	13,6%	32,1%	18,5%	0,10
COX	35	8,1%	7,0%	0,0%	26,4%	8,1%	0,0%	14,3%	14,3%	<0,001
NFkB	35	7,3%	6,1%	0,0%	26,7%	7,9%	0,0%	11,6%	11,6%	<0,001
GFAP	35	21,6%	20,6%	0,0%	45,5%	9,8%	17,0%	26,8%	9,8%	0,35

Fonte: O autor

*Teste Shapiro-Wilk

Comparando os marcadores e seus grupos separadamente, observados valores variáveis, não demonstrando uma ordem lógica, demonstrado na tabela 5. Com

relação ao marcador BCL-2, temos no grupo controle, tratado 1 e tratado 2 respectivamente, uma média de 5; 7,4 e 5,7, com mediana 0,0; 2,3 e 4,7, e desvio padrão de 8,7; 10,0 e 5,9. O marcador HE, temos no grupo controle, tratado 1 e tratado 2 respectivamente, uma média de 19,9; 17,1 e 19,3, com mediana 22,4; 15,8 e 19,4, e desvio padrão de 8,2; 7,7 e 6,6. O marcador CASP, temos no grupo controle, tratado 1 e tratado 2 respectivamente, uma média de 0,9; 0,0 e 2,6, com mediana 0,0 para os 3 grupos e desvio padrão de 3,0; 0,0 e 5,7. O marcador CD68, temos no grupo controle, tratado 1 e tratado 2 respectivamente, uma média de 18,7; 21,8 e 23,3, com mediana 17,0; 21,7 e 23,4 e desvio padrão de 7,8; 12,2 e 12,8. O marcador COX, temos no grupo controle, tratado 1 e tratado 2 respectivamente, uma média de 11,9; 7,2 e 4,8, com mediana 11,3; 2,2 e 3,7 e desvio padrão de 8,3; 8,6 e 5,9. O marcador NFkB, temos no grupo controle, tratado 1 e tratado 2 respectivamente, uma média de 4,3; 9,8 e 7,9, com mediana 0,0; 7,9 e 7,9 e desvio padrão de 7,2; 9,1 e 6,9. Já o marcador GFAP, temos no grupo controle, tratado 1 e tratado 2 respectivamente, uma média de 22,0; 19,8 e 23,3, com mediana 20,5; 20,0 e 20,6 e desvio padrão de 6,8; 12,1 e 10,5.

Tabela 6 - Análises estatísticas descritivas dos marcadores separas por grupo

(continua)

Marcador	Grupo	M	MD	DP	IIQ	p- valor entre grupos
BCL-2	Controle	5,0	0,0	8,7	5,4	0,693**
	Tratado 1	7,4	2,3	10,0	10,4	
	Tratado 2	5,7	4,7	5,9	8,1	
HE	Controle	19,9	22,4	8,2	9,0	0,634*
	Tratado 1	17,1	15,8	7,7	8,3	
	Tratado 2	19,3	19,4	6,6	5,0	
CASP	Controle	0,9	0,0	3,0	0,0	0,287**
	Tratado 1	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Tratado 2	2,6	0,0	5,7	0,0	
CD68	Controle	18,7	17,0	7,8	6,6	0,609*
	Tratado 1	21,8	21,7	12,2	19,0	
	Tratado 2	23,3	23,4	12,8	18,3	

Fonte: O autor

Tabela 6 - Análises estatísticas descritivas dos marcadores separas por grupo (conclusão)

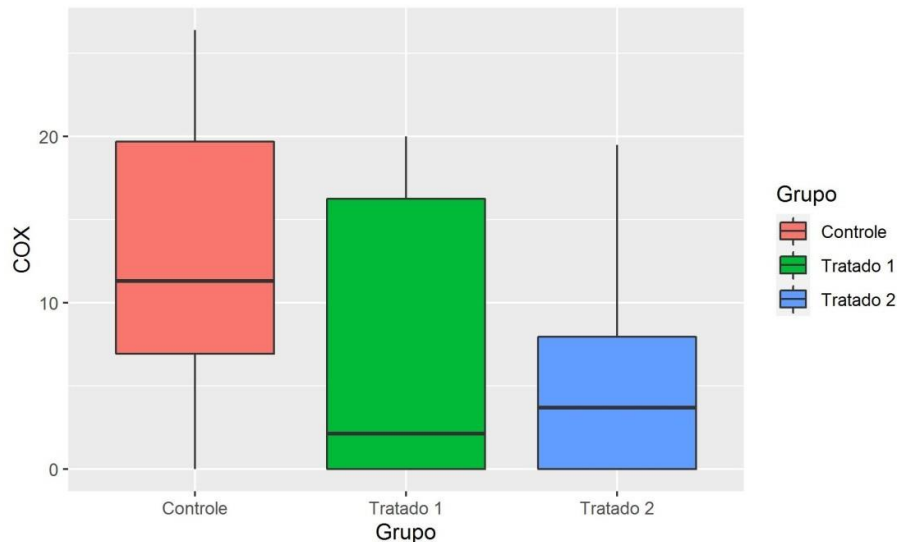
Marcador	Grupo	M	MD	DP	IIQ	p- valor entre grupos
COX	Controle	11,9	11,3	8,3	12,8	0,111**
	Tratado 1	7,2	2,2	8,6	16,3	
	Tratado 2	4,8	3,7	5,9	8,0	
NFKB	Controle	4,3	0,0	7,2	5,7	0,240**
	Tratado 1	9,8	9,8	9,1	13,8	
	Tratado 2	7,9	9,8	6,9	11,6	
GFAP	Controle	22,0	20,5	6,8	5,8	0,692*
	Tratado 1	19,8	20,0	12,1	13,0	
	Tratado 2	23,3	20,6	10,5	12,2	

Fonte: O autor

M=média; MD=mediana; DP=desvio padrão; IIQ=intervalo interquartil; *ANOVA na abordagem paramétrica; **Teste de Kruskal-Wallis (equivalente à ANOVA na abordagem não paramétrica).

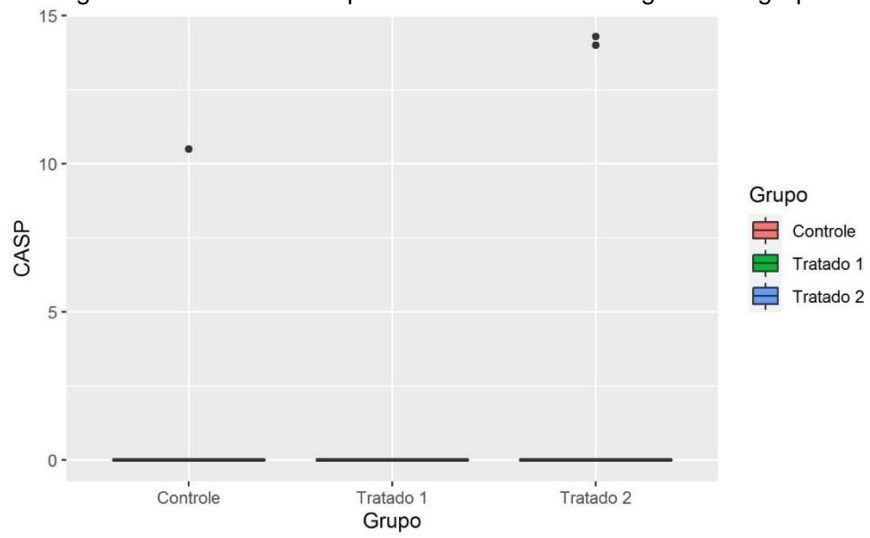
Abaixo demonstramos em gráficos tipo boxplot, para melhor visualização dos resultados, de cada marcador e sua mensuração em cada grupo.

Figura 5 - Gráfico de boxplot da variável COX segundo os grupos



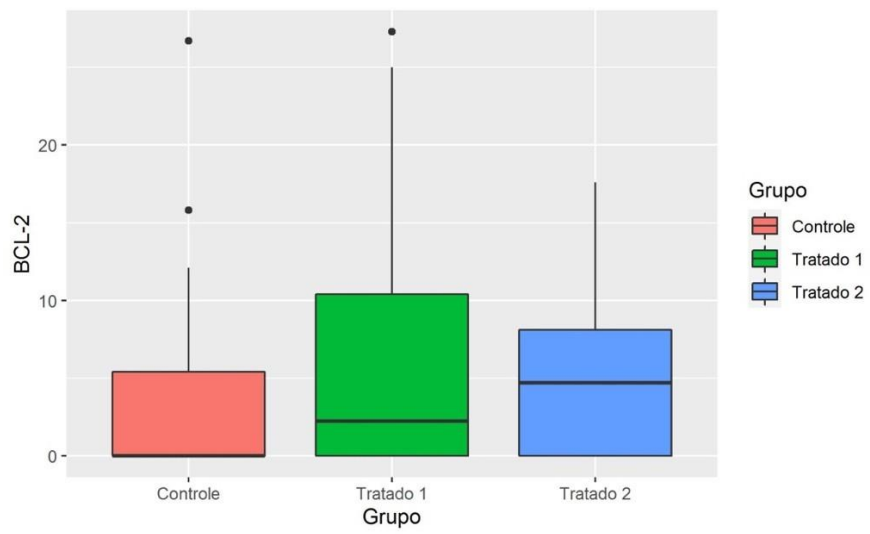
Fonte: O autor

Figura 6 - Gráfico de boxplot da variável CASP segundo os grupos



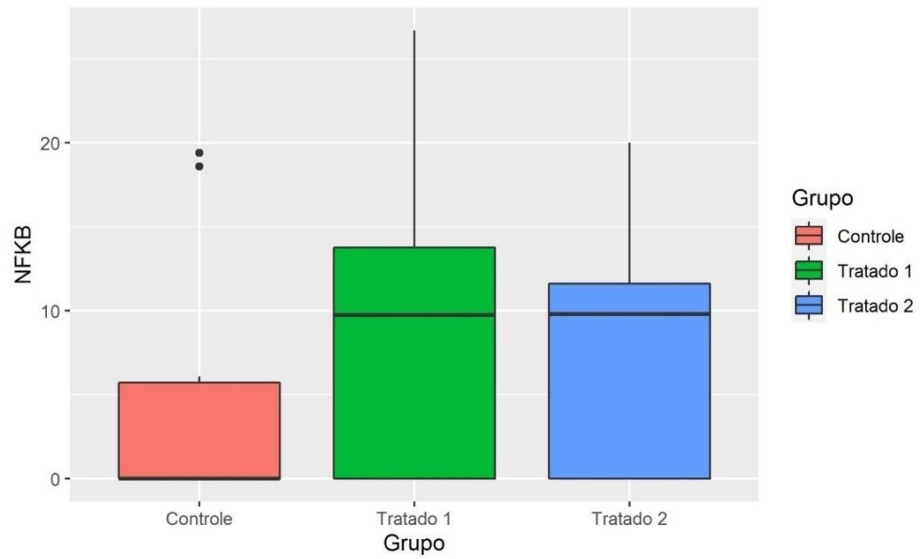
Fonte: O autor

Figura 7 - Gráfico de boxplot da variável BCL-2 segundo os grupos



Fonte: O autor

Figura 8 - Gráfico de boxplot da variável NFKB segundo os grupos



Fonte: O autor

Figura 9 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável GFAP

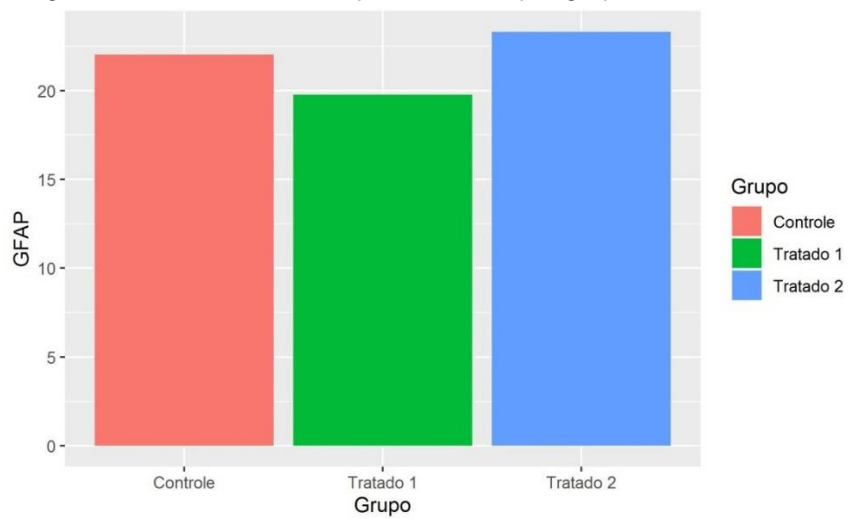
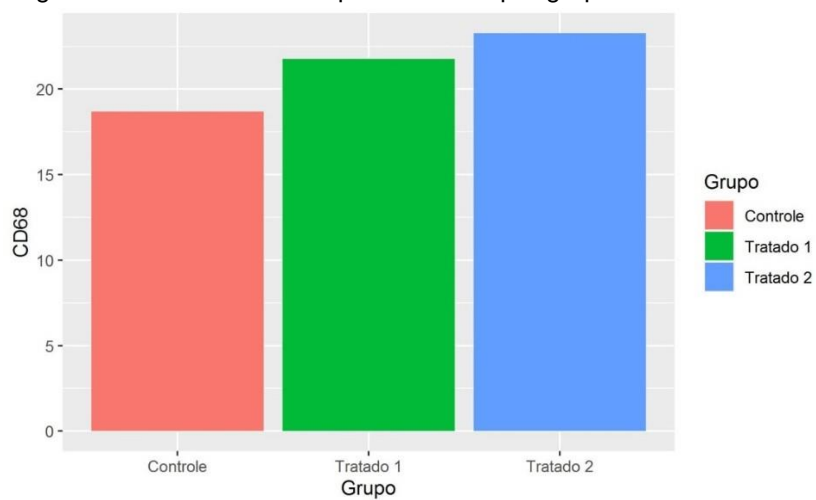
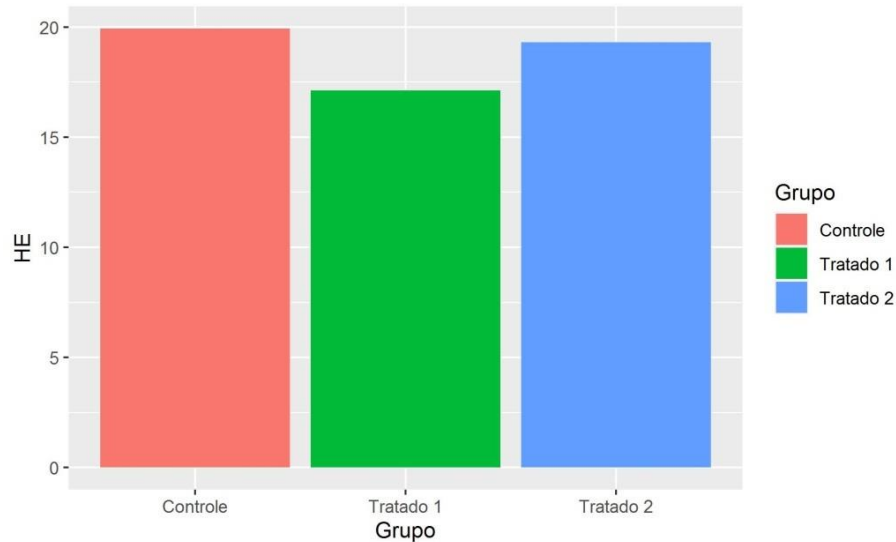


Figura 9. Gráfico de barras para a média por grupo da variável CD68



Fonte: O autor

Figura 10 - Gráfico de barras para a média por grupo da variável HE



Fonte: O autor

4.3 ANÁLISE DO HEMOGRAMA

Abaixo demonstramos a análise estatística descritiva do hemograma e suas divisões por grupo.

