

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

AÇÕES ANTIOXIDANTES E IMUNOLÓGICAS DO
SELÊNIO EM CÃES

THAILA CRISTINA PUTAROV

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor.

BOTUCATU - SP

Agosto, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

AÇÕES ANTIOXIDANTES E IMUNOLÓGICAS DO
SELÊNIO EM CÃES

THAILA CRISTINA PUTAROV
Zootecnista

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Roberto Sartori
Co-orientador: Prof. Ass. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi
Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor.

BOTUCATU - SP
Agosto, 2014

À minha mãe amada, Amalia Putarov, que caminha ao meu lado sempre, que me apoia,
me dá colo, me dá bronca e que me entende só pelo olhar!
Se chorei ou se sorri, o importante é que emoções eu vivi!
E o mais importante é que você sempre esteve comigo durante todas elas!

Dedico

Ao meu "Bob Querido Pai José Putarov" (*in memoriam*).

Que você meu pai, possa se orgulhar da sua menina, seu amor! Sinto muito sua falta.

Ofereço

***“Não eduque o seu filho para ser rico, eduque-o para ser feliz.
Assim, ele saberá o valor das coisas e não o seu preço. ”***

(Max Gehringer)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CARA lá de cima!! Obrigada meu Deus por tudo o que me deu e por me carregar no colo sempre que precisei e peço desculpas por algumas vezes não ter reconhecido isto! Agradeço a minha Nossa Senhora das Graças que me guia e me protege e a todos os meus anjos protetores!

Agradeço à minha família amada e pela minha família amada, minha mãe Amalia Putarov, meu pai José Putarov (*in memoriam*), meus irmãos José Putarov Junior, Alexandre Putarov, Denis Rodrigo Putarov, André Leonardo Putarov e Igor Maximiano Putarov. A vocês devo o melhor de minha vida, com vocês cresci pessoalmente e profissionalmente, são meus exemplos de como fazer e algumas vezes de como não fazer, mas com certeza são meus exemplos de AMOR E UNIÃO. Peço perdão por minha ausência em diversos momentos familiares e agradeço a compreensão e o apoio, por mais que seja difícil entender o porquê de alguém que estuda em uma das melhores universidades do país passe por tantos imprevistos. Porém, o mais importante de tudo é que sempre estaremos juntos, um por todos e todos por um.

Agradeço ao meu companheiro de vida, Robson Sfaciotti Barducci, por toda a compreensão e o amor que tem me dado. Você é peça fundamental na construção do meu ser, e já que estamos sempre "em construção" você tem grande responsabilidade desde o dia que iniciamos a nossa relação, ainda mais agora com o nosso primeiro baby chegando! Agradeço aos céus este presente lindo que recebemos para cuidar, mesmo sem saber como será esta nova aventura. Amo vocês desde sempre!

Agradeço aos meus sobrinhos Pietra Costa Putarov, Beatriz Mandeli Putarov, Niklos Lazarin Putarov, Julia Bauco Putarov e Rafael Moreno Putarov por me fazerem completa. E a vocês devo as mais sinceras desculpas de minha ausência, mas como sempre digo estou construindo um futuro para todos nós. Agradeço ao meu tiozão companheiro Ivo Gerônimo por todo o carinho comigo desde sempre.

Às minhas cunhadas Milena Bauco Putarov, Adriana Fuzaro e Márcia Moreno por fazerem meus irmãos felizes. Continuem assim que sempre terão uma grande amiga com quem contar, caso contrário prefiro não deixar relatado o que poderá acontecer.

Ao meu querido amigo e orientador, Prof. Dr. José Roberto Sartori que sentirá muito a minha falta e eu imensamente a dele. Obrigada Sartori por todos esses anos

juntos, sem dúvida alguma você morará no meu coração para sempre. Obrigada por tudo, não vou dizer que você é como um pai, mas sim como um irmão mais velho, obrigada pela confiança, pelas risadas, pelas orientações da tese e da vida. Você com certeza faz muita diferença na minha vida!

Ao Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi por toda a amizade e oportunidade ao longo desses seis anos de convivência. Obrigada por todos os seus momentos de entusiasmo com certeza estes momentos foram de grande aprendizado. Obrigada por me ensinar o verdadeiro lado humano das pessoas, a sua simplicidade e humildade são admiráveis.

Aos meus professores da FMVZ e da PPG em Zootecnia não apenas por contribuírem com o trabalho, mas por todo aprendizado e exemplo para a formação de um Zootecnista. Vocês são exemplos de profissionais e de pessoas, e agradeço por sempre me tratarem com muito carinho e atenção, vocês realmente são professores. À querida FMVZ e ao PPG em Zootecnia muito obrigada por todos estes anos de aprendizado.

Agradeço ao Luis Carlos Fernandes (Carlão), Seila Cristina Cassinelli Vieira, e Carlos Pazini Junior, a atenção e carinho ao longo destes anos.

Aos amigos Alexandre Perdigão, Cinthia Rio Branco da Silva, Maria Carolina Franzói, Katiani Silva Venturini e Bruna Ponciano Neto sem vocês não teríamos razão para o experimento! Obrigada pelos dias eternos na fábrica de ração, pela diversão garantida e pela amizade!

Aos meus estagiários mais do que queridos pela ajuda na condução do experimento: Rosane de Oliveira Cruz, Amanda Vitta, Fernanda Santos Fortes, Karoline Gomes da Silva, Peterson Dante Gavasso Pacheco, Fernanda Mendonça e Larissa Ayane.

À Fernanda Sant'Anna Kroll e ao Leandro Zaine por tantos pilotos realizados, tantos laboratórios visitados e metodologias aprendidas!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Márcia de Oliveira Sampaio Gomes, Ana Paula Judice Maria, Claudia Nogueira, Diego Nogueira, Elaine Vitta, Fabiano César Sá, Bruna Agy, Flávio Lopes, Mariana Monti, Mayara Peixoto, Raquel Silveira Pedreira e Michele Oliveira.

Aos amigos queridos que sempre estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos professores Dr. Silvio Luiz de Oliveira e Dr. Hélio Montassier pelo auxílio na condução do experimento. Aos colegas Batista e Hélinho pelo auxílio na fábrica de ração. Ao Helanderson A. Balderramas pelo auxílio com as análises de imuno, à Isa e Wendy, Fabiana e Denise que nos auxiliaram neste novo mundo que foi a citometria de fluxo.

Às empresas que apoiaram de alguma forma este experimento: Biorigin, Mogiana Alimentos, MCassab, Dilumix e SPF do Brasil.

Ao CNPq (processos 478050/2011-9 e 140413/2011-1) pela bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro ao projeto! À CAPES pela oportunidade de realizar o doutorado sanduiche através do Programa PDSE.

To whom that made my days easier in Manhattan-KS: Tony and Barbara Siebold, Daniel Ardisson-Araujo, Sara Hirata, Gabriel Granço and Gabriella Pereira. Thank you very much!

Aos cães e gatos do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos, obrigada por me fazerem uma pessoa cada dia melhor!

À todos que de alguma forma contribuíram para a construção do meu ser e a execução do projeto.

MUITO OBRIGADA!

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

(Clarice Lispector)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	01
1. Introdução	02
2. Revisão de literatura	03
2.1.Selênio na natureza.....	03
2.2.Vias metabólicas.....	04
2.3.Selênio e o sistema antioxidante.....	05
2.4.Selênio e o sistema imune.....	08
3. Referências bibliográficas	13
CAPÍTULO 2 – AÇÃO IMUNOLÓGICA DO SELÊNIO PARA CÃES ADULTOS	19
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e métodos	23
Resultados	34
Discussão	54
Conclusão	58
Referências bibliográficas	58
CAPÍTULO 3 - AÇÃO ANTIOXIDANTE DO SELÊNIO PARA CÃES ADULTOS	63
Resumo	65
Abstract	66
Introdução	67
Material e métodos	68
Resultados	75
Discussão	88
Conclusão	91
Referências bibliográficas	91
CAPÍTULO 4 - IMPLICAÇÕES	96
Implicações	97

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A maior conscientização da população em relação aos benefícios da alimentação industrializada para cães e gatos, incluindo melhor custo/benefício e maior controle da saúde do animal fez com que aparecessem no mercado inúmeros produtos, ingredientes e empresas de nutrição pet. Hoje, ao procurar um alimento para o animal de estimação o proprietário se depara com grande variedade de produtos e com diferentes apelos nutricionais nas embalagens.

Por tornarem-se, em muitas situações, tão importantes como membros da família e para a sociedade, a nutrição de animais de companhia tem caminhado lado a lado com os avanços da nutrição humana. Os conceitos sobre nutrição de cães e gatos se expandiram além da fronteira da sobrevivência e satisfação da fome, buscando-se cada vez mais a utilização de alimentos que promovam bem-estar e melhora na saúde, além de reduzir risco de doenças (FAHEY, 2003). O foco tem sido direcionado para obtenção de uma dieta balanceada que maximize a expectativa e a qualidade de vida com a utilização de ingredientes que desenvolvam a capacidade de resistência às doenças e melhorem a saúde. Procura-se entender como a dieta pode influenciar os mecanismos de defesa do organismo, e como esta ação é exercida por vários dos nutrientes considerados essenciais, tais como: aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais.

Um dos minerais com grande apelo nos produtos *Pet Food* é o selênio. O selênio é considerado um dos mais controversos elementos traços. Por um lado é tóxico em altas concentrações para algumas espécies, por outro, sua deficiência causa problemas relacionados ao aumento na susceptibilidade a várias doenças em humanos e animais, e afeta negativamente a produção e reprodução animal (LYONS et al., 2007). Geralmente as doses de selênio adicionadas na ração são doses recomendadas para a manutenção do animal e não para uma ativação ou melhora do sistema imune e antioxidante.

A modulação do sistema imunológico e o equilíbrio do sistema antioxidante são de grande importância para a saúde de cães e gatos e contribuem consideravelmente para o aumento da expectativa de vida. Compreender a influência do selênio na saúde

de cães e gatos e a interação entre o sistema antioxidante e imunológico é de grande relevância para o estudo da nutrição de animais de companhia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Selênio na natureza

O selênio foi descoberto pelo químico sueco J. J. Berzelius em 1817. É um elemento não metálico do grupo 6A da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro diferentes estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}) (EISLER, 1985). As propriedades químicas são semelhantes as do enxofre e na natureza pode ser encontrado tanto em sua forma orgânica quanto inorgânica, dependendo do agente ligante que pode ser um metal ou não metal.

É um mineral muito difundido na crosta terrestre e sua concentração nos solos pode variar de 0,1 a 2 ppm (LYONS et al., 2007). O selênio presente nos solos é consequência da ação do intemperismo nas rochas fosfatadas, sedimentares e ígneas, da atividade vulcânica e queima de combustíveis fósseis (FRANKENBERGER e BENSON, 1994). O teor e a forma de selênio nos solos dependem do pH, do potencial redox e composição mineral do meio, além da fertilização artificial e das chuvas (LYONS et al., 2007). Por isso, a concentração deste mineral nos tecidos vegetais é tão variável. No solo, o selênio encontra-se principalmente em sua forma inorgânica; nas plantas o que predomina é a forma orgânica como selenometionina ou selenocisteína e, esta, é a principal forma que os animais ingerem selênio na natureza (COMBS e COMBS, 1986).

2.2. Vias metabólicas

A absorção do selênio não é regulada metabolicamente, no entanto, as quantidades de selênio absorvidas são dependentes de sua forma química, de sua concentração nas fontes da dieta, do processamento sofrido pelo alimento, da interação com outros nutrientes, da digestibilidade das fontes e de outros fatores que podem afetar sua biodisponibilidade (JACQUES, 2001).

O mecanismo pelo qual o selênio é absorvido determina sua taxa de absorção; as fontes orgânicas e inorgânicas não são absorvidas pelo mesmo mecanismo. A maior parte do selenito é absorvida no duodeno por difusão passiva, enquanto que o selenato é

ativamente absorvido no íleo por co-transporte com íons de sódio. O selênio oriundo da selenometionina também é absorvido no intestino delgado, com maior taxa de absorção no duodeno. Sua absorção ocorre pelo sistema sódio dependente e divide o mesmo mecanismo de transporte com a metionina, assim como a selenocisteína que compete com a cisteína, lisina e arginina (JACQUES, 2001).

Wastney et al. (2011) em recente estudo com humanos desenvolveu um modelo para as vias metabólicas do selênio oriundo da selenometionina e do selenito de sódio utilizando a técnica de isótopos estáveis, no qual ambos são convertidos a uma mesma molécula o hidreto de selênio (H_2Se) para depois ocorrer síntese de selenocisteína (FRANKENBERGER e BENSON, 1994; SIMCOCK, 2002), que é o aminoácido presente nas selenoproteínas e é considerado o 21º aminoácido especificado no código genético (RAYMAN, 2002).

O metabolismo do selênio possui diversas rotas metabólicas que, provavelmente, estão relacionadas à síntese das selenoproteínas que desempenham várias funções no organismo. A principal função biológica do selênio está associada à sua incorporação nas selenoproteínas, sendo que a mais conhecida é glutathione peroxidase, que contém selenocisteína na cadeia polipeptídica (SODA et al., 1988; RAYMAN, 2005; HUANG et al., 2012). As selenoproteínas são necessárias para o equilíbrio do sistema antioxidante, o metabolismo normal da tireóide, ocorrência de reações redox, para adequado funcionamento do sistema imune e formação de espermatozóides (RAYMAN, 2000; THOMSON, 2004).

A selenometionina pode ser incorporada às proteínas de maneira não específica, ou seja, no lugar da metionina formando outras moléculas como a hemoglobina, e não apenas incorporada às moléculas selênio dependentes, sendo que esta selenometionina pode ser reciclada (BURK et al., 2003; WASTNEY et al., 2011). Por intermédio de diversas rotas metabólicas, o Se oriundo do selenito de sódio apresenta maior excreção quando comparado ao Se da selenometionina, e o período de *turnover* do selênio da selenometionina é maior, quando comparado com o do selenito de sódio (Wastney et al. 2011). O selênio e o enxofre possuem estrutura química semelhante e possivelmente utilizam vias metabólicas similares, utilizando até as mesmas enzimas. A selenometionina e a selenocisteína são moléculas análogas às moléculas de metionina e cisteína, respectivamente (JACQUES, 2001).