Tabela 7 - Análises estatísticas descritivas do hemograma

Variável	M	MD	DP	IIQ	p-valor teste de normalidade*
RBC ($10^6/uL$)	7,51	7,48	0,47	0,62	1
HGB (g/dL)	14,22	14,20	0,83	1,10	0,045
HCT (%)	47,13	46,60	3,11	3,60	0,500
RDW-CV (%)	14,21	13,80	1,08	1,20	<0,001
MCV (fL)	62,81	62,50	2,19	3,20	0,470
MCH (pg)	18,95	19,00	0,50	0,50	0,097
MCHC (g/dL)	30,19	30,40	0,81	1,10	0,088
WBC ($10^3/uL$)	6,67	6,16	2,21	2,99	0,340
EO ($10^3/uL$)	0,11	0,10	0,052	0,07	0,084
EO (%)	1,65	1,60	0,65	0,80	0,350
BASO ($10^3/uL$)	0,017	0,02	0,011	0,01	<0,001
BASO (%)	0,25	0,20	0,14	0,10	<0,001
LYMPH ($10^3/uL$)	3,91	3,90	1,35	2,20	0,360
LUMPH (%)	61,60	61,60	8,89	12,70	0,660
MONO ($10^3/uL$)	0,63	0,64	0,34	0,48	0,820
MONO (%)	10,15	10,80	5,03	4,50	0,150
NEUT ($10^3/uL$)	1,52	1,51	0,55	0,55	0,570
NEUT (%)	25,55	25,00	7,20	8,05	0,085
PLT ($10^3/uL$)	555,91	557,00	107,99	122,00	0,860
MPV (fL)	8,23	8,30	0,35	0,40	0,270
RDW-SD (fL)	31,19	30,70	3,10	2,40	0,002

Fonte: O autor

*Teste Shapiro-Wilk

Tabela 8 - Análises estatísticas descritivas do hemograma separado por grupo

(continua)

Variável	Grupo	M	MD	DP	IIQ	p- valor entre grupos
RBC (10 ⁶ /uL)	Controle	7,7	7,7	0,5	0,5	0,272*
	Tratado 1	7,4	7,3	0,3	0,4	
	Tratado 2	7,4	7,5	0,6	0,9	
HGB (g/dL)	Controle	14,6	14,5	1,0	1,1	0,367**
	Tratado 1	14,0	14,1	0,5	0,8	
	Tratado 2	14,1	14,0	0,8	1,4	
HCT (%)	Controle	48,9	48,7	3,4	4,2	0,039*
	Tratado 1	46,9	46,6	2,2	1,9	
	Tratado 2	45,6	45,5	2,9	4,4	
RDW-CV (%)	Controle	14,5	14,7	0,8	1,2	0,069**
	Tratado 1	13,9	13,7	0,6	1,0	
	Tratado 2	14,2	13,6	1,6	0,8	
MCV (fL)	Controle	63,5	63,0	1,8	2,7	0,062*
	Tratado 1	63,3	63,5	2,3	2,8	
	Tratado 2	61,6	61,7	2,1	1,8	
MCH (pg)	Controle	18,9	18,9	0,3	0,3	0,958*
	Tratado 1	19,0	19,0	0,5	0,5	
	Tratado 2	19,0	18,9	0,7	0,5	
MCHC (g/dL)	Controle	29,8	30,0	0,8	1,3	0,002*
	Tratado 1	29,9	30,1	0,8	1,3	
	Tratado 2	30,8	30,8	0,5	0,5	
WBC (10 ³ /uL)	Controle	7,7	7,3	2,4	2,9	0,185*
	Tratado 1	6,2	6,1	2,5	3,2	
	Tratado 2	6,2	6,2	1,3	1,4	
EO (10 ³ /uL)	Controle	0,1	0,1	0,05	0,01	0,351*
	Tratado 1	0,1	0,08	0,07	0,1	
	Tratado 2	0,09	0,09	0,03	0,03	
EO (%)	Controle	1,7	1,6	0,6	0,9	0,623*
	Tratado 1	1,8	1,8	0,9	0,7	
	Tratado 2	1,5	1,5	0,4	0,8	
BASO (10 ³ /uL)	Controle	0,02	0,02	0,01	0,03	0,067**
	Tratado 1	0,01	0,01	0,005	0,01	
	Tratado 2	0,01	0,01	0,009	0,01	
BASO (%)	Controle	0,3	0,3	0,2	0,1	0,279**
	Tratado 1	0,2	0,2	0,05	0,1	
	Tratado 2	0,2	0,2	0,1	0,2	
LYMPH (10 ³ /uL)	Controle	4,3	4,2	1,6	1,3	0,260*
	Tratado 1	3,3	2,7	1,3	1,5	
	Tratado 2	4,1	4,5	1,1	1,6	
LUMPH (%)	Controle	60,2	61,6	8,9	6,1	0,155*
	Tratado 1	58,2	59,9	7,7	9,4	
	Tratado 2	65,6	69,4	9,0	14,9	
MONO (10 ³ /uL)	Controle	0,7	0,7	0,3	0,3	0,491*
	Tratado 1	0,6	0,5	0,3	0,3	
	Tratado 2	0,6	0,6	0,4	0,7	
MONO (%)	Controle	10,8	10,3	5,0	3,8	0,894*
	Tratado 1	9,9	10,7	2,2	2,1	
	Tratado 2	9,8	12,1	7,0	12,0	
NEUT (10 ³ /uL)	Controle	1,7	1,7	0,4	0,5	0,429*
	Tratado 1	1,5	1,4	0,7	0,5	
	Tratado 2	1,4	1,4	0,6	0,5	

Tabela 8 - Análises estatísticas descritivas do hemograma separado por grupo (conclusão)

Variável	Grupo	M	MD	DP	IIQ	p-valor entre grupos
NEUT (%)	Controle	26,2	25,3	4,6	7,0	0,256*
	Tratado 1	28,5	27,4	8,3	5,5	
	Tratado 2	23,0	23,5	7,6	8,2	
PLT (10 ³ /uL)	Controle	620,5	599,0	73,2	85,0	0,047*
	Tratado 1	524,1	536,0	105,3	115,0	
	Tratado 2	523,1	523,0	118,2	110,5	
MPV (fL)	Controle	8,3	8,3	0,3	0,3	0,173*
	Tratado 1	8,3	8,3	0,3	0,5	
	Tratado 2	8,1	8,2	0,4	0,7	
RDW-SD (fL)	Controle	32,0	31,3	2,0	3,3	0,080**
	Tratado 1	31,0	31,1	2,1	1,8	
	Tratado 2	30,6	29,7	4,6	2,0	

Fonte: O autor

M=média; MD=mediana; DP=desvio padrão; IIQ=intervalo interquartil; *ANOVA; **Teste de Kruskal-Wallis (equivalente à ANOVA na abordagem não paramétrica).

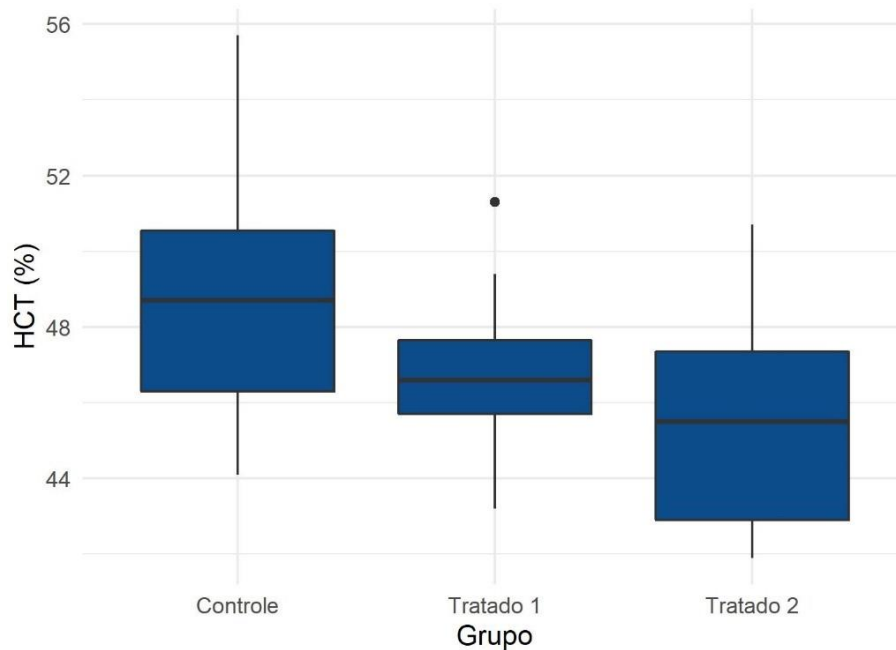
Tabela 9 - Comparações múltiplas nas variáveis em que a diferença entre grupos foi estatisticamente significativa

	HCT (%)	MCHC (g/dL)	PLT (10 ³ /uL)
Controle X Tratado 1	0,245	0,958	0,079
Controle X Tratado 2	0,031	0,004	0,076
Tratado 1 X Tratado 2	0,566	0,009	0,999

Fonte: O autor

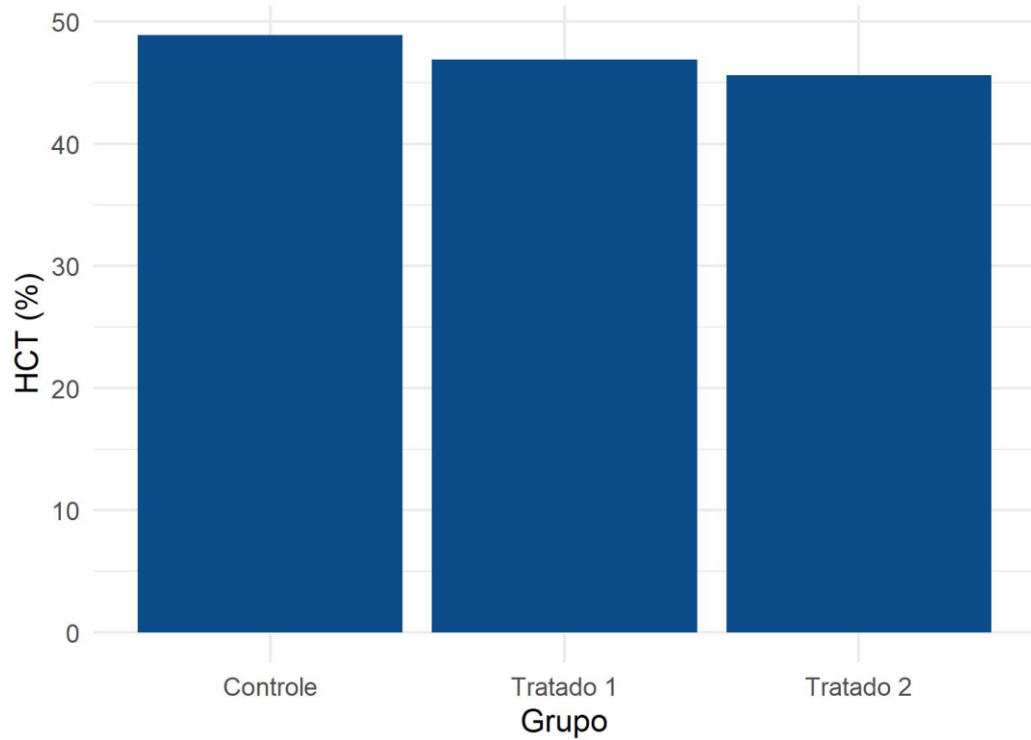
Teste de Tukey para comparações múltiplas

Figura 11 - Gráfico de boxplot da variável HCT (%) segundo os grupos



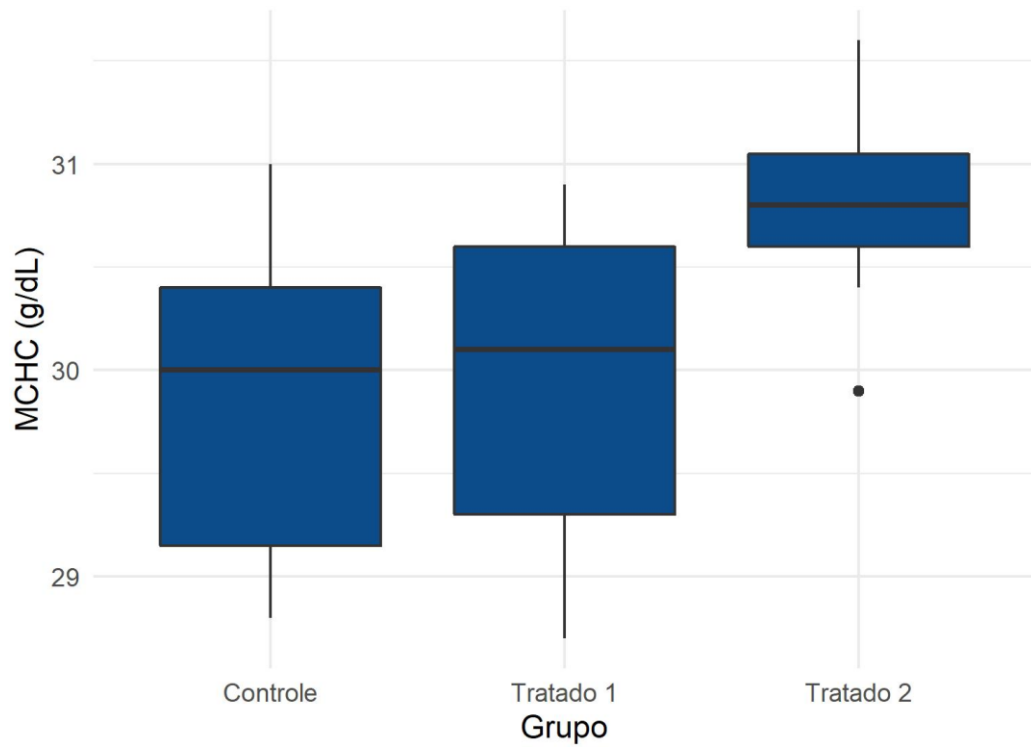
Fonte: O autor

Figura 12 - Gráfico de barras das médias de HCT (%) segundo os grupos



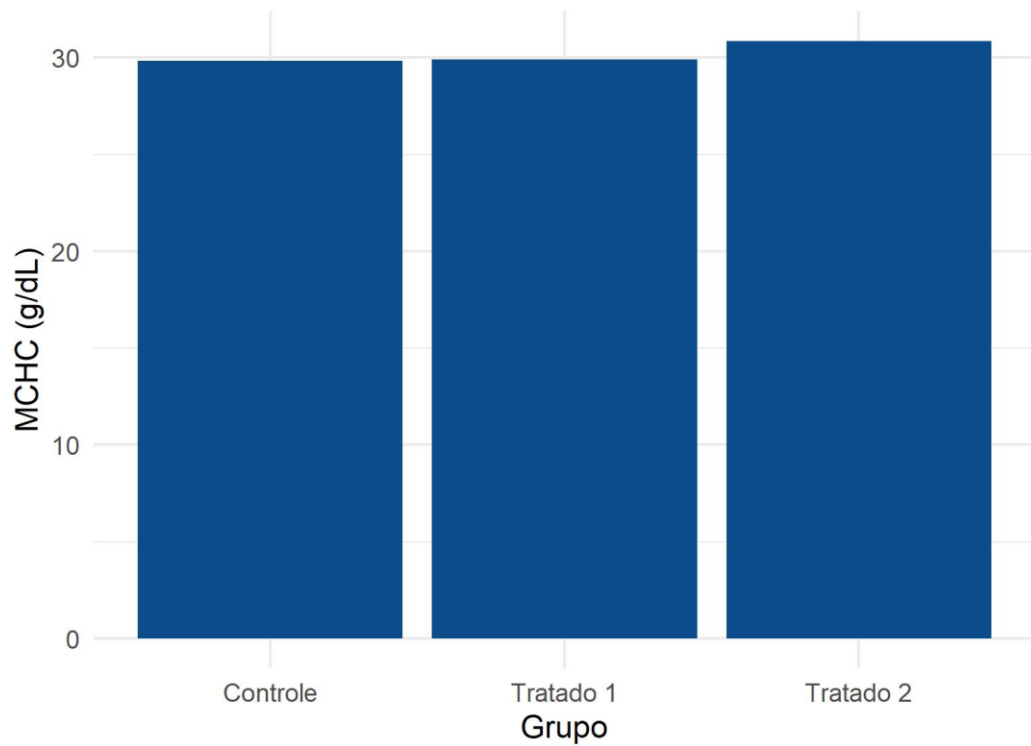
Fonte: O autor

Figura 13 - Gráfico de boxplot da variável MCHC (g/dL) segundo os grupos

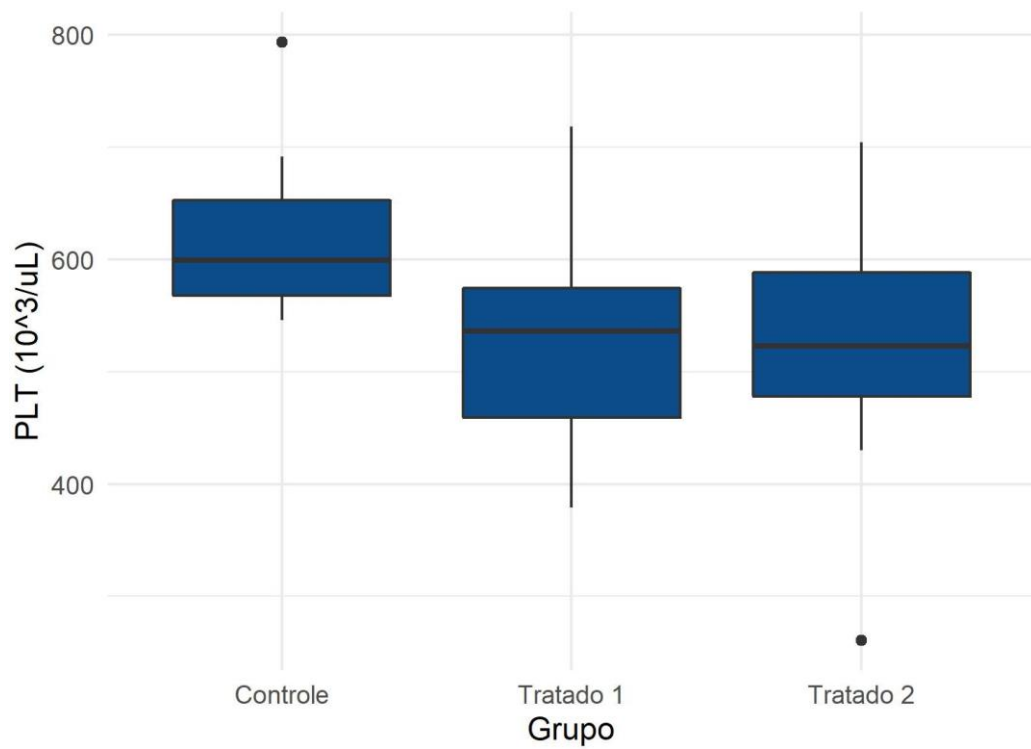


Fonte: O autor

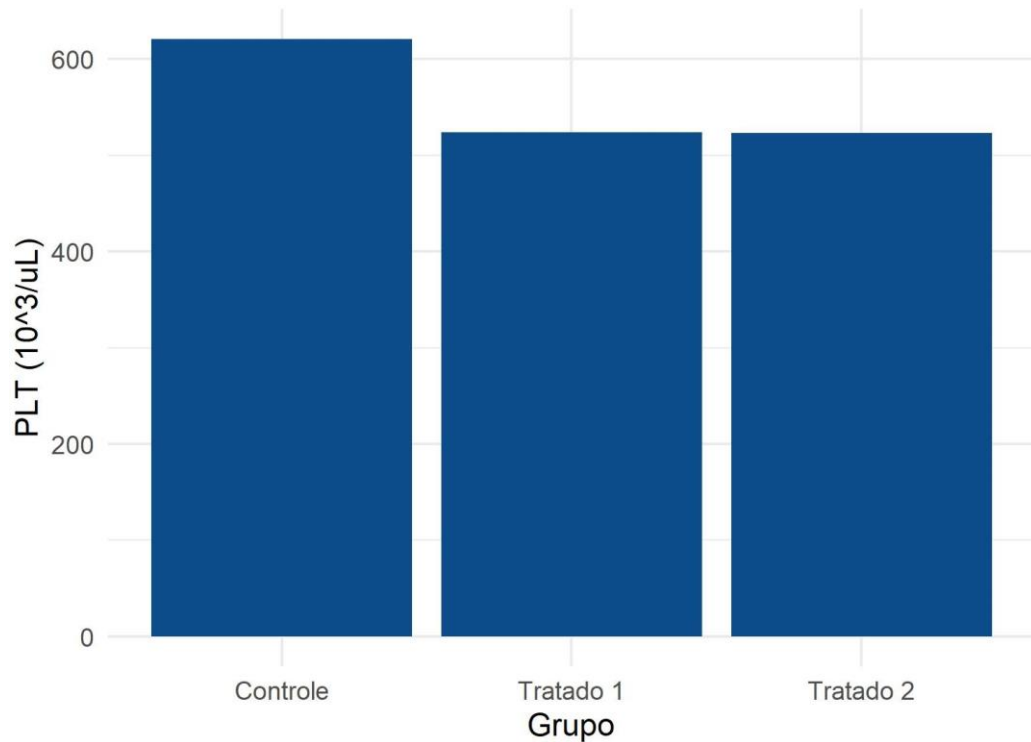
Figura 14 - Gráfico de barras das médias de MCHC (g/dL) segundo os grupos



Fonte: O autor

Figura 15 - Gráfico de boxplot da variável PLT ($10^3/uL$) segundo os grupos

Fonte: O autor

Figura 16 - Gráfico de barras das médias PLT ($10^3/uL$) segundo os grupos

Fonte: O autor

4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Abaixo demonstramos a análise estatística descritiva bioquímica e suas divisões por grupo.

Tabela 9 - Descritiva geral do exame bioquímico

Variável	M	MD	Mín	Máx	DP	IIQ	p-valor
Colesterol Total (mg/dL)	104,2	100,0	70,0	167,0	22,5	30,0	0,040
Colesterol HDL (mg/dL)	78,1	74,9	53,3	125,0	17,3	23,7	0,030
Triglicerídeos (mg/dL)	105,7	85,0	46,0	267,0	54,8	77,0	<0,001
TGO (UI/L)	141,5	123,5	81,0	349,0	54,7	56,2	<0,001
TGP (UI/L)	102,0	96,0	57,0	267,0	40,5	29,2	<0,001
Bilirrubina total (mg/dL)	0,05	0,04	0,0	0,09	0,02	0,04	0,200
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,03	0,03	0,0	0,06	0,01	0,02	0,030
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,02	0,02	-0,04	0,09	0,03	0,03	0,700
Ferro (mg/dL)	248,2	249,0	166,0	360,0	45,6	62,6	0,500
Homocisteína (mg/dL)	5,7	5,4	3,6	9,9	1,3	1,4	<0,001

Fonte: O autor

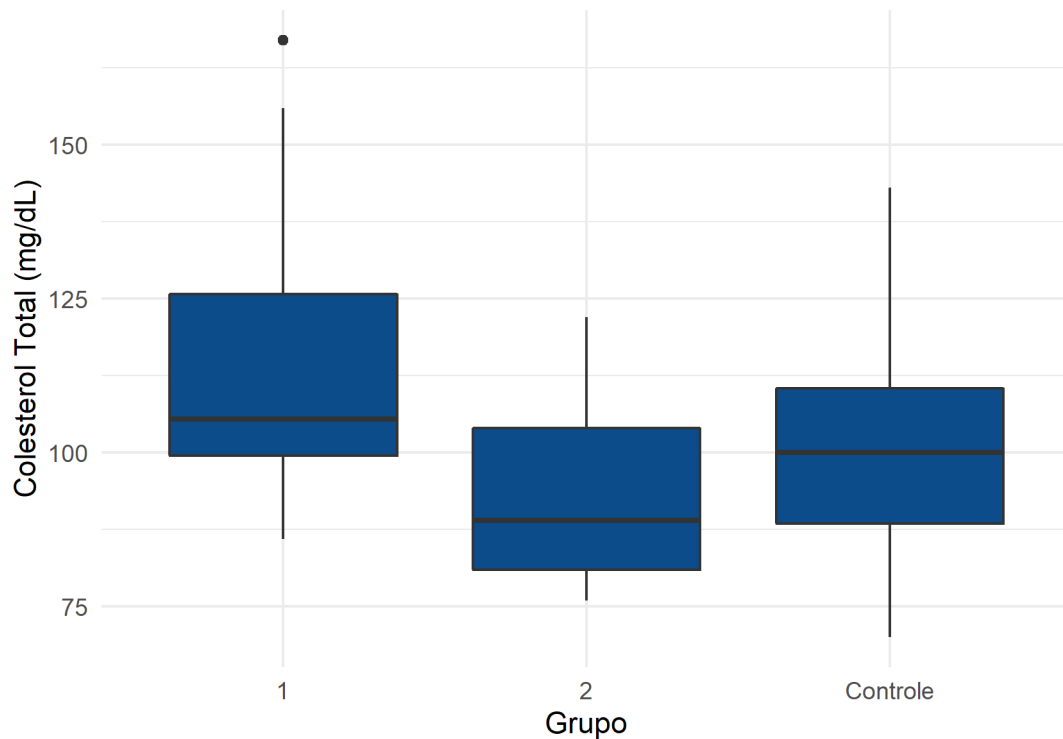
Tabela 10 - Descritiva do exame bioquímico de acordo com o grupo

	Controle				1				2				p-valor
	M	MD	DP	IIQ	M	MD	DP	IIQ	M	MD	DP	IIQ	
Colesterol Total (mg/dL)	101,5	100,0	20,2	22,0	115,6	105,5	25,5	26,2	94,2	89,0	16,3	23,0	0,070
Colesterol HDL (mg/dL)	75,8	73,9	15,1	15,7	87,3	78,3	19,4	21,4	70,3	66,0	12,9	17,5	0,069
Triglicerídeos (mg/dL)	118,2	111,0	45,3	63,5	76,2	70,0	25,3	14,0	125,2	82,0	74,2	109,5	0,027
TGO (UI/L)	133,0	125,0	37,6	52,0	148,0	120,5	70,0	35,2	142,8	136,0	54,2	81,0	0,903
TGP (UI/L)	106,4	98,0	57,2	32,5	95,0	93,0	29,2	33,2	105,0	98,0	33,3	18,0	0,728
Bilirrubina total (mg/dL)	0,036	0,03	0,019	0,015	0,044	0,035	0,028	0,042	0,062	0,06	0,016	0,02	0,029
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,026	0,03	0,012	0,015	0,031	0,035	0,014	0,012	0,037	0,03	0,017	0,02	0,163
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,01	0,01	0,018	0,025	0,013	0,015	0,035	0,054	0,025	0,02	0,026	0,02	0,439
Ferro (mg/dL)	257,7	263,0	49,1	53,5	240,3	229,0	50,1	51,5	247,1	251,0	38,6	58,5	0,6
Homocisteína (mg/dL)	5,5	5,5	0,7	1,2	5,5	5,2	1,7	1,1	5,8	5,5	1,4	1,1	0,7