As formas inorgânicas quando não usadas na síntese de selenoproteínas sofrerão o processo de metilação, importante no metabolismo do selênio (GANTHER e LAWRENCE, 1997) e serão excretadas pelo pulmão ou pelos rins. O processo de metilação é o mecanismo de eliminação de selênio para desintoxicação do organismo (NAKAMURO et al., 2000).

Pehrson (1993) definiu que a maior vantagem em se suplementar animais com selênio orgânico não está na maior absorção, pois as formas inorgânicas também são bem aproveitadas e suprem as deficiências e, sim, na melhoria do status antioxidante que, muitas vezes, não é atingido com a suplementação de selênio inorgânico. Em ratos, tanto a fonte inorgânica selenito de sódio quanto as fontes orgânicas selenometionina e selenocisteína foram absorvidas acima de 90% (NRC, 2006).

O selênio é carregado no plasma, associado à albumina e selenoproteína P até os tecidos alvos. O selênio está associado às proteínas no organismo sendo primeiramente encontrado nos músculos e tecidos ricos em proteínas e pouco encontrado no tecido adiposo. Os níveis de selênio sanguíneos respondem às mudanças nas concentrações das dietas (HILL e ALDRICH, 2003). A concentração de selênio nos diversos órgãos varia com o consumo e é armazenado nos tecidos principalmente como selenocisteína e selenometionina. A principal via de excreção do selênio é pela urina, mas também podem ocorrer perdas pelo pulmão e fezes. As perdas fecais são constituídas do selênio não absorvido e excretado.

2.3. Selênio e o sistema antioxidante

O sistema antioxidante protege o organismo da formação de radicais livres. Essa proteção ocorre por meio de antioxidantes que estão presentes por todo o corpo. Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo de maneira eficaz (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; SIES e STAHL, 1995).

Os antioxidantes podem ser de origem endógena, quando são produzidos no próprio organismo e dividem-se em enzimáticos (glutaciona peroxidase, superóxido desmutase e catalase) e não enzimáticos (glutaciona, peptídeos de histidina, ubiquinona, bilerrubina e outros), ou podem ser de origem exógena como no caso da vitamina E, β -

carotenos, flavonóides, curcumina, polifenóis, taninos, entre outros, que são obtidos pela alimentação. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas por radicais livres nas células.

Os radicais livres são moléculas orgânicas ou inorgânicas que contêm um ou mais elétrons não pareados e que, por esta razão, são moléculas muito instáveis, com meia vida curta e quimicamente muito reativas (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e seus alvos celulares, tais como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA estão relacionados com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU e ANDERSON, 1997). Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. Algumas situações geradoras de radicais livres incluem: ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por microrganismos, alguns xenobióticos, radiação ionizante, isquemia e exercício físico extenuante (BENZI, 1993; PEREIRA, 1994; YU, 1994).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são exemplos de radicais livres e podem ser geradas de forma endógena durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, como por exposição ao álcool, fumo, drogas, raios ultravioletas, estilo de vida, entre outros. As principais EROs distribuem-se em dois grupos: os radicalares que incluem hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroperoxila (HOO^{\bullet}), alcoxila (RO^{\bullet}), peroxila (ROO^{\bullet}), peroxinitrito (ONOO^{\bullet}) e os não-radicalares, que incluem oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (JORDÃO JR. et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2007).

Para se defender destas espécies reativas de oxigênio, as células aeróbicas desenvolveram vários mecanismos de defesa. O primeiro mecanismo de defesa é formado pelas enzimas antioxidantes superóxido desmutase, catalase e a enzima glutationa peroxidase; esta última, como já foi citada anteriormente, é dependente de selênio e atua por todo o organismo. A atividade enzimática de GSH-Px é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares (COHEN e HOCHSTEIN, 1963; MEISTER e ANDERSON, 1983).

O principal problema é que o H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina radical hidroxila. Este último é, entre as EROs, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar. Estas espécies reativas de oxigênio para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando esta última uma espécie também radicalar e, a consequência disto, é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, do DNA e das proteínas (DURAN, 1987).

A GSH-Px funciona convertendo a glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG), reduzindo H_2O_2 e formando água: $2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{ação GSH-Px}} GSSG + 2H_2O$.

A família de GSH-Px reduz H_2O_2 e outros peróxidos em água ou álcool. Existem seis tipos de GSH-Px e todas com ação antioxidante. A GSH-Px 1 é encontrada no citosol de todas as células do organismo e, além de sua função antioxidante, parece ser uma forma de armazenagem de selênio no organismo. A GSH-Px 2 ou gastrintestinal é específica do trato gastrintestinal e a GSH-Px 3 ou plasmática ou extracelular é encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos. A GSH-Px 4 atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA (RAYMAN, 2000). A GSH-Px 4 também é conhecida como *fosfolipídeo hidroperóxido glutatona peroxidase* (PHGSH-Px) e promove a redução de hidroperóxidos a partir de complexos lipídicos como colesterol, mesmo quando os peróxidos estão presentes na membrana celular (LEHMANN et al., 1998). As funções das GSH-Px 5 e 6 ainda são pouco estudadas, porém também atuam no sistema antioxidante (BECKETT e ARTHUR, 2005).

Ainda, com função antioxidante, o selênio também é componente essencial das selenoproteínas P e W. A selenoproteína P, além de função antioxidante, tem a função de transportar o selênio até o fígado e é a selenoproteína mais abundante no plasma sanguíneo (BURK et al., 2003). A selenoproteína W possui ação antioxidante e é encontrada nos músculos cardíacos e esqueléticos (BECKETT e ARTHUR, 2005).

O selênio age no sistema antioxidante sendo componente das selenoproteínas e atua indiretamente ou diretamente evitando o estresse oxidativo. O selênio pode atuar

ainda, economizando a vitamina E, a qual tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas.

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo de sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados pelas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que, muitas vezes, os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (DOROSHOW, 1983; HALLIWELL et al., 1995; WEIJL et al., 1997).

Os radicais livres podem ser gerados pela ação do sistema imunológico; portanto, se houver produção exagerada ou o sistema antioxidante não estiver agindo da maneira correta podem ocorrer danos nas macromoléculas (McBRIDE et al., 1991) e doenças (DIETERT e GOLEMBOSKI, 1998). O status antioxidante do indivíduo é de grande importância para o ótimo funcionamento do sistema imune (SURAI, 2002).

2.4. Selênio e sistema imune

O selênio é essencial para ótima reposta imunológica e, embora o mecanismo de ação deste mineral não esteja completamente entendido, ele influencia tanto a resposta imunológica natural/inata quanto a adaptativa (TURNER e FINCH, 1991; SURAI, 2003). No sistema imunológico, os efeitos biológicos do Se são também exercidos por meio de sua incorporação dentro das selenoproteínas, as quais estão envolvidas na ativação, proliferação e diferenciação de células que atuam na resposta imune inata e adaptativa (HUANG et al., 2012). A imunidade inata consiste de mecanismos que existem antes da infecção e que são capazes de rápidas respostas aos microrganismos e é constituída por barreiras físicas e químicas que abrangem neutrófilos, monócitos, macrófagos, fatores ou proteínas do sistema complemento, citocinas e proteínas de fase aguda, e que resultam na defesa imediata do organismo (PARKIN e COHEN, 2001; ARTHUR et al., 2003).

A imunidade adquirida pode ser dividida em humoral e celular. A imunidade celular é importante para combater microrganismos, inacessíveis aos anticorpos circulantes, promovendo a destruição destes microrganismos residentes nos fagócitos ou a lise das células infectadas, e é a função efetora dos linfócitos T citotóxicos (ABBAS et al., 2003). Os vírus e os outros organismos intracelulares são eliminados por dois processos. Em um processo, as células infectadas são mortas rapidamente de forma que

o invasor não tenha tempo para crescer; e em outro processo, a célula infectada é ativada de maneira a desenvolver a habilidade de destruir organismos intracelulares (TIZARD, 2002).

A suplementação de selênio parece aumentar significativamente os linfócitos T citotóxicos e as células T ativadas. Hawkes et al. (2001) sugeriram que estas propriedades imunes do selênio são resultantes da melhor ativação e proliferação de linfócitos B e do reforço das funções das células T.

A deficiência de selênio afeta a proliferação de linfócitos, a atividade de neutrófilos e macrófagos (ARTHUR et al., 2003), a atividade fagocitária e a produção de anticorpos, dependendo do agente patogênico e do conteúdo da vitamina E na dieta (FINCH e TURNER, 1996). Broome et al. (2004) forneceram cápsulas diárias com 0 µg, 50 µg ou 100 µg de selênio por 15 semanas a seres humanos e constataram que após a vacinação com vacina atenuada de poliovírus ocorreu um pico de citocinas IFN-γ e IL-10 nos grupos que receberam o selênio. A citocina IFN-γ possui função importante nos mecanismos regulatórios de indução da imunidade antiviral, incluindo a ativação de linfócitos citotóxicos e células natural killer, e sua ação pode ser aumentada com a suplementação de selênio (BROOME et al., 2004). A proliferação de linfócitos em resposta a mitógenos é menor em linfócitos deficientes em selênio e a síntese de leucotrieno B₄, o qual é essencial para quimiotaxia de neutrófilos, também é comprometida na deficiência deste mineral (ARTHUR et al., 2003).

Em humanos, a suplementação diária com 200 µg de selênio, durante 8 semanas, induziu a alta afinidade de receptores de IL-2, reforçou a proliferação e diferenciação de células citotóxicas e o aumento da atividade de células natural killer. Esplenócitos (linfócitos T e B) estimulados com mitomicina C e que foram extraídos do baço de camundongos tratados por 8 semanas com dieta suplementada com 2 ppm de selênio apresentaram maior proliferação quando comparados aos de camundongos suplementados com 0,2 ppm de selênio. O Se pode ter exercido este efeito por meio da modulação da expressão do receptor de alta afinidade para IL-2. O Se é exigido para a expressão do receptor de IL-2 (IL-2R) e/ou para aumentar o número de IL-2R nas células ou ainda para aumentar o número de células que expressam IL-2R (KIREMIDJIAN-SCHUMACHER et al., 1992).

Os neutrófilos produzem radicais livres para combater os agentes invasores e estes radicais podem, inclusive, atacar os neutrófilos. Por isso, se faz necessário um eficiente sistema antioxidante, pois, embora o Se não altere o número de neutrófilos, alguns pontos de sua função ficam comprometidos na deficiência de selênio (TURNER e FINCH, 1991). Os neutrófilos de camundongos, ratos e bovinos deficientes em Se são menos capazes de combater os patógenos *in vitro* do que neutrófilos de animais que receberam quantidades suficientes de Se na dieta (ARTHUR et al., 2003).

A imunidade adaptativa ou específica inclui a imunidade humoral e a mediada por células. A imunidade humoral é mediada pelos anticorpos liberados pelos linfócitos B e é baseada na produção de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, entre outras) que são responsáveis pelo reconhecimento específico e eliminação de vários antígenos: ligam-se e removem do organismo as substâncias ou organismos invasores (SURAI, 2006). A deficiência de Se pode afetar a imunidade humoral adaptativa, por exemplo, os valores de IgG, IgM e IgA em ratos e os de IgM e IgG em humanos deficientes em Se foram diminuídos (ARTHUR et al., 2003).

Spallholz et al. (1973) sugeriram que o selênio pode potencializar a síntese de anticorpos circulantes. Estes autores mostraram que os maiores valores de IgM e IgG foram encontrados em ratos que receberam dietas suplementadas com 1 a 3 ppm de selênio após 7 dias da injeção de eritrócito de carneiro (SRBC), e que em ratos com deficiência ou excesso selênio esses níveis foram bem mais baixos. Outro estudo com ratos que passaram por deficiência de selênio durante a gestação, lactação e desmame demonstrou que estes tiveram redução na produção dos anticorpos IgG e IgM após inoculação com SRBC (MULHERN et al., 1985).

Awadeh et al. (1998) estudando fontes e níveis de selênio adicionados ao sal para vacas de leite e bezerros encontram que as concentrações de IgG e IgM foram menores em animais que receberam 20 ppm de Se adicionado ao sal do que os que receberam 60 e 120 ppm de Se, e quanto a fonte utilizada os animais que receberam 60 ppm de seleno levedura tiveram maiores concentrações de IgM. Estes autores também mostraram que o colostro das vacas que receberam 120 ppm de selênio tinha maiores concentrações de IgG e que, por consequência, seus bezerros apresentaram maiores concentrações de IgG no plasma sanguíneo.

O selênio influencia mais os linfócitos T do que os linfócitos B, isto ocorre, provavelmente, devido ao elevado número de ácidos graxos poliinsaturados presentes nos linfócitos T (LARSEN, 1993). A deficiência de selênio afeta a maturação de subpopulações de linfócitos e a funcionalidade e a capacidade de proliferação dos linfócitos periféricos (SURAI, 2006). A administração de doses suplementares de selênio levedura para idosos por um período de seis meses tem efeito estimulante na resposta de linfócitos (PERETZ et al., 1991). Broome et al. (2004) forneceram 0, 50 ou 100 µg de selênio na forma de cápsulas a seres humanos diariamente por 15 semanas e constataram que a suplementação de selênio aumentou as porcentagens totais de células T e de células CD4+ (T helper). A proliferação das células T ocorreu mais rapidamente em indivíduos suplementados com selênio do que nos que receberam placebo sugerindo que os grupos que receberam selênio tiveram a habilidade em aumentar a resposta imune aos desafios virais.

O selênio dietético e as selenoproteínas não são importantes apenas para ativar ou melhorar a imunidade, mas estão envolvidos na imunoregulação, que é essencial para a prevenção das respostas excessivas que podem conduzir a autoimunidade e a inflamação crônica (HUANG et al., 2012).