Fonte: O autor

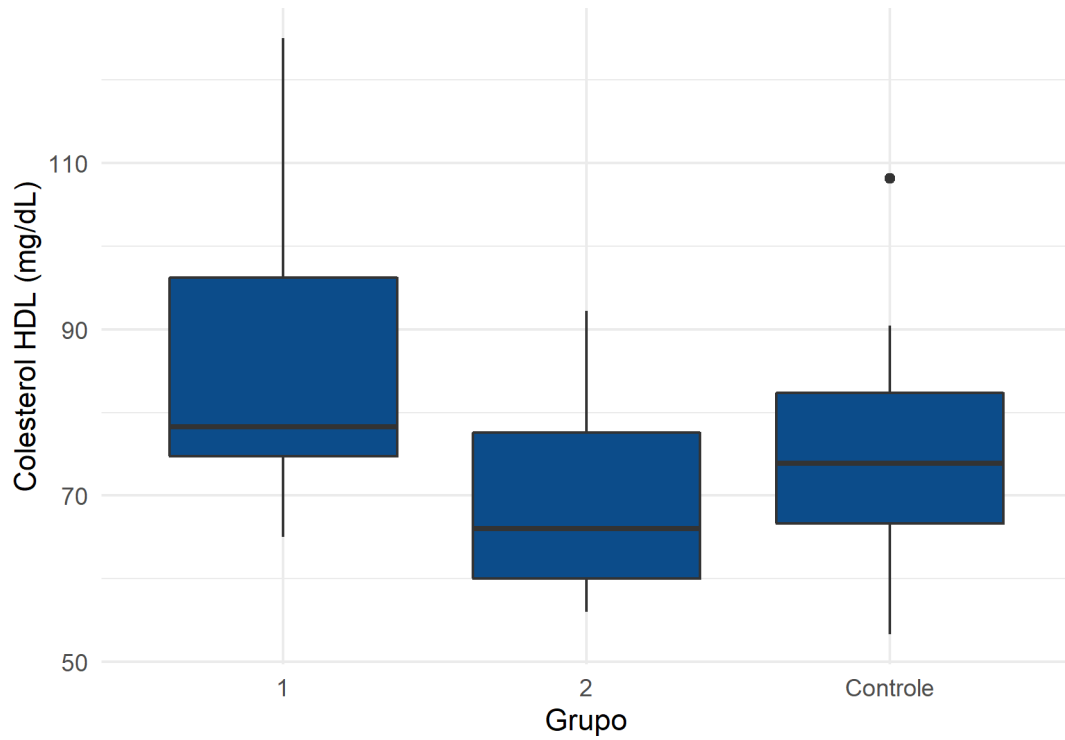
Para melhor visualização dos resultados, produziu-se gráficos do tipo boxplot diferenciando-se entre os grupos.

Figura 17 - Boxplot Colesterol Total (mg/dL) de acordo com o grupo



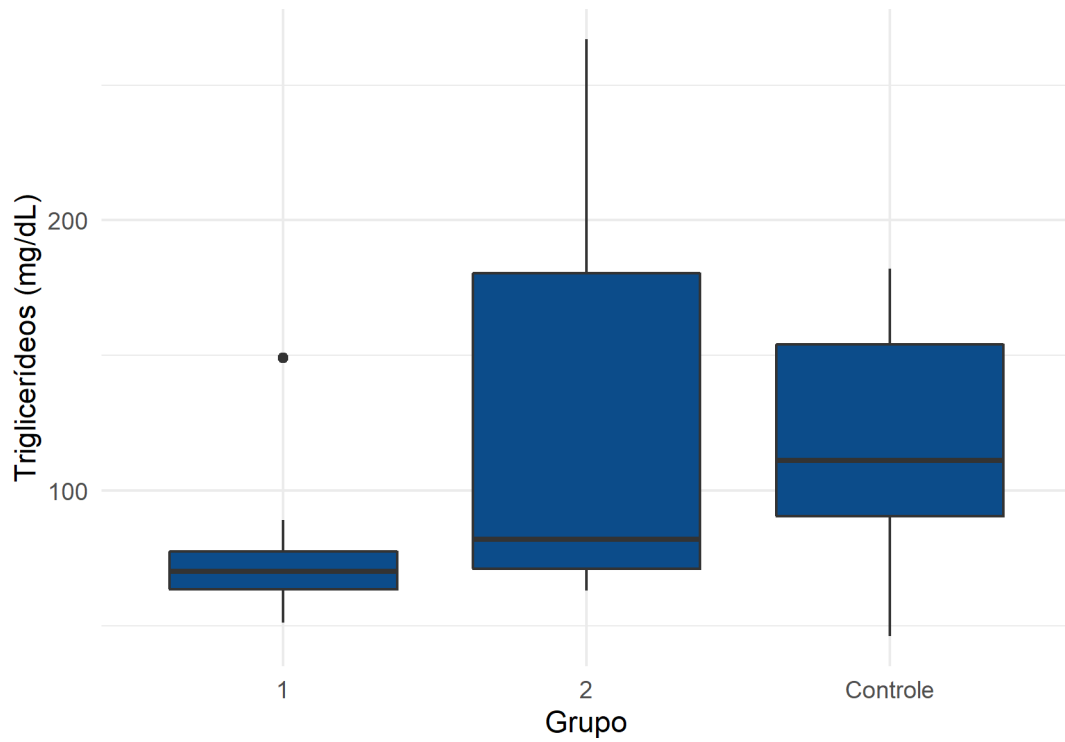
Fonte: O autor

Figura 18 - Boxplot Colesterol HDL (mg/dL) de acordo com o grupo



Fonte: O autor

Figura 19 - Boxplot Triglicerídeos (mg/dL) de acordo com o grupo



Fonte: O autor

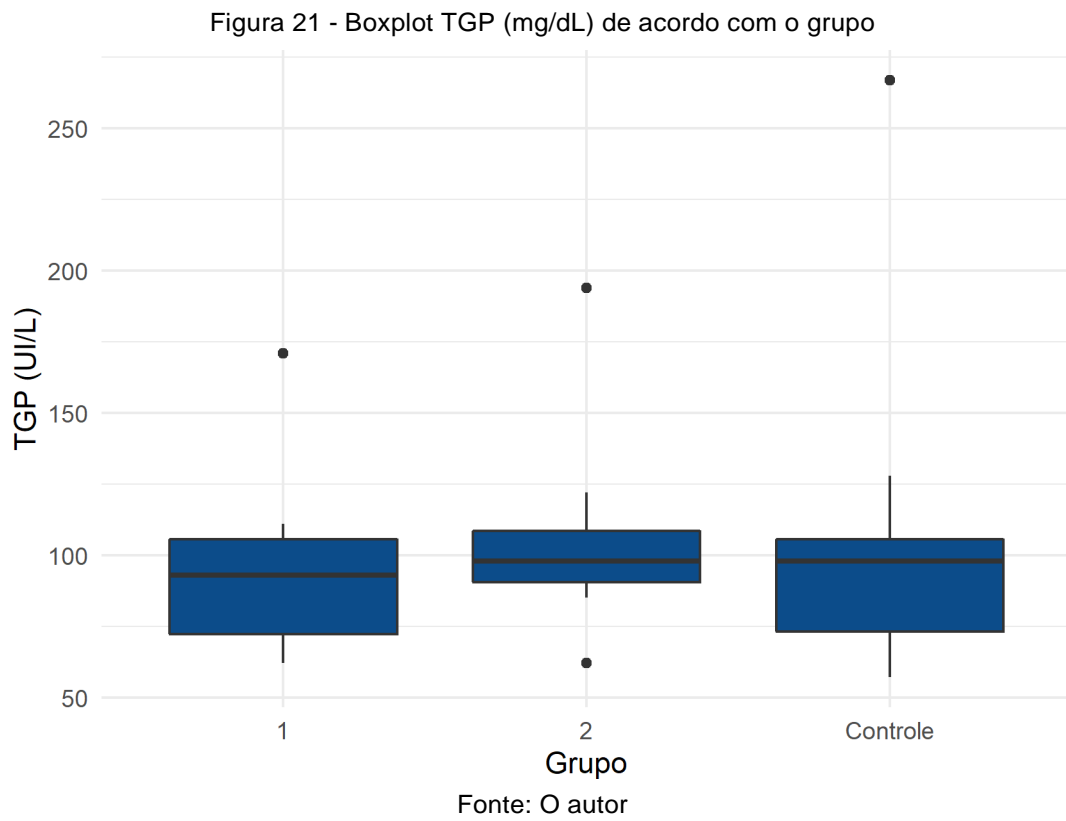
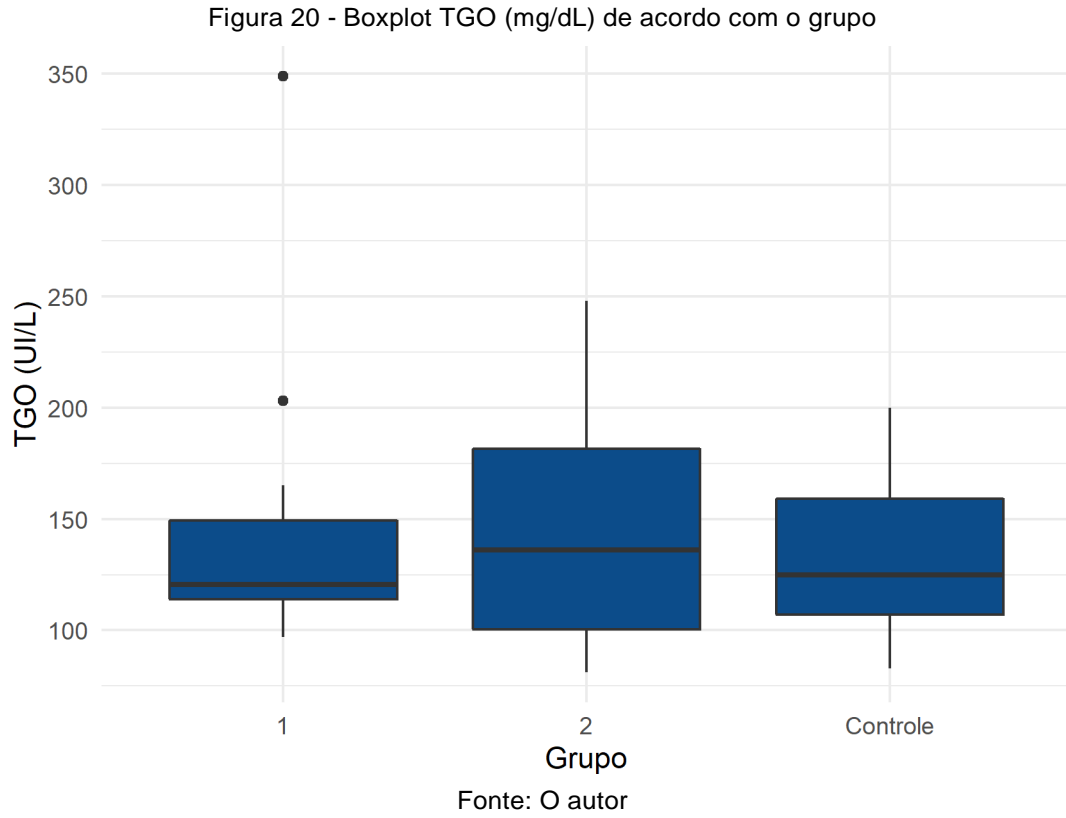
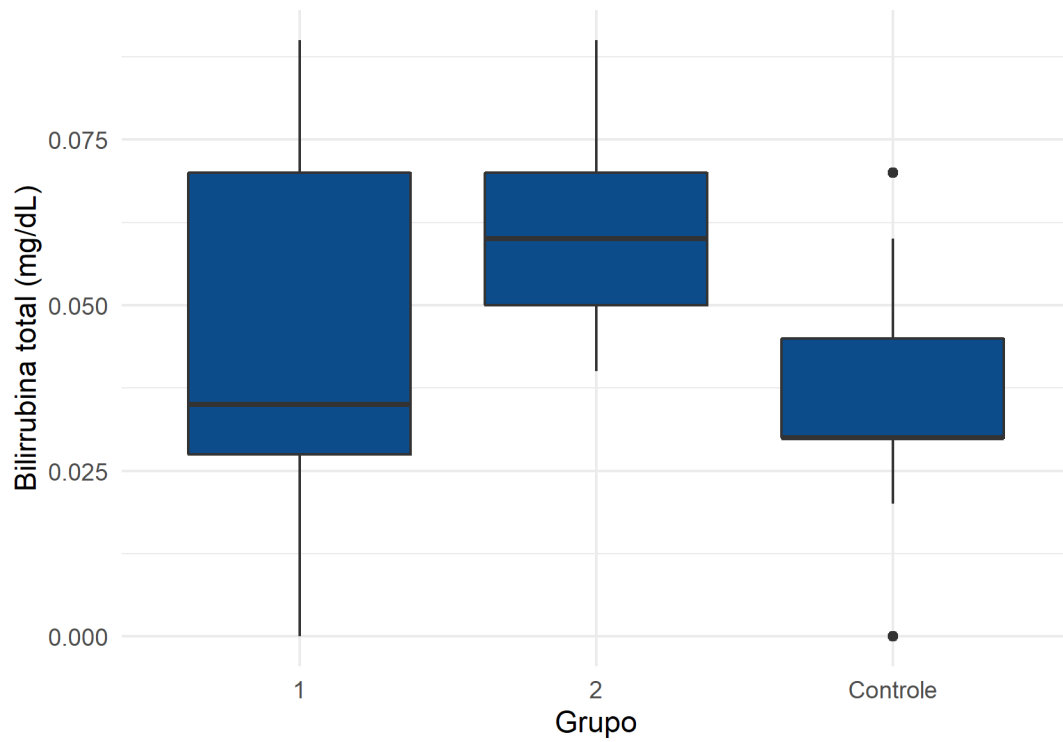
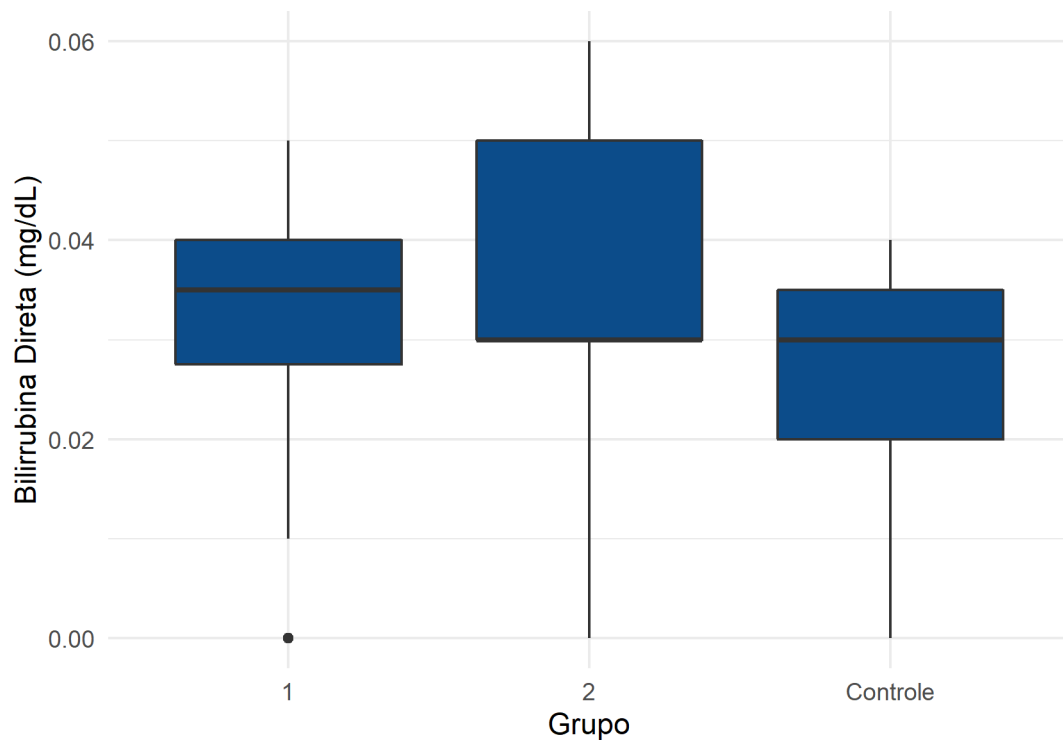


Figura 22 - Boxplot Bilirrubina Total (mg/dL) de acordo com o grupo



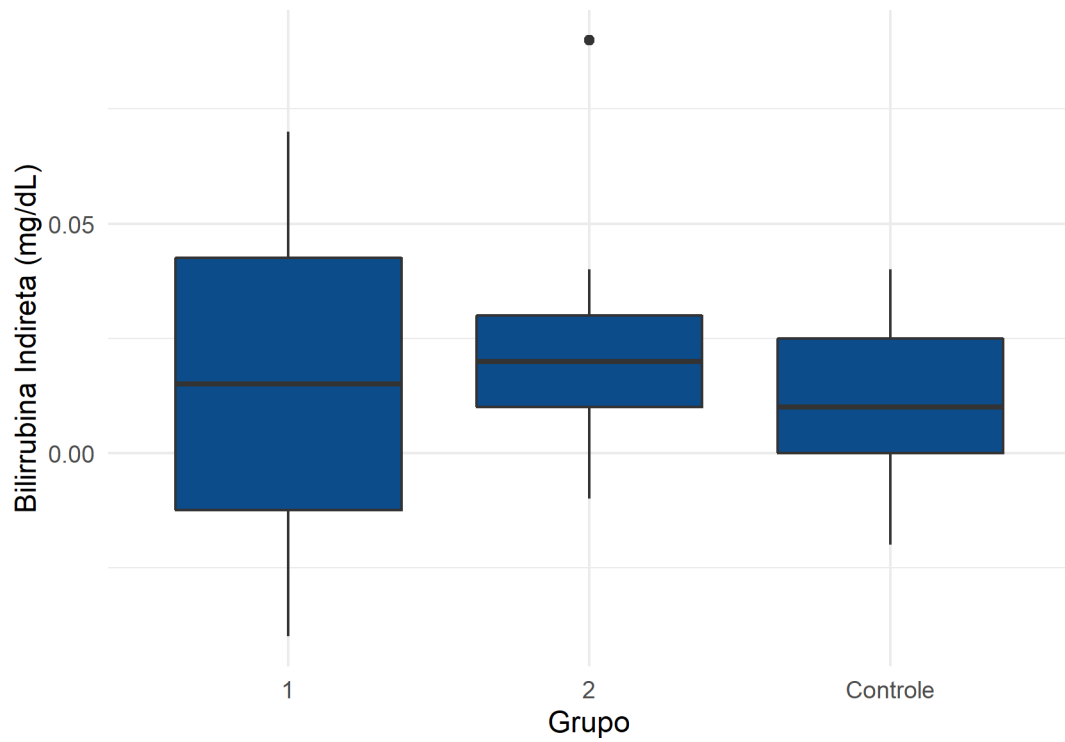
Fonte: O autor

Figura 23 - Boxplot Bilirrubina Direta (mg/dL) de acordo com o grupo



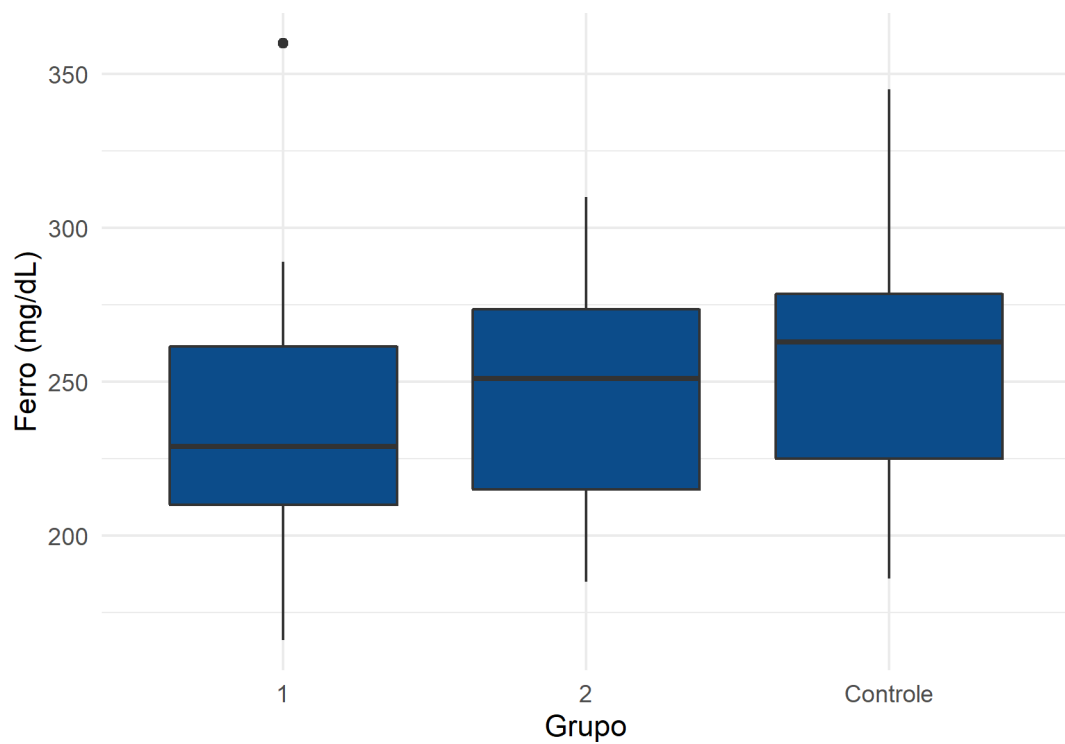
Fonte: O autor

Figura 24 - Boxplot Bilirrubina Indireta (mg/dL) de acordo com o grupo

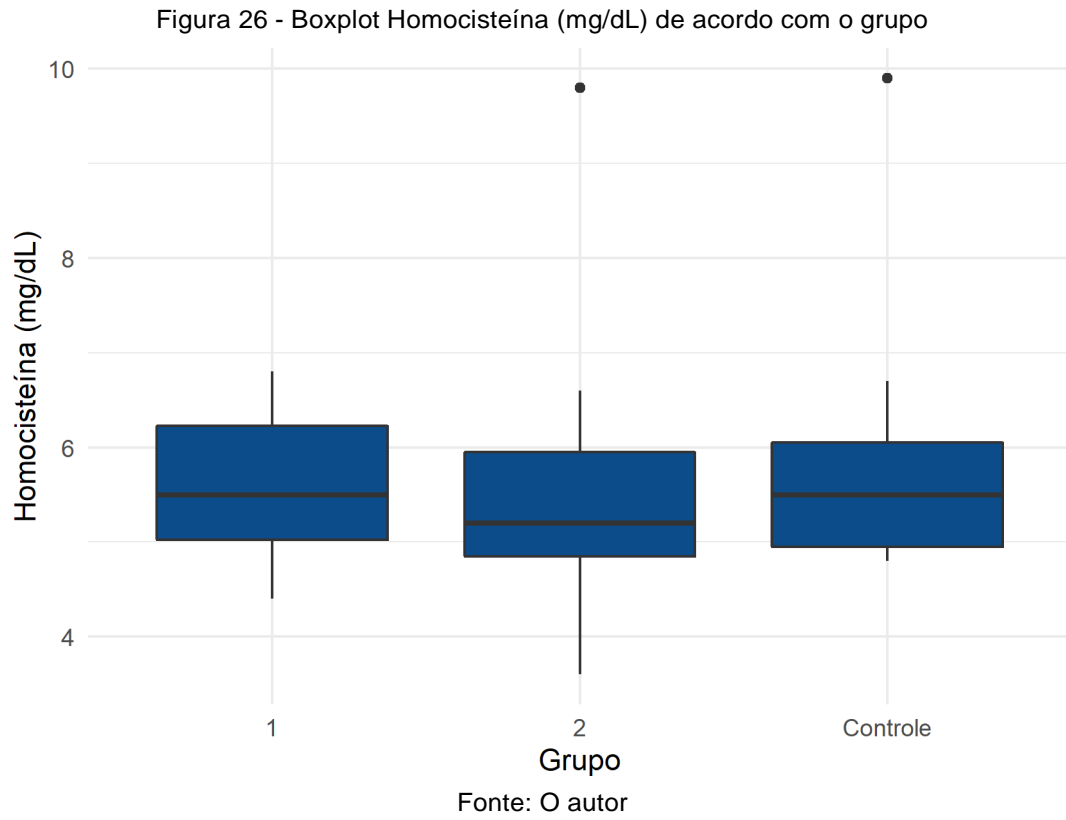


Fonte: O autor

Figura 25 - Boxplot Ferro (mg/dL) de acordo com o grupo



Fonte: O autor



5 DISCUSSÃO

O selênio (Se) é conhecido por contribuir para várias funções fisiológicas vitais em mamíferos: defesa antioxidante, fertilidade, metabolismo do hormônio tireoidiano e resposta imunológica. Evidências crescentes indicam o papel crucial de selenoproteínas contendo Se e Se no cérebro e suas funções cerebrais. A compreensão do transporte de Se no cérebro melhorou consideravelmente, em primeiro lugar, nas últimas duas décadas. A principal interface entre a circulação geral do corpo e o SNC é a barreira hematoencefálica (BBB). O principal mecanismo receptor, chamado SELENOP / LRP8 de Se, entrar no cérebro é bastante bem descrito. Selenoproteínas individuais são conhecidas por estarem envolvidas na regulação da inflamação e da imunidade. SELENOP mostrou estar localizado nas mesmas regiões de lesões do tecido cerebral da doença de Alzheimer - placas A β e emaranhados neurofibrilares. Além disso, foi relatada a liberação aumentada de SELENOP do plexo coróide para o LCR em pacientes com doença de Alzheimer (SOLOVYEV et al., 2021).

Steinbrenner e Sies et al. (2013), descrevem como um oligoelemento selênio, como a selenocisteína, é incorporado a selenoproteínas antioxidantes como a glutathione peroxidases (GPx), tioredoxina redutases (TrxR) e selenoproteína P (Sepp1). Embora comparativamente baixo no conteúdo de selênio, o cérebro exibe alta prioridade para o suprimento e retenção de selênio sob condições de deficiência de selênio na dieta. A Sepp1 derivada do fígado é a principal proteína de transporte no plasma para fornecer selênio ao cérebro, servindo como um "fator de sobrevivência" para os neurônios em cultura. A expressão de Sepp1 também foi detectada no cérebro. Presumivelmente, os astrócitos secretam Sepp1, que é subsequentemente captada pelos neurônios por meio do receptor 2 da apolipoproteína E (ApoER2). Knock-out de Sepp1 ou ApoER2, bem como ablação neurônio-específica da biossíntese de selenoproteína resulta em disfunção neurológica em camundongos. Os astrócitos, geralmente menos vulneráveis ao estresse oxidativo do que os neurônios, são capazes de aumentar a expressão de selenoproteínas antioxidantes após lesão cerebral. A ocorrência de distúrbios neurológicos foi relatada ocasionalmente em pacientes com suprimento nutricional inadequado de selênio ou uma mutação no gene que codifica a selenocisteína sintase, uma das enzimas envolvidas na biossíntese de selenoproteína. Descrevem

que em três grandes ensaios realizados entre idosos, um baixo nível de selênio foi associado a um declínio mais rápido nas funções cognitivas e baixo desempenho em testes que avaliam a coordenação e a velocidade motora.

O selênio pode modular a progressão de lesões oxidativas e apoptóticas induzidas por demência no cérebro e no sangue. Induz efeitos protetores contra o cérebro experimental induzido por demência e lesões oxidativas do sangue e apoptose por meio da regulação da produção de citocinas, vitamina E, concentrações de glutatona e atividade da glutatona peroxidase (DEMIRCI et.al, 2017).

O aumento do estresse oxidativo foi proposto como um patomecanismo em doenças neurodegenerativas, incluindo, entre outras, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral e epilepsia. Glutaciona peroxidases (GPx), tiorredoxina redutases e uma metionina-sulfóxido-redutase são enzimas dependentes de selênio envolvidas na defesa antioxidante e na regulação e modulação redox intracelular. A depleção de selênio em animais está associada à diminuição da atividade de enzimas dependentes de Se e leva a uma maior perda de células em modelos de doença neurodegenerativa. A inativação genética da GPx celular aumenta a sensibilidade a neurotoxinas e isquemia cerebral. Por outro lado, o aumento da atividade da GPx como resultado do aumento do suprimento de Se ou da superexpressão melhora o resultado nos mesmos modelos de doença. A inativação genética da selenoproteína P leva a uma redução acentuada do conteúdo de Se do cérebro, que não foi alcançada pela depleção de Se da dieta, e a um distúrbio do movimento e convulsões espontâneas (SCHWEIZER et al., 2004).