Segundo McKenzie et al. (1998), a suplementação de Se pode melhorar a imunidade por três mecanismos principais: (1) pela alta afinidade com os receptores de IL-2, regulando a expressão de células T e sendo um veículo para melhorar as respostas destas células; (2) por impedir os danos induzidos pelo estresse oxidativo nas células imunes e (3) por alterar a agregação plaquetária e baixar a taxa de tromboxanos/leucotrienos produzidos. Doses suplementares de selênio melhoraram a resposta imunológica e protegeram contra certas infecções virais conferindo adicionais benefícios à saúde (MCKENZIE et al., 2002 citado por MATEOS et al., 2004).

Não há estudos que avaliam os efeitos das fontes de selênio na resposta inflamatória ou imunidade para cães adultos e os trabalhos em outras espécies considera que a função biológica do selênio está relacionada com sua incorporação nas selenoproteínas. Portanto, faz-se necessário conhecer e entender sobre as fontes de selênio que são usadas na formulação de rações *Pet* e seus efeitos no organismo, para poder alcançar um aproveitamento ótimo deste mineral, tanto pelo animal quanto pela indústria.

O capítulo 2, denominado “**AÇÃO IMUNOLÓGICA DO SELÊNIO PARA CÃES ADULTOS**” apresenta-se de acordo com as normas para publicação no Journal of Animal Science, exceto pelo idioma e posicionamento de tabelas. Os objetivos do trabalho foram avaliar o efeito dose resposta do selênio levedura sobre a resposta imune de cães, comparando-os com os promovidos pelo selenito de sódio.

O capítulo 3, denominado “**AÇÃO ANTIOXIDANTE DO SELÊNIO PARA CÃES ADULTOS**” apresenta-se de acordo com as normas para publicação no Journal of Animal Science, exceto pelo idioma e posicionamento de tabelas. Os objetivos do trabalho foram avaliar o efeito dose resposta do selênio levedura sobre os parâmetros antioxidantes de cães, comparando-os com os promovidos pelo selenito de sódio.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro, Revinter, 2003. Ed 4. 486p.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ARTHUR, J.R.; MCKENZIEY, R.C.; BECKETT, G.J. Selenium in the immune system. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1457S–1459S, 2003.
- AWADEH, F.T.; KINCAID, R.L.; JOHNSON, K.A. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1204-1215, 1998.
- BECKETT, G.J.; ARTHUR, J.R. Selenium and Endocrine Systems. **Journal of Endocrinology**, v.184, p.455-465, 2005.
- BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free radicals. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.33, p.205-222, 1993.
- BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BROOME, C.S.; MCARDLE, F.; KYLE, J.A.M.; ANDREWS, F.; LOWE, N.M.; HART, C.A.; ARTHUR, J.R.; JACKSON. M.J. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 154-162, 2004.
- BURK, R.F.; HILL, K.E.; MOTLEY, A.K. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1517S-1520S, 2003.
- COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, v.2, p.1420-1428, 1963.
- COMBS JR., G.F.; COMBS, S.B. **The role of selenium in nutrition**. Orlando: Academic Press, 1986. 180p.
- DIETERT, R.R; GOLEMBOSKI, K.A. Avian macrophage metabolism. **Poultry Science**, v.77, p.990-997, 1998.

- DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v.43, n.2, p.460-472, 1983.
- DURAN, N.; CADENAS, E. The role of singlet oxygen and triplet carbonyls in biological systems. **Research on Chemical Intermediates**, v. 8, p.147-187, 1987.
- EISLER, R. Selenium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. **Fish and Wildlife Service Biological Report**, v.85, p.5-57, 1985.
- FAHEY, G.C. Research needs companion animal nutrition. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. **Pet food technology**. Mt. Morris:Illinois, 2003, p. 135-140.
- FINCH, J. M.; TURNER, R.J. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. **Research in Veterinary Science**, v. 60, p.97-106, 1996.
- FRANKENBERGER JR., W.T.; BENSON, S. **Selenium in the environment**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1994. 456p.
- GANTHER, H.E.; LAWRENCE, J.R. Chemical transformations of selenium in living organisms. improved forms of selenium for cancer prevention. **Tetrahedron**, v. 53, n. 36, p. 12299-12310, 1997.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, n.6, p. 598-620, 1992.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2ed. Oxford: University Press, 1989. 543p.
- HAWKES, W.C.; KELLEY, D.S.; TAYLOR, P.C. The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men. **Biological Trace Element Research**, v.81, p.189-213, 2001.
- HILL, D.A.; ALDRICH, G. Essentials of mineral nutrition. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. (Eds.). **Pet Food Technology**. Mt. Morris, IL: Watt Publishing Co., 2003. p.121-128.

- HUANG, Z.; ROSE, A.H; HOFFMANN P.R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.16, n.7, p.705-43, 2012.
- JACQUES, K.A. Selenium metabolism in animals: the relationship between dietary selenium form and physiological response. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A. (Eds) Science and Technology in the Feed Industry. 2001. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 2001. p.319-348.
- JORDÃO JR., A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANNUCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v.31, p. 434-449, 1998.
- KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L.; ROY, M.; WISHE, H.I.; COHEN, M.W.; STOTZKY, G. Regulation of Cellular Immune Responses by Selenium. **Biological Trace Element Research**, v.33, 23-35, 1992.
- LARSEN, H.J. Relation between selenium and immunity. **Norwegian Journal of Agriculture Science**, suppl. 11, p.105-109, 1993.
- LEHMANN, C.; WOLLENBERGER, U.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHELLER, F.W. Bioelectrocatalysis by a selenoenzyme. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 455, p.259-263, 1998.
- LYONS, M.P.; PAPAZYAN, T.T.; SURAI, P.F. Selenium in food chain and animal nutrition: lessons from nature. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 20, n.7, p.1135-1155, 2007.
- MATEOS, G.G.; LAZARO, R.; ASTILLERO, J.R.; SERRANO, M.P. Trace minerals: what text books don't tell you. In: JA TAYLOR-PICKARD AND LA TUCKER (eds). **Re-defining Mineral Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2004. p. 21-61.
- MCCRIDE, T.J.; PRESTON, B.D.; LOEB, L.A. Mutagenic spectrum resulting from dna damage by oxygen radicals. **Biochemistry**, v.30, p.207-213, 1991.
- MCKENZIE, R.C.; RAFFERTY, T.S.; BECKETT, G.J. Selenium: an essential element for immune function. **Immunology Today**, v.19, n.8, p.342-345, 1998.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

- MULHERN, S.A.; TAYLOR, G.L.; MAGRUDER, L.E.; VESSEY, A.R. Deficient levels of dietary selenium suppress the antibody response in first and second generation mice. **Nutrition Research**, v.5, p. 201-210, 1985.
- NAKAMURO, K.; OKUNO, T.; HASEGAWA, T. Metabolism of selenoamino acids and contribution of selenium methylation to their toxicity. **Journal of Health Science**, v. 46, n. 6, p. 418-421, 2000.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academy, 2006. 398p.
- PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet**, v.357, p.1777-1789, 2001.
- PEHRSON, B.G. Countering selenium deficiency: organic versus inorganic source. **Feed International**, p. 16-20, 1993.
- PEREIRA, B. Exercício físico como pró-oxidante. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 8, p.77-89, 1994.
- PERETZ, A.; NÈVE, J.; DESMEDT, J.; DUCHATEAU, J.; DRAMAIX, M.; FAMAIEY, J.P. Lymphocyte response is enhanced by supplementation of elderly subjects with selenium-enriched yeast. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, p.1323-1328, 1991.
- RAYMAN, M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.64, n.4, p.527-542, 2005.
- RAYMAN, M. P. The argument for increasing selenium intake. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.61, n.2, 203-215, 2002.
- RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.
- SIMCOCK, S.E.; RUTHERFURD, S.M.; HENDRIKS, W.H. The role of selenium in companion animal health and nutrition. In: LYONS, T.P AND JACQUES, K.A (Eds) **Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries**.2002. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2002. p.511-520.

- SODA, K.; TANAKA, H.; ESAKI, N. Biochemistry of selenium amino acids. **Trace Nutrients Research**, p.1-5, 1988.
- SPALLHOLZ, J.E.; MARTIN, J.L.; MARLENE, L.G.; HEINZERLING, R.H. Enhanced immunoglobulin M and immunoglobulin G antibody titers in mice fed selenium. **Infection and Immunity**, v.8, n.5, p.841-842, 1973.
- SURAI, P.F. **Selenium in nutrition and health**. Nottingham: Nottingham University Press, 2006. 974p.
- SURAI, P.F. Selenium. In: **Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction**. Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 233-304.
- SURAI, P.F. Selenium-vitamin E interactions: does 1+1 equal more than 2?. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A (Eds) **Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries.2003. Proceedings...** Nottingham University, UK, 2003. p.59-76
- THOMSON, C. D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.58, n.3, p.391-402, 2004.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: Roca, 2002. ed. 6, 532p.
- TURNER, R.J.; FINCH, J. M. Selenium and the immune response. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.50, p.275–285, 1991.
- VASCONCELOS, S.M.L, GOULART, M.O.F., MOURA, J.B.F., MANFREDINI, V., BENFATO, M.S. e KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30n.5, 1323-1338, 2007.
- WASTNEY, M. E.; COMBS JR, G. F.; CANFIELD, W. K.; TAYLOR, P. R.; PATTERSON, K. Y.; HILL, A. D.; MOLER, J. E. and PATTERSON, B. H. A Human Model of Selenium that Integrates Metabolism from Selenite and Selenomethionine. **The Journal of Nutrition**, v.141, p.708–717, 2011.
- WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v.23, n.4, p.209- 240, 1997.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p.139-161, 1994.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

CAPÍTULO 2

AÇÃO IMUNOLÓGICA DO SELÊNIO PARA CÃES ADULTOS

Running head: Selenium and immune response of dogs

Immunological action of selenium for adult dogs¹

T.C. Putarov^{*2}, J.R. Sartori^{*}, A.C. Carciofi[†]

^{*}Department of Animal Breeding and Nutrition, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP 18610-000, Brazil;

[†] Department of Veterinary Clinic and Surgery, College of Agrarian and Veterinarian Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil.

¹ The authors acknowledge the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process number: 478050/2011-9 and 140413/2011-1), São Paulo, Brazil; Biorigin; and Mogiana Alimentos S.A. (GUABI), Campinas, Brazil

² Corresponding author: thailaputarov@gmail.com

ACÇÃO IMUNOLÓGICA DO SELÊNIO PARA CÃES ADULTOS

RESUMO: Os objetivos do trabalho foram avaliar o efeito de níveis e fontes de selênio na resposta imune de cães adultos, para isto cinco dietas foram avaliadas. Os tratamentos foram: CO - dieta basal com adição de selenito de sódio, totalizando 0,13 ppm de Se; SO33 - dieta basal + Se-levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + Se-levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + Se-levedura totalizando 0,99 ppm de Se; SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 90 dias com a ração CO seguidos de 120 dias de fase experimental e recebendo as dietas testes, totalizando 210 dias. Amostras de sangue foram colhidas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 da fase experimental para: imunofenotipagem de leucócitos (IF), atividade fagocítica (AF) de monócitos e neutrófilos, índice de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (IPCM), produção de intermediários reativos do oxigênio (H_2O_2) e do nitrogênio (NO_3^-). Para a determinação de anticorpos IgG e IgM específicos contra eritrócito de carneiro (SRBC) foram coletadas amostras de sangue 5, 10, 15 e 20 dias após inoculações de soluções de SRBC que ocorreram nos dias 60 e 90 da fase experimental. Fezes frescas foram colhidas para determinação da IgA fecal nos dias 0 e 120, e foi realizado o teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH) aos 120 dias. O IPCM diminuiu em todos os tratamentos ao longo do experimento, porém aos 120 dias os animais do tratamento SO33 apresentaram a maior IPCM comparado aos demais ($P<0,05$). A AF de neutrófilos e monócitos foi menor aos 120 dias ($P<0,0001$) e houve tendência de maior AF por neutrófilos nos cães suplementados com 0,33 ppm de Se orgânico ($P=0,0863$). O número de linfócitos $CD5^+$ aumentou após 60 dias de experimento para todos os tratamentos. Houve uma tendência para maior número de linfócitos $CD5^+CD8^+$ de cães recebendo as rações CO, SO99 e SI66. A relação $CD4^+/CD5^+$ foi maior para os linfócitos de animais que receberam as dietas SO33 e SO66 ($P<0,0001$). Os valores de IgG, IgM, IgA anti-SRBC, a resposta ao DTH e os valores de H_2O_2 e NO_3^- não foram influenciadas pelos tratamentos. O selênio em doses superiores aos valores mínimos recomendados não influencia a resposta imunológica de cães adultos, a qual também não é influenciada pelas fontes de selênio.

Palavras-chave: leucócitos, proliferação, cultura celular, minerais

Immunological action of selenium for adult dogs

ABSTRACT The aims of this study were to evaluate the effects of selenium sources and levels on the immune response of adult dogs. Treatments were: CO - control diet with sodium selenite addition, totalizing 0.13 ppm of Se; SO33 - control diet + Se-yeast, totalizing 0.33 ppm of Se; SO66 - control diet + Se-yeast, totalizing 0.66 ppm of Se; and SO99 - control diet + Se-yeast, totalizing 0.99 ppm of Se; SI66 - control diet + sodium selenite, totalizing 0.66 ppm of Se. Animals underwent through an adaptation period of 90 days and received the CO diet; the experimental phase lasted 120 days when animals received the tested diets and samples were taken. Blood samples were collected on days 0, 30, 60, 90 e 120 of experimental phase to identify the leukocyte population (IF), to determine the phagocyte activity (FA) of neutrophils and monocytes, the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PIMC), the production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (NOS) intermediate species. Serum samples were also taken at 5, 10, 15 and 20 days after SRBC solution inoculation to determine the levels of IgG and IgM anti-SBRC. Fresh stool were obtained to evaluate the fecal IgA on days 0 and 120. Delayed-type hypersensitivity skin test (DTH) was conducted with the animals on day 120. The PICM reduced within time for all treatments, but on day 120th SO33-fed animals had the higher proliferation than the other treatments ($P<0.05$). The FA of neutrophils and monocytes was lower at 120th ($P<0.0001$) and a trend was observed for higher AF of neutrophils from SO33-fed dogs ($P=0.0863$). The population of $CD5^+$ lymphocytes increased after 60 days and there was a trend for higher $CD5^+CD8^+$ lymphocytes count for animals fed CO, SO99 and SI66. The $CD4^+/CD5^+$ ratio was higher for animals fed SO33 and SO66 ($P<0.0001$). The values of IgG, IgM, IgA, ROS and NOS, and the DTH response were not influenced by treatments. Dose of selenium higher than the recommendation does not influence the immune response of adult dogs, neither the source.