No presente estudo optou-se pela dosagem de TBARS como indicação de estresse oxidativo sendo que diversas técnicas são utilizadas para medir a peroxidação de lipídeos ou de ácidos graxos como a reação com o ácido tiobarbitúrico, glutaciona, determinação da perda de ácidos graxos, dienos conjugados, ensaio idiométrico, análise fluorescente de produtos da peroxidação lipídica e outros. Estas técnicas quantificam diferentes produtos formados em momentos distintos da peroxidação lipídica, como por exemplo dienos conjugados e dialdeído malônico: a sensibilidade e especificidade da técnica depende do tipo do produto a ser quantificado (SLATER, 1984).

O teste com ácido tiobarbitúrico (TBA) foi introduzido por Kohn e Liversedge em 1944 e ainda é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação

lipídica (CHIRICO, 1994). Esta técnica tem por objetivo quantificar o diladeído malônico (“MDA”) formado na peroxidação lipídica, que é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico (“TBA”) originando um composto de cor de rosa. Este composto quando extraído da solução por um solvente orgânico (n-butanol) terá sua concentração determinada e expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRTBA). Esta técnica é de fácil execução, baixo custo e pode ser empregada para determinação das SRTBA em diferentes materiais biológicos, especialmente em tecidos (UCHIAYAMA; MIHARA, 1978).

Song et al. (2014), desenharam um estudo, investigando os efeitos da suplementação de selênio na neurotoxicidade induzida pela patulina, esta um substancia causadora de dano oxidativo no cérebro, conforme evidenciado por uma diminuição nos grupos tiol não proteico e tiol total, juntamente com aumentos significativos em espécies reativas de oxigênio, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e níveis de proteína carbonil. A suplementação de selênio melhorou significativamente essas mudanças nos parâmetros biológicos. Além disso, os tratamentos com selênio aumentaram significativamente os níveis de mRNA de GPx-1, GPx-4 e tioredoxina redutase.

Quando se analisa os centros rítmicos circadianos, dentre eles área pré-óptica, tronco encefálico e hipotálamo posterior, sabe-se da variação dos níveis de TBARS e TIOL. No estudo realizado por Islam et al. (2002), onde realizou-se a suplementação de selênio, comparando com grupo controle, observou-se o efeito de 0,1 e 0,2 mg / kg de selenito de sódio no nível de TBARS e grupo tiol em centros de sono foi significativamente oposto ao centro de vigília. Uma dose de selenito de sódio de 0,1 mg / kg esgotou o conteúdo de TBARS na área pré-óptica e tronco cerebral, mas elevou o conteúdo do grupo tiol significativamente no hipotálamo posterior. Por outro lado, uma dose de 0,2 mg / kg de selenito de sódio aumentou significativamente o conteúdo de TBARS, mas esgotou o conteúdo do grupo tiol significativamente no hipotálamo posterior. Nenhuma alteração dependente da dose foi observada em TBARS e grupo tiol nos centros de ritmo circadiano de ratos.

Em modelos de simuladores de demência do tipo Alzheimer, onde há disfunção colinérgica, Ishrat et al. (2009), utilizaram a estreptozotocina intracerebroventricular (ICV-STZ) em ratos, causando prejuízo da glicose cerebral e do metabolismo energético, juntamente com dano oxidativo e disfunção colinérgica,

fornecendo um modelo relevante para demência esporádica do tipo Alzheimer. Ratos infundidos com ICV-STZ mostraram perda significativa na capacidade de aprendizagem e memória, que foi significativamente melhorada pela suplementação de Se. Um aumento significativo nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonil (PC) e uma diminuição significativa na glutathiona reduzida (GSH), enzimas antioxidantes (glutathiona peroxidase [GPx] e glutathiona redutase [GR]) e trifosfato de adenosina (ATP) no hipocampo e córtex cerebral e colina acetiltransferase (ChAT) no hipocampo foram observados em ratos ICV-STZ. A suplementação de Se melhorou significativamente todas as alterações induzidas por ICV-STZ.

Chang et al. (1998), investigou-se a relação entre o AVC isquêmico e o estado plasmático de antioxidantes e produtos oxidantes, dentre eles a vitamina A, alfa-tocoferol, carotenóides, selênio (Se), grupos SH total (T-SH), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonil de proteína, um marcador de dano proteico. O selênio, T-SH e carbonilas de proteína não foram significativamente diferentes entre os grupos. TBARS apresentou níveis elevados no plasma em comparação com os controles correspondentes.

Outro marcador importante de estresse oxidativo é o TIOL. O status tiol redox dos compartimentos intracelulares e extracelulares é crítico na determinação da estrutura da proteína, regulação da atividade enzimática e controle da atividade e ligação do fator de transcrição. Os antioxidantes tiol agem por meio de uma variedade de mecanismos: (1) como os componentes do tampão redox tiol / dissulfeto geral, (2) como quelantes de metal, (3) como inibidores de radicais, (4) como substratos para reações redox específicas (GSH), e (5) como redutores específicos de ligações dissulfato de proteína individuais (tioredoxina). Sendo assim, é benéfico aumentar a disponibilidade de antioxidantes específicos sob condições de estresse oxidativo. As células desenvolveram vários mecanismos para promover o aumento dos níveis intracelulares de tióis, como GSH e tioredoxina, em resposta a uma ampla variedade de estresses (DENEKE, 2001).

Em nossa pesquisa, observa-se que houve pouca variação nas mensurações com pouca relevância estatística nos três grupos testados, tanto nos marcadores TIOL e catalase. Já no TBARS, observa-se de forma clara que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,003$). O grupo 2 foi significativamente inferior ao grupo controle (0,010) e grupo 1 (0,005), entre o grupo

1 e o controle não houve diferença significativa ($p=0,726$), podendo sugerir que as doses mais elevadas de selênio podem reduzir o estresse oxidativo, com mostra a redução do TBARS.

Em termos de hipoxia, Sarada et al. (2008), constatara, que a hipóxia reduziu as atividades de Glutathione (GSH), Glutathione Redutase (GR), Glutathione peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD) em comparação com as células de controle. Durante a condição de hipóxia, a expressão do citocromo C, os níveis de caspase-3 pró e ativa foram aumentados significativamente, seguidos por uma regulação positiva não significativa de Bcl-2. Porém, a suplementação de Se inibiu a citotoxicidade, geração de radicais livres e estabilizou o acúmulo de HIF-1alfa em células sob hipóxia. O conteúdo de GSH, atividades GR, GPx e SOD aumentaram significativamente nas células hipóxicas tratadas com Se, em comparação com o controle. Além disso, houve uma inibição apreciável da apoptose pela regulação positiva das proteínas Bcl-2, na presença de Se sob hipóxia (SARADA et al., 2008).

Ainda referente as lesões hipóxico-isquêmicas, Ozbal et al. (2008), avaliaram o nível de marcadores inflamatórios no tecido cerebral pós lesão isquemia-reperfusão (IR) em ratos, e o conseqüente dano neural e apoptose, avaliando citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), a interleucina-1 beta ($IL-1\beta$), e o fator de crescimento nervoso (NGF), este essencial para a diferenciação, sobrevivência e funções das células neuronais no sistema nervoso central. No estudo, investigou-se o efeito do selênio (Se) no córtex pré-frontal e danos ao hipocampo em ratos submetidos a lesão cerebral de IR, demonstrando que a avaliação histopatológica mostrou que o tratamento com selênio após isquemia atenuou significativamente a morte neuronal induzida por IR no córtex pré-frontal e regiões CA1 do hipocampo de ratos. As células apoptóticas coradas com apostaina e caspase-3 diminuíram significativamente no grupo de tratamento quando comparadas com o grupo IR. Além disso, o tratamento com selênio diminuiu os níveis de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ e aumentou os níveis de NGF no córtex pré-frontal e tecido hipocampal de animais submetidos a IR.

Nassar, Salama e El-gawad (2021) protagonizaram uma investigação induzindo a neurotoxicidade por nanopartículas de óxido de zinco por ingestão oral em ratos, e posterior aplicação de selênio afim de avaliar o possível papel neuroprotetor. Quarenta ratos albinos machos foram categorizados em quatro grupos ($n = 10$), onde a exposição de animais experimentais a nanopartículas de

óxido de zinco confirmou a indução de uma elevada porcentagem de apoptose no tecido cerebelar levando a neurócitos lesados nas três camadas corticais, detectado por meio de um aumento significativo na imunorreatividade da caspase 3 (um marcador de apoptose), análise morfométrica devido à subsequente liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e avaliação do GFAP. Constatou-se que a suplementação de Se restringiu e minimizou o aumento da caspase 3, assim como a liberação de ROS e aumento de GFAP, devido às suas propriedades antioxidantes registrando um papel protetor.

Considerando os marcadores inflamatórios COX E NFkB, em análise realizada por Zhang et al. (2018), objetivou-se a mensuração da atividade inflamatória com supressão e suplementação de selênio. Tanto os níveis de óxido nítrico (NO) quanto a atividade de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) foram aumentados no grupo suprimido de selênio, e os níveis de expressão de mRNA e proteínas de citocinas inflamatórias (iNOS, COX-2, NF-κB e PTGEs) também se elevaram, assim como a observação histológica mostrou resposta inflamatória no cérebro de porco. Em resumo, a dieta com deficiência de selênio pode ativar a via iNOS / NF-κB para regular positivamente a expressão de citocinas inflamatórias, levando assim a lesões inflamatórias de forma difusa no cérebro do porco (ZHANG et al. 2020).

Muitas das proteínas envolvidas nas cascatas de sinalização intracelular (MYD88, ASK1, IKKa / b, NF-κB, AP-1) são redox-sensíveis e sua atividade é regulada por antioxidantes tioredoxina, glutaredoxina, nitroredoxina e glutathiona. A oxidação dessas proteínas sinalizadoras induzidas por ROS potencializa o desenvolvimento de inflamação e apoptose, e sua redução com antioxidantes, ao contrário, estabiliza a velocidade das cascatas de sinalização, evitando o círculo vicioso de estresse oxidativo, inflamação e apoptose que se segue. As enzimas antioxidantes (AO) tioredoxina redutase (TRXR), glutaredoxina redutase (GLRXR), glutathiona redutase (GR) são necessárias para a redução de antioxidantes não enzimáticos (tioredoxina, glutaredoxina, nitroredoxina, glutathiona) e enzimas AO (SOD, catalase, GPX) são necessários para a desativação do ROS. As principais enzimas AO (TRXR e GPX) são dependentes do selênio; portanto, a deficiência de selênio leva a uma diminuição na defesa antioxidante do corpo, ao desenvolvimento de estresse oxidativo, inflamação e / ou apoptose em vários tipos de células. A via de sinalização Nrf2-Keap1 ativada por deficiência de selênio e / ou

estresse oxidativo é necessária para restaurar a homeostase redox na célula. Além disso, a expressão de alguns genes é alterada com a deficiência de selênio.

No estudo de Yeo e Kang (2007), onde investigou-se a possível prevenção da morte celular por apoptose por selênio, em modelo experimental de trauma cerebral de camundongo (BT), observando células progenitoras neurais derivadas do cérebro (NPC) monitorando a expressão da tioredoxina redutase (TR), a remoção ótima de H₂O₂ e a consequente inibição de eventos pró-apoptóticos, incluindo citocromecrelease e ativação das caspases 3 e 9. O selenito bloqueia a ativação da proteína quinase c-jun N-terminal (JNK) / proteína quinase ativada por mitógeno P38 (MAPK) e da proteína Akt survival, ativa o p44 / 42 MAPK e inibe a regulação negativa de Bcl2 em células NPC tratadas com selenito, inibindo a apoptose de NPCs induzida por H₂O₂ e em lesões cerebrais traumáticas. Também foi associada com a inibição da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas por H₂O₂, citocromecrelease e ativação das caspases 3 e 9, demonstrando sua forte ação antioxidante.

Na análise de Tian et al. (2005), onde o grupo realizou a suplementação de selênio em ratos recém-nascidos, visando avaliar o impacto na diferenciação de células-tronco neurais, assim como avaliando alguns marcadores inflamatórios com o GFAP em astrócitos, o estudo comprovou que o Selênio pode promover a viabilidade, desenvolvimento e diferenciação da neurosfera, e as células diferenciadas podem ter mais quantidade, mais ramos e melhor rede nervosa morfológica.

Com relação ao marcador CD68, o qual é uma glicoproteína intracelular de 110 kD, são utilizados mais frequentemente para a identificação de macrófagos em imuno-histoquímica. No entanto, CD68 é também encontrada em monócitos, neutrófilos, basófilos e linfócitos grandes. A função da molécula CD68 não é certa, mas estas proteínas de membrana lisossomal são os principais componentes e podem proteger as membranas de um ataque por hidrolases ácidas. É um marcador importante de lesão inflamatória e consequente estresse oxidativo. A expressão da proteína CD68 tem sido demonstrada em células T estimuladas e células natural Killer, e tecidos não-hematopoiéticos, como o fígado e túbulos renais. Observamos que na avaliação imunohistoquímica, houve pouca variabilidade nos valores entre os grupos controles.

Porém, em nossos resultados não demonstraram relevância estatística em na mensuração dos marcadores imunohistoquímicos BCL-2, HE, CASP, CD68, COX, NFkB, GFAP, entre os 3 grupos analisados.

Na pesquisa realizada por Zhang et al. (2018), em que realizou a mensuração dos níveis lipídicos em ratos antes e após suplementação do selênio e magnésio, demonstraram que os níveis elevados de colesterol total sérico e hepático e LDL-C sérico induzidos pela alimentação com dietas ricas em gordura foram significativamente reduzidos pela co-suplementação de Se e MG em baixas doses. Ambas as doses de co-suplementação de selênio e magnésio diminuíram notavelmente os níveis de TG no sangue e no fígado, os índices de função hepática TGO e TGP e a proporção de TC / HDL-C e TG / HDL-C. Em contraste, a suplementação de Se e Mg mostrou um aumento substancial na glutathione peroxidase dependente de Se (GSH-Px) e atividades de SOD e uma redução significativa do nível de MDA de ratos hiperlipidêmicos. Também é demonstrado que a co-suplementação de selênio e magnésio pode atenuar a esteatose hepática.

Importante ressaltar que a dose pode causar intoxicação, como demonstrado no estudo de Toyran, Turan e Severcan (2007), onde a suplementação em doses elevadas causou um aumento no conteúdo de lipídios tanto nos lipídios saturados quanto nos insaturados, e uma alteração no perfil proteico com uma diminuição na hélice α e um aumento na estrutura da folha β do coração do rato, que pode ser refletindo um leve efeito subtóxico da suplementação de selênio no coração de rato normal na dose utilizada no estudo.