Keywords: leukocytes, proliferation, cell culture, minerals, antibody

INTRODUÇÃO

Há pouca informação específica para cães e gatos sobre a absorção ou biodisponibilidade do selênio dietético (NRC, 2006) e sobre a diferença na função biológica das fontes deste mineral. Os resultados discutidos no NRC (2006) são extrapolações de outras espécies como frangos e ratos, e não há informações sobre os valores de mínimo e máximo, apenas recomendações para a dose utilizada (0,35 ppm de selênio por kg de ração, dieta com 4.000 kcal de EM/kg). A indústria americana e, por consequência, a brasileira, baseia-se na recomendação mínima da AAFCO (2009) de 0,11 ppm de selênio por kg de ração (dieta com 4.000 kcal de EM/kg), porém não há estudos que demonstrem se esta informação é verídica.

O selênio é amplamente conhecido por sua ação via glutathione peroxidase (GSH-Px), uma importante enzima antioxidante dependente deste mineral. A atividade enzimática de GSH-Px é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares (COHEN e HOCHSTEIN, 1963; MEISTER, 1983). Além de sua função antioxidante, a GSH-Px também está envolvida no metabolismo do ácido araquidônico o que influencia a síntese de prostaglandinas, leucotrienos (BRYANT e BAILEY, 1980) e tromboxanos (STADMAN, 1990) e, por consequência, o sistema imunológico. A cascata do ácido araquidônico é responsável pela resposta inflamatória e o selênio é importante para que não sejam produzidos radicais livres em excesso. Outras selenoproteínas também estão envolvidas com a ativação, proliferação e diferenciação de células imunológicas e são importantes não apenas para ativar ou melhorar este sistema, mas para sua regulação (HUANG et al., 2012), porém os caminhos pelos quais essas selenoproteínas auxiliam a imunidade não estão claros.

Outro mecanismo de ação do selênio no sistema imunológico está relacionado com o receptor de alta afinidade para interleucina 2 (IL-2) e esta interleucina está associada a expansão clonal de células imunocompetentes (ROY et al., 1992). O Se atua na modulação da expressão do receptor de alta afinidade para IL-2 (IL-2R) e pode aumentar o número de IL-2R nas células ou ainda aumentar o número de células que expressam IL-2R (KIREMIDJIAN-SCHUMACHER et al., 1990; ROY et al., 1992; ROY et al., 1993), desta forma haverá maior produção de IL-2 e esta atuará sobre os

linfócitos T helper e T citotóxicos estimulando a mitose e, por consequência, ocorrerá maior proliferação de linfócitos, entre outras reações desencadeadas pela IL-2.

Embora os mecanismos pelos quais o selênio atua na resposta imunológica não sejam completamente entendidos, sabe-se que este mineral influencia a resposta imunológica inata e adaptativa (TURNER e FINCH, 1991; ARTHUR et al., 2003; SURAI, 2003; HUANG et al., 2012). Estudos mostraram que sua deficiência pode afetar a proliferação de linfócitos, a atividade de neutrófilos e macrófagos (ARTHUR et al., 2003), a atividade fagocitária e a produção de anticorpos (BROOME et al., 2004), dependendo da fonte de selênio e do conteúdo da vitamina E na dieta (FINCH e TURNER, 1996), entre outras funções das células imunológicas. Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de níveis de selênio orgânico na resposta imunológica de cães adultos, já que, cada vez mais busca-se melhorar a saúde e qualidade de vida dos animais de estimação e também por esta fonte estar se tornando de uso cada vez mais comum na nutrição animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, sob o protocolo de número 015693/12-CEUA, e está em concordância com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Delineamento experimental, animais e tratamentos

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”. Foram utilizados trinta cães adultos da raça Beagle, em manutenção, com idade média de $7,3 \pm 2,2$ anos e peso médio de $12,59 \pm 1,6$ kg, em boas condições corporais, clinicamente saudáveis, desverminados e vacinados. O experimento seguiu um delineamento em blocos completos casualizados com medidas repetidas no tempo. Os animais foram distribuídos em três blocos completos casualizados de dez animais cada, em cada bloco havia 2 repetições por tratamento totalizando 6 repetições por tratamento; o cão foi a unidade

experimental. O experimento compreendeu 2 fases: a adaptação que durou 90 dias com a o fornecimento da ração controle (CO) para todos os animais; e a fase experimental com duração de 120 dias quando os animais receberam as dietas testes e as amostras foram coletadas, portanto cada bloco teve duração total (adaptação e fase experimental) de 210 dias.

Nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 da fase experimental, foram coletadas amostras de sangue total com anticoagulante EDTA para imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico, e amostras de sangue total heparinizado para realização dos ensaios de atividade fagocítica de monócitos e neutrófilos, de proliferação de células mononucleares do sangue periférico, determinação da produção de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio. A resposta imune humoral foi avaliada por meio da resposta de anticorpos (IgG e IgM) anti- SRBC, para isto duas inoculações com solução de concentração conhecida de SRBC foram realizadas aos 60 e 90 dias da fase experimental, com consequente determinação dos anticorpos 5, 10, 15 e 20 dias após as inoculações. Nos dias 0 e 120 foram coletadas amostras de fezes frescas para determinação de IgA e aos 120 dias foi realizado o teste de hipersensibilidade cutânea tardia.

As dietas experimentais (tabela 1) foram constituídas de ingredientes com reduzidos teores de selênio e, para isto, alguns ingredientes foram testados para depois serem escolhidos para a formulação. Todos os tratamentos foram compostos pela mesma dieta base, diferenciando-se apenas pela concentração e pela fonte de selênio adicionada. A dieta base foi formulada para que seus níveis nutricionais e suplementação vitamínico-mineral atendessem às recomendações nutricionais para cães em manutenção da Association of American Feed Control Official (AAFCO, 2009), com exceção dos teores de selênio. Para o experimento, foi desenvolvido, em parceria com a empresa Mcassab (São Paulo, Brasil), um premix específico sem adição de fontes de selênio e com o teor mínimo de vitamina E (30 UI/kg de ração) recomendado pela AAFCO (2009) seguindo os padrões de qualidade e garantia dos teores de vitaminas e minerais.

O selenito de sódio e o selênio levedura também foram analisados quanto aos seus teores de selênio antes de serem incluídos a dieta. Para a produção das rações, todos os ingredientes foram misturados, exceto o premix mineral-vitamínico e a fonte

de selênio. O teor de selênio foi determinado nesta pré-mistura antes que fossem adicionadas as fontes do mineral em estudo. Com o teor de selênio da pré-mistura (0,07 mg de Selênio por kg de mistura – valor analisado) e das fontes de selênio, foram calculadas as quantidades necessárias de inclusão de selenito de sódio e do selênio levedura para que se atingisse os valores desejados. Para esta mistura final tomou-se o cuidado para que ocorresse uma ótima homogeneização, portanto cada fonte do mineral foi primeiramente misturada a uma quantidade pequena da pré-mistura, depois misturada com o premix e mais uma quantidade da pré-mistura em misturador Y com capacidade para 15 kg, para então ser realizada a mistura final. A mistura final foi moída em moinho de martelo com peneira de 1 mm e depois extrusada.

As dietas experimentais foram extrusadas na Fábrica de Rações da FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal e devidamente armazenadas. Os parâmetros de processos foram controlados por toda a extrusão; a cada 30 minutos leituras destes parâmetros eram realizadas para que todas as fontes de selênio fossem extrusadas na mesma condição, uma vez que o processo influencia na concentração final do mineral na ração. A dieta basal apresentou a concentração de selênio menor que o mínimo recomendado e portanto, teve que receber a adição de fonte de selênio padrão (selenito de sódio) para que esta ficasse dentro do mínimo recomendado pela AAFCO (2009), a indução da deficiência de nutrientes não é aceitável para cães de acordo com as normas de bem-estar animal.

As determinações de selênio foram feitas no laboratório de Espectrometria Atômica Aplicado do Departamento de Química e Bioquímica/UNESP-Botucatu-SP utilizando a técnica de espectrometria atômica e o método por atomização em forno de grafite (SILVA et al, 2007; MORAES et al., 2009). Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA) e matéria mineral (MM) segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995). Os valores de energia bruta foram determinados por meio de calorímetro adiabático (PARR Instrument-1281, Moline, EUA). Os animais foram submetidos a cinco tratamentos: CO - dieta basal com adição de selenito de sódio, totalizando 0,13 ppm de Se; SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se.

Tabela 1. Inclusão (%) dos ingredientes e composição nutricional calculada das rações experimentais.

Ingrediente	Tratamentos ¹				
	CO	SO33	SO66	SO99	SI66
Milho, grão	48,04	48,00	48,00	48,00	48,04
Protenose, 60%	19,19	19,15	19,05	19,00	19,19
Farelo de soja, 45%	17,00	17,00	17,00	17,00	17,00
Óleo de vísceras	8,54	8,54	8,54	8,54	8,54
Fibra de cana-de-açúcar	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Fosfato bicálcico	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
Suplemento mineral-vitamínico ²	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Calcário calcítico	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Óleo de peixe	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Cloreto de colina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Cloreto de potássio	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Antifúngico ³	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
L-triptofano	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Antioxidante ⁴	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
L-Lisina	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29
Selenito de sódio ⁵	0,0002	-	-	-	0,001
Selênio levedura ⁶	-	0,09	0,21	0,325	-
Total	100,00	100,01	100,03	100,09	100,00
Valores nutricionais analisados das dietas ⁹					
Energia Metabolizável, (kcal/kg) ⁷	3.680	3.720	3.670	3.690	3.670
Matéria seca (%)	92,81	92,41	92,22	92,21	92,51
Proteína Bruta (%)	25,96	24,71	24,76	25,11	24,83
Extrato Etéreo em Hidrólise ácida (%)	14,95	15,15	14,15	15,25	14,30
Matéria Mineral	5,90	5,81	5,67	5,46	5,43
Fibra Bruta (%)	5,40	4,87	4,81	5,34	5,19
Cálcio (%)	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
Fósforo total (%)	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Vitamina E (UI/kg)	30	30	30	30	30
Selênio (ppm - mg/kg) ⁸	0,13	0,342	0,677	0,971	0,674

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ² Adição por quilograma de dieta: Ferro 150 mg, Cobre 15 mg, Manganês 7 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg, Vit A 15000 UI, Vit D 1000 UI, Vit. E 30 UI, Tiamina 4 mg, Riboflavina 5 mg, Ácido pantotênico 20 mg, Niacina 30 mg, Piridoxina 4 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,04 mg e Colina 1500 mg. ³ Mold-Zap AS, Alltech, Inc., EUA. ⁴ Antiox-RC, Alltech, Inc., EUA. ⁵ Selenito de sódio PA (VETEC Química Fina LTDA., Brasil) com 448,0 mg de selênio por grama do produto. ⁶ Selemax® (Açucareira QUATÁ S.A., Brasil) com 998,7 mg de selênio por quilograma do produto. ⁷ Valor calculado pelo fórmula do NRC (2006). ⁸ Concentração analisada. ⁹ Com base na matéria seca.

A quantidade de ração administrada foi calculada de acordo com o valor energético da ração e a necessidade energética do animal (NRC, 2006). Os animais foram pesados semanalmente e a quantidade de ração ajustada caso ocorresse aumento ou redução de peso. O alimento foi oferecido duas vezes ao dia às 8h00 e às 16h00, e água fresca ficou disponível todo o tempo. A dieta controle (CO) foi oferecida aos animais por um período de adaptação de 90 dias antes da introdução das rações experimentais. Esta dieta teve como função igualar a condição nutricional dos animais. O peso dos animais e a ingestão de alimento também foram controlados por todo período de adaptação. Após este período os cães passaram a receber seus respectivos tratamentos por mais 120 dias.

Imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico

Nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 do período experimental, amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular em seringa com anticoagulante EDTA e submetidas à avaliação quantitativa dos linfócitos T totais (CD5+), T auxiliares (CD5+CD4+), T citotóxicos (CD5+CD8+), linfócitos B (CD21+), monócitos (CD14+) e neutrófilos (CD11b) por citometria de fluxo. Para isto, 100 µl de sangue foi colocado em tubo próprio para citometria de fluxo e 2 µl dos respectivos anticorpos foram adicionados a cada tubo: o tubo 1 não recebeu anticorpo; o tubo 2 correspondeu ao isotipo controle que foram IgG1 PE (Serotec, MCA1123PE) e IgG2a FITC (Serotec, MCA1212F); no tubo 3 foram adicionados os CD5 FITC (Serotec, MCA1037F) e CD4 PE (Serotec, MCA1038PE); no tubo 4 CD5 FITC (Serotec, MCA1037F) e CD8 PE (Serotec, MCA1039PE); no tubo 5 CD21 PE (Serotec, MCA1781PE); no tubo 6 CD14 FITC (Serotec, MCA1568F); e no tubo 7 CD11b PE (Abcam, AB25533). Os tubos foram homogeneizados e incubados por 20 minutos à 4°C, protegidos da luz. Um mililitro de solução 1:10 do tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado a cada tubo, seguido da homogeneização em vortex e incubação por 10 minutos à 4°C protegidos da luz. Os tubos foram centrifugados a 1800 rpm por três minutos, o sobrenadante descartado e foram realizadas 3 lavagens com 2 ml de PBS. Depois de desprezado o sobrenadante da última lavagem, foi adicionado 100 µl de PBS + 1% de formol nos tubos e as amostras foram submetidas à análise no citofluorômetro (FACSCanto®, Becton Dickinson Immunocytometry System,

Mountain View, CA, EUA) para classificação e contagem das subpopulações linfocitárias, de monócitos e neutrófilos.

Inoculação de eritrócitos de carneiro (SRBC) e dosagem de anticorpos específicos anti-SRBC

Para avaliar a atuação do selênio sobre a resposta imune humoral, foi utilizado eritrócitos de carneiro (SRBC), um antígeno natural complexo, não patogênico e imunogênico para cães. Estes foram colhidos assepticamente em solução de Alsever. Após 3 lavagens em salina tamponada (PBS), as suspensões de SRBC foram padronizadas espectrofotometricamente em comprimento de onda de 545nm para uma concentração final de $2,5 \times 10^9$ SRBC, sendo que os animais receberam por via endovenosa 1,0 ml desta solução (5×10^8 SRBC) no dia 60 para avaliação da resposta primária e no dia 90 para avaliação da resposta secundária.

Nos dias 65, 70, 75, 80 (resposta primária) e 95, 100, 105, 110 (resposta secundária), amostras de sangue foram coletadas e colocadas em tubos de ensaio sem anticoagulantes para a obtenção do soro. Estas amostras foram armazenadas em microtubos graduados de 500 μ l e mantidas a -20°C até o momento da dosagem de anticorpos específicos IgG e IgM anti-SRBC. Em uma placa de microcultura de 96 poços, já sensibilizada com eritrócito de carneiro e bloqueada (SRBC coated plates, Life Diagnostics, Pennsylvania, USA), foi adicionado 100 μ l de amostra de soro canino. O conjunto placa sensibilizada e amostra foi incubado por 60 minutos à temperatura ambiente. O conjunto foi posteriormente lavado 5 vezes com a solução ELISA Wash Solution (Código E104, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA) e 100 μ l do anticorpo de detecção para IgG ou IgM canino (HRP Conjugated Dog IgG/IgM Detection Antibody, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA) foi adicionado a placa e incubado por mais 60 minutos à temperatura ambiente. A placa foi lavada com a solução ELISA Wash Solution (Código E104, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA) por mais 5 vezes e 100 μ l de substrato (TMB Substrate Solution, Código E102, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA) foi adicionado a cada poço. A placa foi então mantida no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos e a reação enzimática interrompida pela adição de 100 μ l de H_2SO_4 -4N (ELISA Stop Solution, código E115, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA) e a leitura realizada em leitor de ELISA com filtro de 450 nm.

Avaliação da concentração de IgA total nas fezes

Foram realizadas dosagens do anticorpo IgA nas fezes nos dias 0 e 60 do experimento. Essa medição é indicativa da imunidade humoral na mucosa intestinal. As amostras de fezes foram recolhidas durante 3 dias consecutivos e armazenadas a -20°C para posterior análise. Antes de analisadas, estas foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra por período e por cão. A extração de IgA fecal foi realizada por extração salina de acordo com Peters et al. (2004), sendo que para isto a matéria fecal foi descongelada à temperatura ambiente e um grama da amostra (peso úmido) pesada e adicionada ao buffer saline fosfato (0,01M, Ph 7,4), 0,5% tween e 0,05% de azida de sódio para homogeneização. A suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 20 minutos a 5°C. Uma porção do sobrenadante (2ml) foi transferida para um microtubo graduado contendo 20 µl de um coquetel inibidor de protease. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e depois centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos em microcentrifuga e o sobrenadante foi transferido a um microtubo estéril e armazenado a -20°C. Para a quantificação da concentração total de IgA no extrato de fezes foi utilizado um kit de ELISA específico para IgA canina (Bethyl laboratories, Montgomery, USA).

Teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH)

Este teste foi realizado conforme metodologia adaptada de Kim et al. (2000). Para a sua realização foram inoculados pela via intradérmica, na fossa paralombar dos animais, após a devida tricotomia e assepsia, 100µl de cada uma das soluções que seguem: 1) solução salina (0,9%) como controle negativo; 2) fito-hemaglutinina (2mg/ml) (FHG - Lectina obtida de *Phaseolus vulgaris*; cat. L8754 - Sigma-Aldrich) para mensurar a resposta inespecífica; 3) vacina polivalente para cães (Duramune® Max - 5CvK/4L, contra parvovirose, cinomose, adenovírus tipo 2, hepatite, parainfluenza, coronavirose e leptospirose sorovares *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* e *L. pomona*; Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, Brasil) para mensurar a resposta imune específica. A espessura da pele foi mensurada com o medidor digital de espessura (Mitutoyo modelo 700-122, Tóquio, Japão) calibrado para exercer pressão automática no local da leitura, com força de 2N,

nos momentos zero, 24, 48 e 72h após as inoculações intradérmicas. O teste foi conduzido no dia 120 do período experimental.

Atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos

O ensaio de fagocitose foi realizado nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 do período experimental com sangue heparinizado, através de kit comercial pHrodo™ E. coli BioParticles® (cat. A10025, Molecular Probes, Inc., Oregon, EUA). O método baseia-se na mensuração da atividade fagocítica das células presentes no sangue total através da acidificação do corante pHrodo™ que, quando dentro do fagossomo, emite seu máximo de fluorescência devido ao pH ácido.

Separação células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico

Para o ensaio de proliferação de células mononucleares do sangue periférico, determinação da produção dos intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, o sangue foi submetido à separação de células por diferença de gradientes. Nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 do período experimental foram coletados 30 ml de sangue periférico em tubos de ensaio estéreis contendo 10µ/ml de heparina (Liquemine-Roche). Em tubos falcon de 15 ml foram colocados 4,5 ml de Histopaque 1119 e 3 ml de Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich), e 6 ml de sangue total. O tubo falcon foi centrifugado a 1920 rpm, por 30 minutos a temperatura ambiente, após a centrifugação, foi possível a observação de dois halos de células (o 1º é de células mononucleares do sangue periférico e o 2º de polimorfonucleares). Os anéis ricos em células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares foram coletados separadamente e lavados por pelo menos duas vezes com RPMI simples a 4°C (1800 rpm por 10 minutos) e quando necessário foi realizada a lise das hemácias com 2 mL de solução de lise de eritrócitos (ACK – 8,29 g de NH₄Cl 0,15 M, 2 g KHCO₃ 10mM, 0,074 g Na₂EDTA 0,01mM) por 2 minutos. Ao final da lavagem o pelet foi desmanchado e as células ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 40 µg/ml de gentamicina e 10% de soro heterólogo inativado (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC). A contagem, identificação e viabilidade dos neutrófilos e proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PMBC) foi realizada através da coloração em azul tripan (alíquotas de 50µl da suspensão celular foram diluídas em 450µl de

corante) e a contagem, identificação e viabilidade dos monócitos foi realizada através da incorporação pelo vermelho neutro (alíquotas de 50 µl da suspensão celular foram diluídas em 450µl da solução do corante a 0,04%). Em seguida, a concentração foi ajustada de acordo com cada ensaio com posterior plaqueamento da suspensão celular dependendo do ensaio que foi realizado.

Ensaio de proliferação de células mononucleares do sangue periférico

Para esta análise foram utilizadas as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e a concentração foi ajustada para $1,8 \times 10^7$ células por mililitro. Quando não houve células suficientes foi corado um mínimo $1,0 \times 10^7$ células por mililitro. O ensaio de proliferação foi realizado através de kit comercial CellTrace™ CFSE Cell Proliferation (cat. C34554, Molecular Probes, Inc., Oregon, EUA) que permite a marcação e visualização de células por citometria de fluxo. O kit contém o corante fluorescente CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), o qual, por difusão passiva, penetra na célula onde ocorrerá a ativação da molécula fluorescente que através da meiose será herdada pelas células filhas, sem ocorrer transferência da fluorescência para células adjacentes. As análises foram realizadas de acordo com as recomendações do kit e a leitura realizada em citofluorômetro (FACSCanto®, Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA, EUA), para a leitura foram selecionadas as gates de células viáveis e em seguida a gate de linfócitos, onde verificou-se a intensidade de fluorescência que foi transferida para as células-filhas por células estimuladas com concanavalia A (ConA, 100µg/ml; Sigma-Aldrich). Os resultados foram analisados pelo Software FlowJo® (v10.7, Tree Star Inc., USA).

Determinação da produção de intermediários reativos do oxigênio (H_2O_2)

Após a separação e o plaqueamento das células mononucleares (monócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos) foi determinada a produção de H_2O_2 segundo método descrito por PICK e KEISARI (1980) e adaptado por PICK e MIZEL (1981). No caso de monócitos, o sobrenadante foi retirado dos poços da placa de cultura, já que as células permanecem aderidas ao fundo da placa. Para a cultura de neutrófilos o sobrenadante foi mantido. Em placa de cultura de 96 poços foram plaqueados 100 µl de células com concentração de 3×10^5 células, estimuladas ou não com LPS (1 µg por

poço), e o ensaio foi realizado em triplicata. Após 36 horas de cultura em estufa de CO₂ (5%) à 37°C, foi adicionado 100 µl de solução tampão em cada poço. A solução tampão foi constituída de 7,8 ml de água destilada, 0,8 ml de solução A (800 ml de H₂O destilada; 80g de NaCl; 2,0g de KCl; 2,0g de KH₂PO₄; 11,5g de Na₂HPO₄), 0,1ml de solução B (100ml de H₂O destilada; 1,0g CaCl₂), 0,1 ml de solução C (100ml de H₂O destilada; 1,0gr MgCl₂), 0,1 ml de vermelho fenol (100ml de H₂O destilada; 1,0g de phenol red), 0,1 ml de peroxidase (10mg de peroxidase; 2,0 ml de tampão fosfato) e 1,0 ml de glicose (100 ml de H₂O destilada, 1,0g de glicose). Todas as soluções estavam a temperatura ambiente no momento do ensaio. A cada poço foi acrescentado 1µl de forbol mirestato acetato (PMA) e a placa incubada por 1 hora a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 1 hora a reação foi bloqueada com 10 µl de NAOH 1N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA com filtro de 630 nm. Os resultados foram expressos em nanomols (nM) de H₂O₂/3x10⁵ células, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída por concentrações molares conhecidas de H₂O₂ variando de 0,250 a 8,0 nM.

Determinação da produção de intermediários reativos do nitrogênio

O óxido nítrico (NO) foi dosado no sobrenadante, tanto para células mononucleares quanto para as polimorfonucleares. O NO decompõe-se em nitritos (NO⁻₂) e nitratos (NO⁻₃) no meio de cultura. A produção de NO⁻₂ foi dosada pelo método colorimétrico baseado na reação de GRIESS (GUEVARA et al., 1998), após a separação e o plaqueamento das células mononucleares e polimorfonucleares. Aos sobrenadantes foi adicionado 100 µl de reagentes de GRIESS, que contém n-(1-naftil)-etil-enediamina (NEED - Sigma Chemical Co., St Louis, MO) diluído a 0,1% em água destilada, e sulfanilamida (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) diluída a 1 % em H₂PO₄ 5%. Estes reagentes, NEED e sulfanilamida, foram misturados em volumes iguais no momento da reação. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 540 nm. Os resultados foram expressos em µmoles de NO por 3x10⁵ células por 36 horas de incubação, comparando-se a densidade óptica com uma curva padrão de concentrações conhecidas de NO₂ que foi realizada junto ao experimento.

Análise estatística

Todas as variáveis foram inicialmente testadas para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quando necessário foi realizada transformação por log para atingir a normalidade. Os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo utilizando-se o procedimento PROC MIXED (SAS Inst. Inc., 2003) e o desdobramento realizado através do procedimento PROC GLM do mesmo software. Procedeu-se, também, análise por contrastes polinomiais ortogonais para determinar os efeitos lineares e quadráticos da adição de selênio levedura e contrastes para se avaliar o efeito do selênio levedura independentemente de seu nível de inclusão, comparando-se as médias obtidas para as variáveis da dieta SI66 versus as médias dos demais tratamentos (SO33, SO66 e SO99). Outro contraste ortogonal foi determinado para avaliar o efeito da fonte inorgânica de selênio (SI66) comparado com a dieta sem selênio (CO). Considerou-se como significativos os valores de $P < 0,05$ e, como tendência, os valores de $P < 0,10$.

RESULTADOS

Imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico de cães adultos em manutenção

Não houve efeito de tratamento ($P=0,5074$) ou interação entre tratamento e período ($P=0,3253$) no número de linfócitos T totais ($CD5^+$), porém observou-se efeito de período ($P < 0,0001$), o número de células foi maior a partir de 60 dias de experimento. Os linfócitos T auxiliares ($CD5^+CD4^+$) não sofreram efeitos de tratamento ($P=0,9896$), de período ($P=0,1919$) e interação entre tratamento e período ($P=0,9726$). Para as células T citotóxicas ($CD5^+CD8^+$) não houve efeito de período ($P=0,6341$), não houve interação entre tratamento e período ($P=0,9862$), mas houve tendência para efeito de tratamento ($P=0,0838$) os animais dos tratamentos CO, SO99 e SI66 apresentaram as maiores médias comparadas aos tratamentos SO33 e SO66.

A relação entre linfócitos T auxiliares e T citotóxicos ($CD4^+/CD8^+$) sofreu efeito de tratamento e de período ($P < 0,05$), mas não houve efeito da interação tratamento x período ($P=0,9364$). Aos 30 dias a relação foi maior comparado aos demais períodos, porém não foi diferente do período basal. A partir dos 30 dias esta relação diminuiu até o dia 120 do experimento. A relação $CD4^+/CD8^+$ foi maior para os grupos SO33 e SO66

comparada aos demais. Houve efeito de tratamento e de período ($P < 0,05$) para os linfócitos B ($CD21^+$), mas não houve interação entre tratamento e período ($P = 0,8169$).

O número de células $CD21^+$ diminuiu após 30 dias que os animais receberam as dietas e após este período o número permaneceu constante. Os tratamentos SO33, SO66 e SI66 apresentaram os maiores números de células, sendo que os animais suplementados com selênio orgânico não diferiram do tratamento controle e SO99. Não houve efeito de tratamento ($P = 0,9722$), de período ($P = 0,3486$) ou interação de tratamento e período ($P = 0,3501$) para o número de monócitos ($CD14^+$).