Avaliando o efeito do selênio nos níveis de bilirrubinas, Nuzhat e Tabassum (2013) induziram em seu estudo a cirrose hepática em ratos através de tiocetamida, A análise bioquímica foi avaliada pela bilirrubina total e direta, enzimas específicas do fígado e enzimas antioxidantes tanto em nos ratos controle quanto nos com cirrose hepática induzida. Sendo o aumento acentuado na bilirrubina total e direta e na atividade da TGP os marcadores indicativos de cirrose hepática, enquanto a redução da atividade antioxidante [SOD e GSH] e aumento dos níveis de MDA e Catalase observados no grupo cirrótico. A suplementação com selenito de sódio reduziu significativamente a atividade da bilirrubina total e ALT e restaurou as enzimas antioxidantes [SOD e GSH] e MDA e a atividade da catalase.

Petrovski et al. (2012), realizaram uma revisão os níveis de selênio (Se) e a gravidade da doença hepática crônica e a associação entre fatores socioeconômicos

e de estilo de vida e os níveis séricos de Se. Foram avaliados homens húngaros, examinando 281 pacientes com doença hepática crônica e 778 controles. A função hepática foi avaliada por meio de marcadores bioquímicos como TGO e TGP, albumina e bilirrubinas; e a doença hepática foi verificada com exame físico e exames de sangue. A análise de regressão linear foi realizada para estudar a associação do nível de Se sérico com marcadores bioquímicos em casos e controles. Os níveis séricos de Se foram mais baixos nos casos do que nos controles. Nos controles, aumentos na bilirrubina e na transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) foram associados a diminuições nos níveis de Se. Em pacientes com doença hepática crônica, foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre o Se sérico e a razão TGO / TGP, albumina e bilirrubina. O nível de Se foi associado à gravidade da lesão hepática em pessoas, mesmo em pacientes que não exibiam sinais e sintomas de doença hepática crônica.

Dentre o perfil de ferro sérico, observamos uma forte influência do selênio. Kojouri et al. (2012), demonstraram no estudo com ovelhas esta influência do selênio na homeostase do ferro e na expressão da transferrina e de seus genes de proteínas ligadoras de receptores. Divididos em 3 grupos, fatores como concentração de ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro (TIBC) e porcentagem de saturação de transferrina foram determinados. A expressão da transferrina e genes do receptor de ligação à transferrina também foi estudada. Os resultados mostram uma tendência decrescente na concentração de ferro sérico, particularmente durante os estágios iniciais e intermediários de suplementação (0-20 dias) com selênio. Por outro lado, o nível de TIBC aumentou no soro, especialmente durante esses períodos (0-20 dias) em animais que receberam selênio. Nossos resultados também mostraram que a expressão da transferrina e de seus genes receptores aumentaram consideravelmente durante a suplementação dos animais com ambos os compostos de selênio por 10 ou 20 dias. Após esse período, a expressão dos genes citados diminuiu significativamente, principalmente nos animais que receberam íons selênio.

Chareonpong-Kawamoto e Yasumoto (1995), demonstraram a influência dos níveis séricos de selênio no ferro sérico e demais minerais em ratos Wistar machos. As análises mostraram que a deficiência de Se afetou as concentrações de magnésio, cálcio, ferro, cobre e zinco em tecidos selecionados e no soro. Durante todo o período, a concentração de ferro sérico foi 40-58% maior em ratos com

deficiência de selênio em comparação com ratos com níveis adequados de selênio. A saturação de transferrina com ferro foi significativamente maior em ratos com deficiência de selênio do que em ratos com níveis adequados de selênio (57–60% versus 30–31%). As concentrações de ferro nos tecidos variaram de 1,1 a 2,5 vezes maiores em ratos com deficiência de selênio do que em ratos com níveis adequados de selênio ($p < 0,05$). Esses resultados corroboram com a teoria que a deficiência de selênio pode causar uma sobrecarga secundária de ferro e distribuição desequilibrada de outros minerais.

Já no estudo capitaneado por Viita, Mutanen e Mykkanen (1989), o qual foi analisado o efeito da suplementação de selênio (Se) inorgânico no status de ferro e da suplementação de ferro no status de selênio em estudantes finlandesas (= 33), onde os alunos foram divididos em três grupos e suplementados diariamente por quatro semanas com 150 μg de Se como selenato de sódio, ou 120 mg de Fe como sulfato ferroso, ou 120 mg de Fe como sulfato ferroso e 150 μg de Se como selenato de sódio. O nível de selênio plasmático foi usado como um indicador do nível de selênio corporal. As concentrações de hematócrito e ferritina sérica foram medidas para determinar as mudanças no estado de ferro corporal. O nível inicial de selênio no plasma de todos os indivíduos foi de $74,7 \pm 2,9$ ng / ml. O aumento no nível de Se plasmático no grupo que recebeu selenato de sódio foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que no grupo que recebeu selenato de sódio e sulfato ferroso. O nível de selênio plasmático no grupo que recebeu sulfato ferroso diminuiu de $76,0 \pm 2,8$ ng / ml para $67,8 \pm 2,3$ ($P < 0,05$) durante o período de suplementação, mas voltou ao nível inicial quatro semanas após o término da suplementação de ferro. Os dados indicam que o ferro suplementar afetou negativamente o nível de selênio corporal desses indivíduos. Por outro lado, a suplementação de Se não teve efeito sobre o nível de ferro corporal, conforme indicado pelos níveis séricos de ferritina e hematócrito. Também foi demonstrado que não houve interação óbvia entre os níveis normais de selênio e ferro no corpo.

Davis, Uthus e Finley (2000), demonstraram as mudanças na quantidade e na forma química do selênio afetariam a metilação do DNA, onde ratos alimentados com dietas deficientes em selênio tiveram significativamente ($P < 0,0001$) DNA hipometilado do fígado e cólon em comparação com ratos alimentados com 0,1 ou 2,0 μg de selênio / g dietas como selenito ou selenometionina. Assim, as alterações

na metilação do DNA podem ser um mecanismo potencial, pelo qual o selênio dietético deficiente aumenta a tumorigênese do fígado e cólon.

E no trabalho subsequente, avaliou-se, as concentrações de homocisteína no plasma e nos tecidos, os quais demonstraram redução pela privação de selênio. A homocisteína e a cisteína plasmáticas diminuíram significativamente ao alimentar ratos ou camundongos com dieta deficiente em selênio em comparação com a alimentação adequada ou com selênio supranutricional. Este trabalho sugere que as diferenças entre as espécies podem ser vitais para determinar qual modelo animal é usado em estudos de deficiência de selênio ou em estudos que são projetados para determinar os mecanismos quimiopreventivos do selênio.

Venn et al. (2003), analisaram indivíduos de Dunedin, Nova Zelândia (n = 189) de forma aleatória para receber um suplemento contendo 200 µg de selênio ou placebo por 20 semanas. No início do estudo, 67% (n = 112) dos participantes tinham concentrações plasmáticas de selênio <1,2 µmol / L, uma concentração considerada necessária para a atividade total da glutathione peroxidase (Gpx). Não houve diferença nas alterações médias de homocisteína plasmática entre os grupos suplementado e placebo (P = 0,54), concluindo a suplementação de selênio não influencia nas concentrações plasmáticas de homocisteína em populações saudáveis de países desenvolvidos, cujo status de selênio é caracterizado por concentrações mais baixas de selênio plasmático.

Na avaliação do hemograma, Pisek et al. (2008), avaliaram o impacto da suplementação de selênio nos parâmetros dos leucócitos no sangue de ovelhas gestantes e não gestantes, com a contagem de glóbulo branco total (WBC) e a diferenciação de leucócitos no esfregaço de sangue detectados por uma análise microscópica, e os subconjuntos CD4 + e CD8 + detectados por citometria de fluxo. Uma diminuição na contagem de leucócitos foi registrada durante a gravidez; foi estatisticamente significativo apenas no grupo suplementado com selênio orgânico. No período pós-parto, houve um aumento estatisticamente significativo nas porcentagens dos subconjuntos CD4 + e CD8 +, mas as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas. Os resultados do experimento documentaram que a suplementação de diferentes formas de selênio não influenciava de forma marcante a dinâmica dos parâmetros sanguíneos em ovelhas não gestantes, gestantes e lactantes se a ingestão de vitaminas e outros microelementos essenciais fosse adequada.

Dentre a morfologia e bioquímica do sangue, e a capacidade fagocítica de granulócito, Musik, Kielczykowska e Donica (2013), dividiu ratos em 4 grupos, suplementando em compostos de selênio, o qual constatou a diminuição do hematócrito em todos os grupos. O número de eritrócitos permaneceu inalterado em todos os grupos que receberam selênio vs. controle, enquanto o número de leucócitos, hemoglobina reduziram significativamente em 3 grupos. No contexto bioquímico, os resultados relativos ao efeito do selênio mostraram que a ureia permaneceu inalterada, a glicose diminuiu estatisticamente, enquanto o colesterol diminuiu significativamente em um grupo específico.

Alimohamady et al. (2013), conduziram um estudo de suplementação de selênio em cordeiros, comparando com grupo controle, vislumbrando avaliar o tanto o perfil hematológico quanto o perfil bioquímico. Os resultados revelaram que não houve diferenças significativas para ganho médio diário, consumo de ração médio diário, relação alimentação / ganho, parâmetros hematológicos (volume de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e valores de hemoglobina), proteína sérica total, albumina, globulina, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e creatina fosfoquinase devido à suplementação de diferentes quantidades e fontes de Se em cordeiros. A suplementação dietética de Se melhorou significativamente ($P < 0,001$) a atividade da glutathione peroxidase no sangue. Além disso, no final do ensaio, a quantidade de tri-iodotironina (T3) sérica também aumentou ($P < 0,05$), enquanto a quantidade de tiroxina (T4) sérica diminuiu ($P < 0,05$).

O efeito neuroprotetor da administração oral de nanopartículas de selênio em ratos com lesão medular induzida foi demonstrado por Javdani et al. (2019), o qual dosou as concentrações séricas de IGF-1 e as alterações nos glóbulos brancos nos grupos lesionados e não, em diferentes momentos pré e pós-cirúrgicos. Os resultados do estudo atual mostraram uma diminuição significativa no total de leucócitos, incluindo linfócitos, neutrófilos e monócitos no grupo experimental em comparação com o grupo controle. A avaliação histológica mostrou que as respostas inflamatórias reduziram significativamente no grupo experimental em comparação com o grupo controle, concluindo que a diminuição do número de células inflamatórias após a administração oral das nanopartículas de selênio se deve aos efeitos neuroprotetores dessa nanopartícula.

No entanto, nossas análises tanto com relação ao hemograma quanto bioquímica (Colesterol total, HDL, Triglicérides, TGO, TGP, Bilirrubinas totais e

frações, Ferro, Homocisteína), não demonstraram variações significativas ou relevância estatística entre os 3 grupos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O selênio é conhecido como um poderoso antioxidante, vastamente demonstrado na literatura, com ação em diversas cascatas do estresse oxidativo.

Porém em nosso experimento, considerando a análise dos marcadores séricos de estresse oxidativo, observa-se que no grupo 2, este o de maior dose suplementada de selênio, houve uma redução significativa da mensuração do TBARS, com relevância estatística, sugerindo sua ação antioxidante. Dentre os demais marcadores séricos de estresse oxidativo, tanto o TIOL quanto a catalase, não houve variabilidade com significância estatística. Assim como em relação aos marcadores imunohistoquímicos, dentre eles, caspase-3, BCL-2, NFkB, COX2, GFAP, CD68, além do padrão estrutural neural, nas lâminas em HE, houve pouca variabilidade em suas mensurações, sem relevância estatística significativa.

Frente à análise do hemograma e a bioquímica, dentre eles o Colesterol total, HDL, Triglicerídeos, TGO, TGP, Bilirrubinas totais e frações, Ferro sérico, homocisteína sérica, também não houve relevância estatística significativa entre os grupos observados.

Sendo assim, há uma melhora do padrão de estresse oxidativo, demonstrado em uma variável, porém levanta-se o questionamento sobre a dose utilizada, a formulação e a biodisponibilidade da suplementação de selênio, como pontos de influência na resposta oxidativa.

REFERÊNCIAS

- ALIMOHAMADY, R.; ALIARABI, H.; BAHARI, A.; DEZFOULIAN, A. H. Influence of different amounts and sources of selenium supplementation on performance, some blood parameters, and nutrient digestibility in lambs. **Biological trace element research**, v. 154, n. 1, p. 45-54. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9698-4>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- ANSARI, M. A.; AHMAD, A. S.; AHMAD, M.; SALIM, S.; YOUSUF, S.; ISHRAT, T.; ISLAM, F. Selenium protects cerebral ischemia in rat brain mitochondria. **Biological Trace Element Research**, v. 101, n. 1, p. 73-86, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/bter:101:1:73>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BARBOSA, N. B.; ROCHA, J. B.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M. C.; BRAGA, A. L. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 243-53, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8373>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, 87, n. 1, p. 245-313, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, v. 12, p. 123-30, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BRUNO, R. S. et al. Dietary zinc restriction in rats alters antioxidant status and increase plasma F2 isoprostanos. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 8, p. 509-518, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.09.001>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BURK, R. F.; HILL, K. E.; OLSON, G. E.; WEEBER, E. J.; MOTLEY, A. K.; WINFREY, V. P.; AUSTIN, L. M. Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 23, p. 6207-6211, 2007. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1153-07.2007>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BURK, R. F.; HILL, K. E.; READ, R.; BELLEW, T. Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium. **American Journal of Physiology**, v. 261, n. 1 Pt 1, p. E26-30, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1991.261.1.e26>. Acesso em: 14 jan. 2021.

BURNEIKO, R. C. M. et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.01.004>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2 Suppl), p. 637S-46S, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.637s>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CHANG, C. Y. et al. Plasma levels of antioxidant vitamins, selenium, total sulfhydryl groups and oxidative products in ischemic-stroke patients as compared to matched controls in Taiwan. **Free Radical Research**, v. 28, n. 1, p. 15-24, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10715769809097872>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CHAREONPONG-KAWAMOTO, N.; YASUMOTO, K. Selenium Deficiency as a Cause of Overload of Iron and Unbalanced Distribution of Other Minerals. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 2, p. 302–306, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.59.302>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CHEN. J.; BERRY, M. J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, v. 1, p. 1-12, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01854.x>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CHIRICO, S. High performance liquid chromatography based thiobarbituric acid test. **Methods in Enzymology**, v. 233, p.314-318, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33035-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33035-2). Acesso em: 25 jun. 2021.