Tabela 2. Imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico de cães adultos

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
CD5 ⁺ , x10 ³ cels/ μ l												
0		1,26	1,43	1,43	1,49	1,17	1,36 ^B	0,14				
30		1,26	1,07	0,8	1,41	1,17	1,14 ^B	0,14				
60		2,14	2,02	1,86	1,62	2,64	2,06 ^A	0,14				
90		1,83	1,83	1,73	1,79	2,50	1,92 ^A	0,14				
120		1,74	1,74	2,71	2,01	2,32	2,12 ^A	0,14				
Média		1,65	1,61	1,71	1,96	1,67			NS	NS	NS	NS
EPM		0,16	0,16	0,16	0,16	0,16						
Tratamento		0,5074										
Período		<,0001										
Trat*período		0,3253										
Contrastes ⁴												
L							<,0001					
Q							NS					
CD5 ⁺ CD4 ⁺ , x10 ³ cels/ μ l												
0		0,53	0,59	0,59	0,56	0,39	0,53	0,06				
30		0,47	0,39	0,27	0,53	0,34	0,40	0,06				
60		0,59	0,49	0,49	0,38	0,55	0,50	0,06				
90		0,46	0,43	0,42	0,42	0,52	0,45	0,06				
120		0,31	0,37	0,51	0,37	0,38	0,40	0,06				
Média		0,47	0,45	0,46	0,45	0,43			NS	NS	NS	NS
EPM		0,06	0,06	0,06	0,06	0,06						
Tratamento		0,9896										
Período		0,1919										
Trat*período		0,9726										
Contrastes ⁴												
L							NS					
Q							NS					

Continua...

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
CD5 ⁺ CD8 ⁺ , x10 ³ cels/ μ l												
	0	0,29	0,23	0,23	0,36	0,25	0,27	0,06				
	30	0,28	0,20	0,20	0,33	0,26	0,25	0,06				
	60	0,33	0,21	0,18	0,25	0,38	0,27	0,06				
	90	0,30	0,25	0,22	0,27	0,36	0,28	0,06				
	120	0,24	0,26	0,36	0,29	0,25	0,28	0,06				
	Média	0,29	0,23	0,24	0,30	0,30			NS	0,0553	0,0828	NS
	EPM	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06						
	Tratamento	0,0838										
	Período	0,6341										
	Trat*período	0,9862										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						NS					
CD4 ⁺ /CD8 ⁺												
	0	2,27	2,93	2,78	1,89	2,17	2,41 ^A	0,52				
	30	2,58	3,56	3,86	2,24	1,73	2,79 ^A	0,52				
	60	2,04	2,69	2,57	1,66	1,42	2,08 ^B	0,52				
	90	1,79	2,21	2,24	1,53	1,52	1,86 ^B	0,52				
	120	1,74	2,16	2,12	1,56	1,56	1,84 ^B	0,52				
	Média	2,09 ^b	2,71 ^a	2,71 ^a	1,69 ^b	1,77 ^b			NS	0,0004	0,0023	0,0676
	EPM	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52						
	Tratamento	<,0001										
	Período	0,0005										
	Trat*período	0,9364										
Contrastes ⁴												
	L						<,0001					
	Q						NS					

Continua...

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
CD21 ⁺ , x10 ³ cels/ μ l												
	0	0,26	0,40	0,44	0,27	0,38	0,35 ^A	0,03				
	30	0,17	0,15	0,18	0,18	0,23	0,18 ^B	0,03				
	60	0,11	0,12	0,14	0,23	0,38	0,19 ^B	0,04				
	90	0,12	0,18	0,18	0,11	0,26	0,17 ^B	0,03				
	120	0,07	0,15	0,23	0,13	0,13	0,14 ^B	0,03				
	Média	0,14 ^b	0,20 ^{ab}	0,24 ^{ab}	0,18 ^b	0,27 ^a			NS	0,0679	0,0509	0,0024
	EPM	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04						
	Tratamento	0,0281										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,8169										
Contrastes ⁴												
	L						<,0001					
	Q						0,0463					
CD14 ⁺ , x10 ³ cels/ μ l												
	0	0,53	0,65	0,61	0,60	0,58	0,59	0,02				
	30	0,54	0,49	0,58	0,52	0,69	0,56	0,02				
	60	0,55	0,46	0,57	0,50	0,47	0,51	0,02				
	90	0,38	0,37	0,54	0,43	0,47	0,44	0,03				
	120	0,42	0,80	0,40	0,35	0,41	0,48	0,03				
	Média	0,48	0,55	0,54	0,48	0,52			NS	NS	NS	NS
	EPM	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03						
	Tratamento	0,9722										
	Período	0,3408										
	Trat*período	0,3501										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						NS					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴ Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. ^{ab} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ^{A,B} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Titulação de anticorpos IgG e IgM anti-SRBC no soro e IgA total nas fezes

Os valores de IgA nas fezes estão apresentados na tabela 3. Não foi observado efeito de tratamento, período e interação de tratamento e período para esta variável ($P>0,05$). O selênio parece não ter efeito na imunidade de mucosas.

Para os anticorpos IgG e IgM anti-SRBC não foram encontrados efeito de tratamento e interação entre tratamento e período ($P>0,05$). Porém, foi encontrado efeito de período com comportamento quadrático ($P<,0001$) para os valores de IgG e IgM anti-SRBC. O pico da concentração de IgG anti-SRBC ocorreu após 10 dias da primeira inoculação, enquanto que para o IgM anti-SRBC ocorreu 5 dias após a inoculação. Ambas as variáveis não apresentaram picos após a segunda inoculação de SRBC.

Teste de hipersensibilidade cutânea tardia

Para a avaliação das respostas de hipersensibilidade cutânea tardia, os resultados foram expressos em espessura cutânea (milímetros), apresentados na tabela 4. Não verificou-se efeito de tratamento ou interação entre tratamento e período em horas ($P>0,05$), observou-se apenas efeito de período para todos os tratamentos sendo que na inoculação de solução salina observou-se efeito linear enquanto que para as inoculações de FHG e V10 foi verificado efeito quadrático, com aumento de espessura após 24 horas de inoculação.

Tabela 3. Concentração de IgA total nas fezes, IgG e IgM anti SRBC no soro de cães adultos alimentados com dietas suplementadas com fontes de selênio orgânico

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
IgA, mg/g de fezes secas												
0		53,20	55,75	47,31	50,23	53,14	50,00	0,97				
120		49,86	60,35	57,27	52,48	49,86	53,22	0,97				
Média		51,50	58,04	52,86	51,36	44,86			NS	NS	NS	NS
EPM		1,66	1,66	1,66	1,66	1,66						
Tratamento		0,2754										
Período		0,2933										
Trat*período		0,7385										
IgG, ng/ml												
60		90,65	90,37	90,08	90,81	92,26	90,83 ^C	0,36				
65		94,92	96,22	90,29	95,41	94,99	94,37 ^B	0,36				
70		94,44	97,14	95,22	96,86	96,64	96,13 ^A	0,36				
80		95,48	95,22	93,69	94,36	94,50	94,65 ^B	0,36				
95		89,50	88,24	86,50	87,77	90,19	88,44 ^C	0,36				
100		85,36	86,83	83,40	84,70	85,46	85,15 ^D	0,36				
110		87,60	84,44	87,18	84,11	85,25	85,71 ^D	0,36				
Média		91,18	91,21	89,48	90,57	91,33			NS	NS	NS	NS
EPM		0,3800										
Tratamento		0,5991										
Período		<,0001										
Trat*período		0,9862										
Contraste ⁴												
L							NS					
Q							<,0001					

Continua...

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴					
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI		
IgM, ng/ml														
	60	92,67	92,88	89,87	91,23	94,34	92,20 ^C	0,52						
	65	100,64	105,62	97,53	101,37	100,10	101,05 ^A	0,52						
	70	96,40	99,06	95,53	96,00	93,68	96,21 ^B	0,52						
	80	94,77	94,70	91,61	91,35	88,78	92,24 ^C	0,52						
	95	87,55	86,22	83,50	84,57	87,12	85,80 ^D	0,52						
	100	85,62	87,13	87,28	85,59	86,53	86,43 ^D	0,52						
	110	85,12	87,13	87,30	85,59	84,53	85,93 ^D	0,52						
	Média	91,82	93,25	90,43	90,82	90,81			NS	NS	NS		NS	
	EPM	0,68												
	Tratamento	0,7496												
	Período	<,0001												
	Trat*período	0,9758												
Contraste ⁴														
	L						NS							
	Q						<,0001							

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. ^{A,B,C,D}Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 4. Resposta da hipersensibilidade cutânea tardia em cães adultos considerando a espessura da pele aos 120 dias do experimento

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
Salina	0 hora	2,98	3,11	2,95	3,10	3,52	3,13 ^A	0,12				
	24 horas	2,66	2,71	2,55	2,52	2,67	2,62 ^B	0,12				
	48 horas	2,48	2,55	2,35	2,52	2,60	2,50 ^C	0,12				
	72 horas	2,52	2,62	2,32	2,44	2,52	2,48 ^C	0,12				
	Média	2,66	2,74	2,54	2,64	2,82			NS	NS	NS	NS
	EPM	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17						
	Tratamento	0,6719										
	Período	<0,0001										
Trat*período	0,1030											
Contrastes ⁴												
	L						0,0012					
	Q						NS					
FHG ⁵	0 hora	3,03	3,03	2,85	3,20	3,28	3,07 ^C	0,20				
	24 horas	3,64	3,87	3,63	3,86	4,04	3,81 ^A	0,20				
	48 horas	3,35	3,73	3,47	3,55	3,58	3,53 ^B	0,20				
	72 horas	2,89	2,80	2,57	2,64	3,06	2,79 ^D	0,20				
	Média	3,23	3,36	3,13	3,31	3,48			NS	NS	NS	NS
	EPM	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23						
	Tratamento	0,5541										
	Período	<,0001										
Trat*período	0,8740											
Contraste ⁴												
	L						NS					
	Q						<,0001					

Continua...

Item	Dia	CO ¹	Selênio levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
V10 ⁶	0 hora	3,56	3,42	3,10	3,69	3,56	3,47 ^C	0,23				
	24 horas	4,65	4,30	3,69	4,18	4,47	4,26 ^A	0,23				
	48 horas	4,11	4,06	3,59	4,13	4,24	4,02 ^{AB}	0,23				
	72 horas	4,17	3,79	3,27	3,83	3,72	3,76 ^B	0,23				
	Média	4,12	3,89	3,41	3,96	4,00			NS	NS	NS	NS
	EPM	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29						
	Tratamento	0,1308										
	Período	<,0001										
Trat*período	0,1603											
Contraste ⁴												
L							NS					
Q							<,0001					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. ⁵FHG = fito-hemaglutinina; ⁶V10 - vacina Duramune® Max - 5CvK/4L FortDoge Saúde Animal, Campinas. ^{A,B,C,D}Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos

A atividade fagocítica de monócitos não foi influenciada pelos tratamentos ($P=0,5550$), houve apenas efeito de período ($P<0,0001$), os monócitos tiveram redução em suas atividades fagocíticas ao final do período experimental (Tabela 5). Para os neutrófilos apenas o efeito de período ($P<0,0001$) foi considerado significativo, porém pode-se observar uma tendência ($P=0,0863$) de efeito de tratamento. Considerando-se a tendência para tratamentos, os animais alimentados com as rações SO33, SO66 e SO99 apresentaram a maior porcentagem de células que fagocitaram em relação aos tratamentos CO e SI66.

Proliferação de leucócitos do sangue periférico de cães adultos em manutenção

As porcentagens de proliferação de leucócitos não foram diferentes entre os animais no início do experimento e estão apresentadas na tabela 6, a média de proliferação celular foi de 11,56% de linfócitos que transferiram a fluorescência para as células-filhas. Porém, aos 30 dias os animais do tratamento SI66 apresentaram maior porcentagem de proliferação comparado aos demais ($P<0,05$) e através de contraste ortogonal verificou-se a diferença entre as fontes de selênio ($P=0,0033$). Aos 90 dias, e após a 30 dias da primeira inoculação de SRBC (60 dias), os animais dos tratamentos SO33 e SO66 apresentaram os maiores valores de proliferação celular ($P<0,05$). Aos 120 dias os animais dos tratamentos SO33 e SO66 mantiveram as porcentagens de proliferação celular iguais ao início do experimento, enquanto que os animais do tratamento CO, SO99 e SI66 tiveram estes valores reduzidos ($P<0,0001$), os animais do tratamento SO33 tiveram maior taxa proliferativa comparado aos demais.

Tabela 5. Atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães adultos suplementados com selênio

Item	Dia	CO ¹	Selênio levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁵			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs. SI
Neutrófilos ⁴ , %												
	0	76,03	79,21	79,85	75,05	75,87	77,20 ^B	3,24				
	30	71,90	72,67	75,47	73,98	71,55	73,11 ^{BC}	3,38				
	60	79,90	90	86,45	86,83	82,20	85,07 ^A	3,25				
	90	80,25	82	85,53	80,11	78,18	81,37 ^{AB}	3,93				
	120	58,08	70,3	50,00	61,52	61,43	60,17 ^D	3,70				
	Média	73,23	78,99	75,35	75,55	73,84			NS	0,0723	NS	NS
	EPM	3,14	3,14	3,14	3,14	3,14						
	Tratamento	0,0863										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,8335										
Contrastes ⁵												
	L						<,0001					
	Q						<,0001					
Monócitos ⁴ , %												
	0	71,53	78,8	79,35	73,91	72,7	75,26 ^A	2,35				
	30	60,05	58,52	63,34	62,38	55,3	60,00 ^C	4,00				
	60	58,73	73,72	64,27	67,8	59	64,70 ^{BC}	2,40				
	90	75,60	69,31	77,87	73,07	65,2	72,21 ^{AB}	3,25				
	120	57,97	65,40	56,43	66,75	59,9	61,29 ^C	6,89				
	Média	64,78	69,15	68,25	68,78	64,46			NS	NS	NS	NS
	EPM	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39						
	Tratamento	0,5550										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,5862										
Contrastes ⁵												
	L						0,0431					
	Q						NS					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se.⁴ Valores expressos em porcentagem de células que apresentaram a fluorescência da bactéria fagocitada; os valores foram transformados para log para obtenção da normalidade dos dados; ⁵ Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. ^{A,B,C,D} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05).

Tabela 6. Porcentagem de proliferação de linfócitos estimulados com ConA (100µg/ml) do sangue periférico de cães adultos ao longo dos 120 dias de experimento

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁵			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs. SI
Proliferação de linfócitos ⁴ , %												
	0	11,46 ^{AB}	8,11 ^B	7,50	15,07 ^A	15,64 ^B	11,56	2,21	NS ⁶	NS	NS	NS
	30	19,20 ^{abA}	13,10 ^{bB}	11,64 ^b	10,71 ^{ba}	27,03 ^{aA}	16,34	1,72	NS	NS	0,0033	NS
	60	16,82 ^A	13,02 ^B	17,65	19,02 ^A	13,03 ^{BC}	15,91	2,03	NS	NS	NS	NS
	90	14,33 ^{abA}	22,67 ^{aA}	8,33 ^b	23,08 ^{aA}	16,22 ^{abB}	16,92	2,05	NS	NS	NS	NS
	120	3,8 ^{bB}	11,10 ^{Ba}	5,01 ^b	4,44 ^{bB}	4,86 ^{bC}	5,84	1,13	NS	NS	NS	NS
	Média	13,12	13,60	10,02	15,36	14,47						
	EPM	1,64	1,58	1,60	1,55	1,60						
	Tratamento	0,1372										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,0415										
Contrastes ⁵												
	L	NS	NS	NS	NS	NS						
	Q	0,0190	NS	0,0164	NS	NS						

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴ Valores expressos em porcentagem de células mononucleares do sangue periférico que apresentaram a fluorescência CFSE após 5 dias de cultura celular. Os valores foram transformados para log para obtenção da normalidade dos dados;. ⁵ Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. ^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ^{A,B,C} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Determinação da produção de intermediários reativos do oxigênio

Os resultados da produção de intermediários reativos do oxigênio (H_2O_2), estão expressos em nanomols de H_2O_2 por 3×10^5 células, e estão apresentados na tabela 7 (neutrófilos) e na tabela 8 (monócitos).

Os neutrófilos de cães adultos quando não estimulados (SC – só células) não apresentaram efeito de tratamento ou período, e nem interação entre tratamento e período ($P > 0,05$) para a produção de H_2O_2 . Mas ao serem estimulados com PMA, LPS ou ambos, houve efeito de período, porém não houve efeito de tratamento e nem interação entre tratamento e período para a produção de reativos de oxigênio. Neutrófilos de cães adultos quando estimulados com LPS apresentaram efeito quadrático ($P < 0,05$), após 60 dias de experimento ocorreu aumento significativo na produção de H_2O_2 com posterior redução aos 120 dias de experimento. Quando as células foram estimuladas com PMA e PMA+LPS foi verificado efeito linear na concentração de H_2O_2 ($P < 0,0001$).

Também não foi verificado efeito de tratamento, período e interação entre tratamento e período para os monócitos não estimulados ($P > 0,05$). Para os estímulos PMA e PMA+LPS, o mesmo comportamento dos neutrófilos foi observado, houve efeito linear ao longo do período experimental ocorrendo aumento das concentrações de H_2O_2 a partir 60 e 90 dias de experimento. Já as células estimuladas com LPS apresentaram efeito de tratamento ($P < 0,05$), sendo que os animais que receberam a dieta SO99 apresentaram os maiores valores de H_2O_2 produzidos, seguidos dos animais alimentados com dieta SI66, este por sua vez não diferenciou-se dos demais tratamentos. Foi verificado efeito dos contrastes polinomiais, com o aumento da inclusão de selênio orgânico na dieta ocorreu aumento da produção de H_2O_2 ($P < 0,05$) e os animais que receberam a dieta com selenito de sódio (SI66) apresentaram tendência para valores superiores comparados ao grupo controle ($P = 0,0719$).

Tabela 7. Concentrações de H₂O₂ produzida por neutrófilos de cães adultos mediante o consumo de selênio ao longo do experimento. Valores expressos em nanomols de H₂O₂/ 3x10⁵ células.

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
Só células												
	0	3,30	2,56	3,47	3,32	2,48	3,02	1,07				
	30	1,45	1,50	5,54	1,51	3,03	2,61	0,85				
	60	3,40	4,95	2,38	4,93	3,19	3,77	0,85				
	90	5,26	6,01	11,21	3,40	3,81	5,94	0,91				
	120	2,55	6,98	1,84	2,87	4,48	3,75	0,86				
	Média	3,19	4,40	4,89	3,40	3,20			NS	NS	NS	NS
	EPM	0,88	0,91	0,88	0,92	0,92						
	Tratamento	0,5536										
	Período	0,1172										
	Trat*período	0,4686										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						NS					
LPS												
	0	2,71	2,21	3,01	2,21	2,03	2,53 ^C	1,40				
	30	3,37	1,89	8,06	3,09	4,21	4,12 ^B	1,15				
	60	6,51	6,81	10,88	4,52	3,59	6,46 ^A	1,15				
	90	8,03	6,79	10,67	5,53	6,39	7,48 ^A	1,22				
	120	4,42	5,90	2,94	4,51	4,14	4,38 ^B	1,17				
	Média	5,00	4,72	7,11	4,07	4,07			NS	NS	NS	NS
	EPM	1,27	1,31	1,29	1,27	1,31						
	Tratamento	0,4058										
	Período	0,0467										
	Trat*período	0,9731										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						0,0193					

Continua...

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
PMA												
	0	3,00	3,55	2,41	5,53	4,16	3,73 ^C	1,53				
	30	1,63	2,05	5,03	3,76	5,14	3,52 ^C	1,38				
	60	6,83	6,55	4,08	6,50	7,05	6,20 ^{BC}	1,38				
	90	11,20	8,40	6,79	11,65	7,55	9,10 ^A	1,41				
	120	7,37	9,22	8,00	8,80	8,97	8,47 ^{AB}	1,38				
	Média	6,00	5,95	5,26	6,57	7,23			NS	NS	NS	NS
	EPM	1,45	1,46	1,45	1,47	1,45						
	Tratamento	0,6780										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,9158										
Contrastes ⁴												
	L						<,0001					
	Q						NS					
PMA+LPS												
	0	2,55	1,02	2,78	2,85	1,51	2,14 ^C	1,55				
	30	3,84	1,50	6,14	3,58	5,16	4,04 ^{BC}	1,39				
	60	8,64	6,43	7,41	7,42	5,62	7,10 ^{AB}	1,39				
	90	12,63	9,40	12,54	8,39	9,65	10,52 ^A	1,43				
	120	10,53	9,34	11,13	10,54	9,36	10,18 ^A	1,39				
	Média	7,64	5,54	8,00	6,26	6,55			NS	NS	NS	NS
	EPM	1,41	1,42	1,41	1,44	1,41						
	Tratamento	0,2887										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,9970										
Contrastes ⁴												
	L						<,0001					
	Q						NS					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. Só células – células não estimuladas; LPS - Lipopolysaccharide; PMA - phorbol myristate acetate. ^{A,B,C} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 8. Concentrações de H₂O₂ produzida por monócitos de cães adultos mediante o consumo de selênio ao longo do experimento. Valores expressos em nanomols de H₂O₂/ 3x10⁵ células.

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
Só células												
	0	0,75	2,65	4,95	3,07	1,12	2,50	0,81				
	30	2,11	2,99	1,51	2,03	1,12	1,95	0,72				
	60	2,40	1,48	1,72	2,41	2,00	2,00	0,75				
	90	2,28	2,76	2,75	1,70	7,07	3,31	0,75				
	120	1,60	1,94	1,44	1,76	1,70	1,69	0,76				
	Média	1,82	2,36	2,48	2,19	2,60			NS	NS	NS	NS
	EPM	0,75	0,74	0,75	0,74	0,76						
	Tratamento	0,8231										
	Período	0,1646										
	Trat*período	0,1602										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						NS					
LPS												
	0	1,33	2,53	1,30	4,95	3,38	2,70	0,89				
	30	1,47	3,10	2,38	7,30	2,29	3,31	0,78				
	60	3,74	2,34	2,14	3,60	4,06	3,17	0,81				
	90	1,50	3,02	3,61	2,29	5,20	3,12	0,80				
	120	1,88	1,85	1,18	2,50	1,68	1,81	0,82				
	Média	1,99 ^b	2,57 ^b	2,12 ^b	4,13 ^a	3,32 ^{ab}			0,0087	NS	NS	0,0719
	EPM	0,74	0,74	0,75	1,74	0,77						
	Tratamento	0,0179										
	Período	0,3936										
	Trat*período	0,3895										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						NS					

Continua...

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
PMA												
	0	0,66	3,86	1,78	7,77	3,35	3,48 ^C	1,98				
	30	3,27	9,57	7,14	6,02	5,33	6,27 ^{BC}	1,80				
	60	4,16	3,78	6,56	3,78	5,48	4,75 ^C	1,86				
	90	12,56	5,69	9,57	6,18	9,81	8,76 ^{AB}	1,84				
	120	16,07	14,30	10,76	10,30	13,07	12,99 ^A	1,80				
	Média	7,34	7,53	7,16	6,81	7,40			NS	NS	NS	NS
	EPM	1,74	1,75	1,77	1,75	1,78						
	Tratamento	0,9883										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,2730										
Contrastes ⁴												
	L						<,0001					
	Q						NS					
PMA+LPS												
	0	1,49	2,08	2,72	0,24	2,83	1,87 ^D	1,58				
	30	3,47	8,13	4,91	4,85	3,48	4,97 ^C	1,42				
	60	8,41	4,70	5,04	6,25	5,95	6,07 ^{BC}	1,47				
	90	11,57	9,20	9,22	6,92	5,59	8,50 ^B	1,46				
	120	17,09	12,41	10,07	9,30	15,17	12,81 ^A	1,42				
	Média	8,40	7,30	6,40	5,51	6,61			NS	NS	NS	NS
	EPM	1,43	1,44	1,45	1,44	1,47						
	Tratamento	0,2498										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,4852										
Contrastes ⁴												
	L						<,0001					
	Q						NS					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴ Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. Só células – células não estimuladas; LPS - Lipopolysaccharide; PMA - phorbol myristate acetate. ^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ^{A,B,C,D} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Determinação da produção de intermediários reativos do nitrogênio

Os resultados da produção de intermediários reativos do nitrogênio (NO) apresentados em micromols de NO por 3×10^5 células, encontram-se apresentados na tabela 8 (neutrófilos) e na tabela 9 (monócitos). Não houve efeito de tratamento ou interação entre tratamento e período para a produção de NO por neutrófilos estimulados ou não com LPS ($P > 0,05$), observou-se tendência para maior produção de NO por animais recebendo a dieta SO66, seguidos dos animais que receberam a dieta SI66. Verificou-se efeito de período tanto para as células não estimuladas quanto para aquelas estimuladas com LPS, para o primeiro grupo observou-se efeito quadrático sendo que a maior concentração de NO ocorreu aos 30 dias de experimento e para as células estimuladas com LPS observou-se efeito linear com redução da produção deste composto após 60 dias.

Para os monócitos estimulados ou não com LPS, a produção de NO não sofreu efeito de tratamento e nem efeito da interação entre tratamento e período. Foi observado efeito quadrático para período para as células estimuladas com LPS sendo que aos 60 e 90 dias as células aumentaram a produção deste composto. Verificou-se uma tendência para as células não estimuladas em reduzir a produção de NO ao longo do período experimental.

Tabela 9. Concentrações de NO produzido por neutrófilos de cães adultos mediante o consumo de selênio ao longo do experimento. Valores expressos em micromols de NO/ 3×10^5 células.

Item	Dia	CO ¹	Selênio levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴					
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI		
Só células														
	0	3,85	5,44	9,23	5,87	5,12	5,90 ^B	1,22						
	30	8,06	7,24	13,30	5,52	14,75	9,77 ^A	1,03						
	60	6,77	4,66	7,96	8,93	5,93	6,85 ^B	1,03						
	90	5,24	4,72	5,29	4,10	4,75	4,82 ^B	1,06						
	120	2,12	2,61	2,75	2,14	2,53	2,43 ^C	1,06						
	Média	5,21 ^{bc}	4,93 ^c	7,70 ^a	5,31 ^{bc}	6,61 ^{ab}			NS	NS	NS	NS		
	EPM	0,98	0,98	0,97	0,98	0,98								
	Tratamento	0,0702												
	Período	<,0001												
	Trat*período	0,4340												
Contrastes ⁴														
	L						<,0001							
	Q						0,0011							
LPS														
	0	5,11	6,34	9,06	9,08	5,64	7,05 ^{AB}	1,38						
	30	6,22	7,75	16,41	6,19	13,35	9,99 ^A	1,15						
	60	6,34	5,70	6,34	5,48	7,79	6,23 ^B	1,15						
	90	3,32	3,18	4,59	4,01	4,74	3,97 ^{BC}	1,18						
	120	2,51	3,04	2,34	2,06	2,27	2,44 ^C	1,20						
	Média	4,70	5,20	7,75	5,36	6,66			NS	NS	NS	NS		
	EPM	1,03	1,07	1,05	1,03	1,07								
	Tratamento	0,1479												
	Período	<,0001												
	Trat*período	0,7179												
Contrastes ⁴														
	L						<,0001							
	Q						NS							

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. Só células – células não estimuladas; LPS – Lipopolysaccharide. ^{a,b,c}Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ^{A,B,C}Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 10. Concentrações de NO produzido por monócitos de cães adultos mediante o consumo de selênio ao longo do experimento. Valores expressos em micromols de NO/ 3×10^5 células.