DAS, S. K.; VASUDEVAN, D. M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Science Journal**, v. 81, n. 3, p. 177-187, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.05.005>. Acesso em: 25 jun. 2021.

DANSCHER, G. Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. **Histochemistry**, v.76, n. 3, p. 281-93, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf00543951>. Acesso em: 25 jun. 2021.

DAVIS, C. D.; UTHUS, E. O.; FINLEY, J. W. Dietary selenium and arsenic affect dna methylation in vitro in caco-2 cells and in vivo in rat liver and colon. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 12, p. 2903–2909, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/130.12.2903>. Acesso em: 25 jun. 2021.

DEMIRCI, K.; NAZIROĞLU, M.; ÖVEY, İ. S. BALABAN, H. Selenium attenuates apoptosis, inflammation and oxidative stress in the blood and brain of aged rats with scopolamine-induced dementia. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 2, p. 321-329, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9903-1>. Acesso em: 25 jun. 2021.

DENEKE, S. M. Thiol-based antioxidants. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 36, p. 151-180, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0070-2137\(01\)80007-8](https://doi.org/10.1016/s0070-2137(01)80007-8). Acesso em: 28 jun. 2021.

DUARTE, T. L.; JONES, G. D. Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 8, p. 1165-1175, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.017>. Acesso em: 28 jun. 2021.

EL-DEMERDASH, F. M. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver, and blood of rats. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 36, n. 4, p. 489-99, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/pfc-100104191>. Acesso em: 28 jun. 2021.

EL-DEMERDASH, F. M. Lambda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 3, p. 392-397, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.09.019>. Acesso em: 28 jun. 2021.

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJIMOKO, Y. R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 158-65, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>. Acesso em: 28 jun. 2021.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. Suppl 1, p. 110-118, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.s110>. Acesso em: 28 jun. 2021.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>. Acesso em: 28 jun. 2021.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf030723c>. Acesso em: 28 jun. 2021.

HUANG, M. C. et al. The correlation between early alcohol withdrawal severity and oxidative stress in patients with alcohol dependence. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, p. 66-69, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.10.009>. Acesso em: 28 jun. 2021.

ISLAM, F. et al. Selenium-induced alteration of lipids, lipid peroxidation, and thiol group in circadian rhythm centers of rat. **Biological Trace Element Research**, v. 90,

n. (1-3), p. 203-214, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/bter:90:1-3:203>. Acesso em: 28 jun. 2021.

ISHRAT, T. et al. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.04.010>. Acesso em: 28 jun. 2021.

JAVDANI, M. et al. Effect of selenium nanoparticle supplementation on tissue inflammation, blood cell count, and IGF-1 levels in spinal cord injury-induced rats. **Biological Trace Element Research**, v. 187, n. 1, p. 202-211, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1371-5>. Acesso em: 28 jun. 2021.

JOHNSON, J. B. et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, n. 5, p. 665-674, 2007. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.freeradbiomed.2006.12.005>. Acesso em: 28 jun. 2021.

JÚNIOR ROVER, L. J.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100019>. Acesso em: 28 jun. 2021.

KARLSEN, A.; RETTERSTOL, L.; LAAKE, P.; KJOLSRUD-BOHN, SANVIK L, BLOMHOFF R. Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidante status, oxidative stress and inflammation in healthy adults. **e-SPEN, The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 2, n. 1, p. 127-133, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eclnm.2007.09.002>. Acesso em: 28 jun. 2021.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000400007>. Acesso em: 28 jun. 2021.

KOJOURI, G. A. et al. Effect of selenium supplementation with sodium selenite and selenium nanoparticles on iron homeostasis and transferrin gene expression in sheep: A preliminary study. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 275-278, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.029>. Acesso em: 28 jun. 2021.

LECOMTE, E. et al. Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 60, n. 2, p. 255-61, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/60.2.255>. Acesso em: 28 jun. 2021.

LEMON, J. A.; ROLLO, C. D.; BOREHAM, D. R. Elevated DNA damage in a mouse model of oxidative stress: impacts of ionizing radiation and a protective dietary

supplement. **Mutagenesis**, v. 23, n. 6, p. 473-82, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mutage/gen036>. Acesso em: 28 jun. 2021.

LI, H. et al. Cyclooxygenase 2-Selective and Nonselective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Oxidative Stress by Up-Regulating Vascular NADPH Oxidases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, n. 3, p. 745-53, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.108.139030>. Acesso em: 28 jun. 2021.

LYKKESLELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta – Journal**, v. 380, n. 1-2, p. 50-58, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.01.028>. Acesso em: 28 jun. 2021.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. (Suppl 3), p. 933-940. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/133.3.933s>. Acesso em: 28 jun. 2021.

MUSIK, I.; KIELCZYKOWSKA, M.; DONICA, H. The influence of selenium compounds of different structure on morphology, blood biochemistry and phagocytic capability of granulocytes in rats. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 64, v. 2, p. 117-122, 2013.

NASSAR, S. S.; SALAMA, E. N.; EL-GAWAD, A. Selenium protects caspase 3 and glial fibrillar acidic protein (GFAP) expression in cerebellum of rats against zinc oxid nanoparticles (znonps) exposure. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, v. 25, n. 6, p. 08–23, 2021.

NUZHAT, F. S; TABASSUM, M. Role of selenium in protection of liver cirrhosis **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1097-1102, 2013.

OTEIZA, P. I.; OLIN, K. L.; FRAGA, C. G.; KEEN, C. L. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 4, p. 823-829, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/125.4.823>. Acesso em: 28 jun. 2021.

OZBAL, S. et al. The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Neuroscience Letters**, v. 438, n. 3, p. 265-269, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.091>. Acesso em: 10 jul. 2021.

PANIZ, C. et al. The influence of the serum vitamin C levels on oxidative stress biomarkers in elderly women. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 18, p. 1367-1372, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.08.013>. Acesso em: 10 jul. 2021.

PARK, E. M.; PARK, Y. M.; GWAK, Y. S. Oxidative damage intissues of rats exposed to cigarette smoke. **Free Radical Biology & Medicine**, v 25, n. 1, p. 79-86, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00041-0). Acesso em: 10 jul. 2021.

PETROVSKI, B. E. et al. Selenium levels in men with liver disease in Hungary. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 1, p. 31-35, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.01.001>. Acesso em: 10 jul. 2021.

PILLAI, R.; UYEHARA-LOCK, J. H.; BELLINGER, F. P. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. **IUBMB Life**, v. 66, n. 4, p. 229-39, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/iub.1262>. Acesso em: 10 jul. 2021.

PISEK, L. et al. Changes in white blood cells in sheep blood during selenium supplementation. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 5, p. 255-259, 2008.

PRASAD, A. S. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 837-844, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.837>. Acesso em: 10 jul. 2021.

REDDY, C. S. S. S.; SUBRAMANYAM, M. V.; VANI, R.; DEVI, S. A. *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1355-64, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SARADA, S. K. et al. Selenium protects the hypoxia induced apoptosis in neuroblastoma cells through upregulation of Bcl-2. **Brain Research**, v. 1209, p. 29-39, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.041>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SCHWEIZER, U. et al. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. **Brain Research Review**, v. 45, n. 3, p. 164-178, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.03.004>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 283-293, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05036-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05036-9). Acesso em: 10 jul. 2021.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922004000400008>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SONG, E. et al. Selenium supplementation shows protective effects against patulin-induced brain damage in mice via increases in GSH-related enzyme activity and expression. **Life Sciences**, v. 109, n. 1, p. 37-43, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.05.022>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SOLOVYEV, N.; DROBYSHEV, E.; BLUME, B.; MICHALKE, B. Selenium at the Neural Barriers: A Review. **Frontiers Neuroscience**, v. 15, p. 630016, 2021. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffnins.2021.630016>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SOUZA JÚNIOR, T. P.; OLIVEIRA, P. R.; PEREIRA, B. Exercício físico e estresse oxidativo: efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 1, p. 91-96, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922005000100010>. Acesso em: 10 jul. 2021.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 536, n. 2, p. 152-157, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.02.021>. Acesso em: 10 jul. 2021.

TIAN, D. P.; SU, M.; WU, X. Y.; ZHANG, G. Effects of selenium and B-27 supplements on viability and differentiation of neural stem cell in newborn rat. **Chinese Journal of Preventive Medicine**, v. 12, p. 324-327, 2005.

TOYRAN, N.; TURAN, B.; SEVERCAN, F. Selenium alters the lipid content and protein profile of rat heart: An FTIR microspectroscopic study, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 458, n. 2, p. 184-193, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.12.012>. Acesso em: 10 jul. 2021.

VENN, B. J.; GRANT, A. M.; THOMSON, C. D.; GREEN, T. J. Selenium supplements do not increase plasma total homocysteine concentrations in men and women. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 2, p. 418-420, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/133.2.418>. Acesso em: 10 jul. 2021.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, p.271-278, 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1). Acesso em: 10 jul. 2021.

VIITA, L. M.; MUTANEN, M. L.; MYKKÄNEN, H. M. Selenium-iron interaction in young women with low selenium status. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 2, n. 1, p. 39-42, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.1989.tb00006.x>. Acesso em: 10 jul. 2021.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 7, p. 577-83, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00760-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00760-8). Acesso em: 10 jul. 2021.

WHANGER, P. D. Selenium and the brain: a review. *Nutritional Neuroscience*, v. 4, n. 2, p. 81-97, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1028415x.2001.11747353>. Acesso em: 10 jul. 2021.

YEO, E.; KANG, S. K. Selenium effectively inhibits ROS-mediated apoptotic neural precursor cell death in vitro and in vivo in traumatic brain injury. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, n. 11-12, p. 1199-1210, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.09.004>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ZHANG, Q. et al. Effects of oral selenium and magnesium co-supplementation on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in rats fed a high-fat diet. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 165, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0815-4>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ZHANG, Y. et al. Selenium Deficiency Induces Inflammation via the iNOS/NF- κ B Pathway in the Brain of Pigs. **Biological Trace Element Research**, v. 196, n. 1, p. 103-109, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01908-y>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ZHU, Z.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y.; NAKATSU, S.; ODA, Y.; KIKUCHI, H. Effect of selenium on malignant tumor cells of brain. **Biological Trace Element Research**, v. 49, n. 1, p. 1-7, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf02788998>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ANEXO A – RELAÇÃO DE PESOS E MISTURAS DAS AMOSTRAS

Amostra	ID	peso eppendorf	peso amostra + eppendorf	Peso amostra (g)	Homogeneização (mL)	TBARS						Catalase (CAT):			Tiol não proteico (NPSH)				
						S1 (mL):Tris/HC 150mM pH 7.4	adicionar	qde de S1 (uL)	TBA 0.8% (uL)	Tampão ácido Acético (uL)	SDS 8.1% (uL)	H2O (uL)	qde de S1 (uL)	TFK 50mM (uL)	H2O2 (uL)	qde de S1 (uL)	TCA10% (uL)	TFK 1M (uL)	DTNB (uL)
Cérebro	0.1.0	0,9043	1,0355	0,1312	5	0,656	-34,4	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.1.1	0,8897	1,1175	0,2278	5	1,139	13,9	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.1.2	0,8854	1,0891	0,2037	5	1,0185	1,85	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.2.0	0,9094	1,0421	0,1327	5	0,6635	-33,65	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.2.1	0,9104	1,3325	0,4221	5	2,1105	111,05	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.2.2	0,9228	1,2723	0,3495	5	1,7475	74,75	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.3.0	0,8915	1,1692	0,2777	5	1,3885	38,85	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.3.1	0,8777	1,0476	0,1699	5	0,8495	-15,05	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.3.2	0,8705	1,1652	0,2947	5	1,4735	47,35	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.4.0	0,8711	1,1283	0,2572	5	1,286	28,6	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.4.1	0,8853	1,2099	0,3246	5	1,623	62,3	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	0.4.2	0,882	1,1018	0,2198	5	1,099	9,9	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.1.0	0,8994	1,1253	0,2259	5	1,1295	12,95	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.1.1	0,8645	1,0233	0,1588	5	0,794	-20,6	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.1.2	0,9008	1,1131	0,2123	5	1,0615	6,15	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.2.0	0,8717	1,0569	0,1852	5	0,926	-7,4	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.2.1	0,8855	1,1581	0,2726	5	1,363	36,3	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.2.2	0,8652	1,118	0,2528	5	1,264	26,4	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.3.0	0,8992	1,1667	0,2675	5	1,3375	33,75	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.3.1	0,8908	1,0491	0,1583	5	0,7915	-20,85	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.3.2	0,9029	1,0936	0,1907	5	0,9535	-4,65	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.4.0	0,899	1,1234	0,2244	5	1,122	12,2	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.4.1	0,879	1,1215	0,2425	5	1,2125	21,25	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	1.4.2	0,8862	1,2391	0,3529	5	1,7645	76,45	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.1.0	0,8823	1,0878	0,2055	5	1,0275	2,75	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.1.1	0,9037		-0,9037	5	-4,5185	-551,85	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.1.2	0,8988	1,014	0,1152	5	0,576	-42,4	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.2.0	0,9026	1,0702	0,1676	5	0,838	-16,2	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.2.1	0,8956	1,07	0,1744	5	0,872	-12,8	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.2.2	0,8999	1,106	0,2061	5	1,0305	3,05	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.3.0	0,9258	1,0828	0,157	5	0,785	-21,5	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.3.1	0,8921	1,1898	0,2977	5	1,4885	48,85	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.3.2	0,8903	1,0193	0,129	5	0,645	-35,5	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.4.0	0,8716	1,1898	0,3182	5	1,591	59,1	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.4.1	0,8771	1,1279	0,2508	5	1,254	25,4	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50
Cérebro	2.4.2	0,9013	1,109	0,2077	5	1,0385	3,85	200	500	500	200	100	100	2860	105	500	500	750	50

ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO

Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde Tarefas **1** Português (Brasil) Ver o Site omarsyd

OJS
OPEN JOURNAL SYSTEMS


Submissões

2703 / **EL SAYED** / AVALIAÇÃO DO SELÊNIO NO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBROS DE RATOS [Biblioteca da Submissão](#)

Fluxo de Trabalho **Publicação**

Submissão **Avaliação** Edição de Texto Editoração

Arquivos da Submissão [Q Buscar](#)

▶  8722-1	omarsyd, ARTIGO - AVALIAÇÃO DO SELENIO NO ESTRESSE OXIDATIVO EM CEREBOS DE RATOS.pdf	September 13, 2021	Texto do Artigo
--	--	--------------------	-----------------

[Baixar Todos os Arquivos](#)