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs SI
Só células												
	0	8,99	6,83	4,20	9,38	9,56	7,79 ^A	1,92				
	30	3,95	5,28	2,54	4,39	3,18	3,87 ^B	1,57				
	60	4,77	3,82	6,17	4,24	5,90	4,98 ^B	1,57				
	90	6,23	2,45	5,57	4,99	5,72	4,99 ^B	1,63				
	120	2,31	2,84	3,02	5,07	2,73	3,20 ^B	1,57				
	Média	5,25	4,24	4,30	5,61	5,42			NS	NS	NS	NS
	EPM	1,60	1,64	1,60	1,60	1,64						
	Tratamento	0,5149										
	Período	0,0661										
	Trat*período	0,5400										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						NS					
LPS												
	0	2,71	2,21	3,01	2,71	2,03	2,53 ^C	1,40				
	30	3,37	1,89	8,06	3,08	4,21	4,12 ^B	1,15				
	60	6,51	6,81	10,88	4,52	3,59	6,46 ^A	1,15				
	90	8,04	6,79	10,67	5,52	6,39	7,48 ^A	1,22				
	120	4,42	5,90	2,94	4,51	4,14	4,38 ^B	1,17				
	Média	5,00	4,72	7,11	4,07	4,07			NS	NS	NS	NS
	EPM	1,27	1,31	1,26	1,31	1,29						
	Tratamento	0,4058										
	Período	0,0467										
	Trat*período	0,9731										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						0,0193					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ⁶NS = não significativo. Só células – células não estimuladas; LPS – Lipopolysaccharide. ^{A,B,C,D}Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

DISCUSSÃO

A proliferação de linfócitos oferece informações mediadas por células e valores muito baixos ou altos de proliferação podem indicar deficiência no sistema imunológico. Estudos, em outras espécies, demonstraram a influência do selênio na proliferação de linfócitos (PERETZ et al., 1991; BROOME et al., 2004; HAWKES et al., 2011; BRUMMER et al., 2013). Os animais que receberam as dietas CO e SI66 apresentaram maiores valores de proliferação comparado aos que receberam dietas suplementadas com seleno levedura aos 30 dias. Broome et al. (2004) verificaram que humanos que receberam selenito de sódio tiveram picos de proliferação linfócitos logo após o início da suplementação de selênio através de cápsulas.

Brummer et al. (2013) avaliando fontes de selênio encontraram que sob estímulo de ConA a proliferação dos linfócitos de equinos não foi influenciada pelos tratamentos, apenas pelo tempo, pois ao final de 5 semanas a proliferação celular diminuiu. Apesar de grande variação ao longo do tempo dos índices de proliferação celular, pode ser observado em nosso estudo, efeito da fonte de selênio e do nível de selênio adicionado a dieta. Ao final de 120 dias, os linfócitos de cães recebendo dietas suplementadas com 0,33 ppm de selênio tiveram maior índice de proliferação celular. Peretz et al. (1991) encontraram que a suplementação de Se-levedura para humanos aumenta a porcentagem de proliferação de linfócitos frente a alguns antígenos.

A ação do selênio na proliferação celular ocorre através da IL-2, como já foi mencionado anteriormente, o selênio estimula a expressão genica do receptor de alta afinidade para IL-2. A expansão clonal de linfócitos T depende da interação da IL-2 com seus receptores que estão expressos na superfície da célula. Quando a IL-2 se liga a esse receptor, ocorre ativação de vários mensageiros intracelulares que leva a maior ativação da síntese DNA (replicação do DNA), o que propicia a mitose aumentada e, por consequência, ocorrerá maior proliferação de linfócitos, entre outras reações desencadeadas pela IL-2 (KIREMIDJIAN-SCHUMACHER et al., 1990; ROY et al., 1992; ROY et al., 1993).

A atividade fagocítica de monócitos e neutrófilos não foi influenciada pelas fontes ou níveis de selênio adicionados a dieta. A fagocitose de bactérias é muito estudada na área de gado de leite e diversos artigos demonstram a influência do selênio em melhorar esta função dos neutrófilos (GRASSO et al., 1990). Weiss e Hogan (2005)

mostraram que vacas leiteiras que receberam dietas suplementadas com 0 ppm, 0,3 ppm de seleno levedura ou selenito de sódio não apresentaram efeitos do selênio na função de neutrófilos. Em humanos testes *in vitro* demonstraram que a suplementação de selênio atua na capacidade de fagocitose de neutrófilos do sangue periférico (ARTHUR et al., 2003).

A suplementação de selênio parece aumentar significativamente os linfócitos T citotóxicos e as células T ativadas. Hawkes et al. (2001) sugeriram que estas propriedades imunes do selênio são resultantes da melhor ativação e proliferação de linfócitos B e do reforço das funções das células T. Neste estudo não foram observadas alterações nos linfócitos T totais, T auxiliares e T citotóxicos, apenas um aumento nos linfócitos T totais ao final de 120 dias para todos os tratamentos; porém, a relação de linfócitos T auxiliares/T citotóxicos diminuiu ao longo do experimento, e isto indica uma alteração da função dos linfócitos.

Hoffmann et al. (2010) mostraram que em camundongos suplementados com selenito de sódio (0,08 ppm; 0,25 ppm; e 1,0 ppm de Se) as células CD4⁺ (linfócitos T auxiliares) apresentaram maior resposta e aumentaram linearmente com a inclusão de selênio na dieta. Broome et al. (2004) forneceram 0, 50 ou 100 µg de selênio na forma de capsulas a seres humanos diariamente por 15 semanas e estes autores constataram que a suplementação de selênio aumentou as porcentagens totais de células T e também de células CD4⁺ (T helper) e que, a proliferação das células T ocorreu mais rapidamente em indivíduos suplementados com selênio do que nos que receberam placebo. sugerindo que os grupos que receberam selênio tiveram a habilidade em aumentar a resposta imune aos desafios virais.

Os dados deste estudo concordam com Pisek et al. (2008) que não encontraram efeitos dos tratamentos com selênio orgânico e inorgânico na imunofenotipagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ para ovelhas não prenhes, gestantes e lactantes. A relação CD4⁺/CD8⁺ também foi avaliada e não encontraram diferenças entre os tratamentos. Em pacientes com problemas de tireóide a suplementação com selenito de sódio não mostrou diferenças entre a produção de citocinas produzidas por células T CD4⁺ e CD8⁺ (KARANIKAS et al., 2008). Cheng et al. (2012) não encontraram efeitos da suplementação de selênio em células T CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos com câncer de próstata induzido.

O selênio influencia mais os linfócitos T do que os linfócitos B, isto ocorre, provavelmente, devido ao elevado número de ácidos graxos poliinsaturados presentes nos linfócitos T (LARSEN, 1993), e o selênio através da GSH-Px age sob os peróxidos lipídicos. Neste estudo, houve uma tendência em relação ao aumento dos linfócitos B em resposta a inclusão de selênio a dieta. Não há indícios na literatura que o selênio influencia o número absoluto de linfócitos B, porém discute-se a ação do selênio na produção de anticorpos contra antígenos específicos (Broome et al., 2004; Brummer et al., 2013).

A deficiência de Se pode afetar a imunidade humoral, por exemplo, os valores de IgG, IgM e IgA em ratos e os de IgM e IgG em humanos deficientes em Se foram diminuídos (ARTHUR et al., 2003). Spallholz et al. (1973) sugeriram que o selênio pode potencializar a síntese de anticorpos circulantes. Estes autores mostraram que os níveis máximos de IgM e IgG foram encontrados em ratos que receberam dietas suplementadas com 1 a 3 ppm de selênio após 7 dias da injeção de eritrócito de carneiro (SRBC), e que em ratos com deficiência ou excesso selênio esses níveis foram bem mais baixos. Outro estudo com ratos que passaram por deficiência de selênio durante a gestação, lactação e desmame demonstrou que estes tiveram redução na produção dos anticorpos IgG e IgM após inoculação com SRBC (MULHERN et al., 1985).

Awadeh et al. (1998) estudando fontes e níveis de selênio para vacas de leite e bezerros encontram que as concentrações de IgG e IgM foram menores em animais que receberam 20 ppm de Se adicionado ao sal do que os que receberam 60 e 120 ppm de Se e, quanto a fonte utilizada, os animais que receberam 60 ppm de seleno levedura adicionado ao sal tiveram maiores concentrações de IgM. Estes autores também mostraram que o colostro das vacas que receberam 120 ppm de selênio tinha maiores concentrações de IgG e que, por consequência, seus bezerros apresentaram maiores concentrações de IgG no plasma sanguíneo.

Os resultados deste estudo são semelhantes com os apresentados por Brummer et al. (2013) para equinos, onde a suplementação de altas concentrações de selênio orgânico ou inorgânico não foram diferentes do grupo com baixo e adequado selênio. Os animais passaram por um período de adaptação de 8,5 meses com dieta com baixo selênio e o experimento durou 7,5 meses. Uma das justificativas apresentadas pelos autores é que houve adaptação às dietas com baixa concentração de selênio e, isto fez

com que o organismo dos animais compensasse utilizando outros compostos que atuam no sistema imunológico, como por exemplo a vitamina E.

O DTH avalia a capacidade do animal em reagir com resposta imune mediada por células (KIM et al., 2000). A inflamação e o edema que ocorrem em resposta aos antígenos inoculados dentro da pele podem ser considerados mediados por células, já que apresentam a evolução e os aspectos histológicos da reação de hipersensibilidade do tipo IV, ou seja, desenvolve-se resposta inflamatória lenta no local da aplicação. Lacetera et al. (1999) demonstrou maior resposta a estimulação por fitohemaglutinina de animais que receberam selenito de sódio na dieta comparado com os animais do grupo controle. Hawkes et al. (2009) avaliaram a influência do selênio levedura e do selenito de sódio através do teste de DTH em seres humanos saudáveis, e verificaram que o grupo que recebeu baixo selênio teve diminuição da resposta mediada por células, porém não encontrou diferença entre as fontes de selênio para esta resposta imunológica. No presente estudo os níveis de selênio não influenciaram a resposta imune mediada por células. Hawkes et al. (2009) ressaltaram que em pessoas saudáveis e bem nutridas a maioria dos parâmetros imunológicos avaliados em experimentos não são alterados pelos tratamentos.

Os níveis de H_2O_2 produzidos por neutrófilos não apresentaram diferenças entre os tratamentos, o que indica que as fontes e os níveis de selênio deste estudo não influenciaram a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) por neutrófilos de cães adultos saudáveis, ou ainda que os estímulos (LPS, PMA e LPS+PMA) não foram suficientes para provocar resposta nestas células. Ao avaliar-se a produção de H_2O_2 por monócitos de cães verificou-se que houve tendência para maior produção de H_2O_2 por células estimuladas com LPS pelos animais dos tratamentos SO99 e SI66. Sabe-se que o selênio é capaz de promover a proteção das células contra a ação dos ROS, Zhou et al. (2009) encontraram que, mesmo em baixas concentrações, o selênio protege as células contra a produção de ROS, diminuindo as concentrações das espécies reativas de oxigênio que foram produzidas por macrófagos.

Os níveis de óxido nítrico produzidos por neutrófilos e monócitos/macrófagos avaliados neste estudo não sofreram ação dos tratamentos, do que pode-se inferir que todos os tratamentos foram capazes de manter os níveis de NO baixo, inclusive o tratamento CO. Kang et al. (1998) avaliaram três dietas para ratos (baixo lipídio, alto

lipídio e alto lipídio+suplementação de Se) e verificaram que a produção de óxido nítrico foi mais baixa no grupo que recebeu a dieta com suplementação de selênio, porém foi avaliada a produção de NO em plasma sanguíneo de ratos. Em macrófagos de camundongo suplementados com selênio, Prabhu et al. (2002) encontraram maior concentração de NO para o tratamento com baixo selênio.

Apesar das muitas formas de como o selênio atua no sistema imunológico não estarem tão bem esclarecidas, sabe-se que ele é essencial para o desenvolvimento e funcionamento normal deste sistema (TURNER e FINCH, 1991; ARTHUR et al., 2003; THOMSON, 2004; SURAI, 2003; HUANG et al., 2012). A maioria dos trabalhos que avaliaram estes efeitos foram realizados em animais em crescimento, em deficiência nutricional, com doenças ou submetidos a grandes desafios, sendo poucos os estudos com indivíduos saudáveis e bem nutridos. Portanto, os resultados apresentados neste estudo são consistes levando-se em consideração que os cães utilizados são animais saudáveis e bem nutridos, que nunca passaram por deficiências nutricionais ao longo de sua vida e que provavelmente possuem estoques de selênio no organismo.

CONCLUSÃO

O sistema imunológico utiliza com eficiência tanto o selenito de sódio como o seleno levedura como fontes de selênio da dieta. Doses complementares não são necessárias para ótima resposta imune quando cães adultos saudáveis são submetidos a pequenos desafios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTHUR, J.R., R.C. MCKENZIEY; G.J., BECKETT. 2003. Selenium in the immune system. *Journal of Nutrition*. 133:1457S–1459S.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). 2009. Official Publication. Oxford.
- AWADEH, F.T., R.L. KINCAID and K.A. JOHNSON. 1998. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves. *Journal of Animal Science*. 76:1204-1215.
- BROOME, C.S., F. MCARDLE, F., J.A.M. KYLE, F. ANDREWS, N.M. LOWE, C.A. HART, J.R. ARTHUR and M.J. JACKSON. 2004. An increase in selenium intake

- improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80:154-162.
- BRUMMER, M., S. HAYES, A.A. ADAMS, D.W. HOROHOV, K.A. DAWSON and L.M.LAWRENCE. 2013. The effect of selenium supplementation on vaccination response and immune function in adult horses. *Journal of Animal Science*. 91:3702-3715.
- BRYANT, R. W., and J. M. BAILEY. 1980. Altered lipoyxygenase metabolism and decreased glutathione peroxidase activity in platelets from selenium-deficient rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:268-276.
- CHENG, W., A. HOLMSTROM, X. LI, R.T. WU, H.I. ZENG, and Z. XIAO. 2012. Effect of dietary selenium and cancer cell xenograft on peripheral T and B-lymphocytes in adult nude mice. *Biological trace element research* 146: 230-235.
- COHEN, G. AND P. HOCHSTEIN. 1963. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2:1420-1428.
- FINCH, J. M. and R.J, TURNER, R.J. 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Research in Veterinary Science*, 60:97-106.
- GRASSO, P. J., R. W. SCHOLZ, R. J. ERSKINE, and R. J. EBERHART. 1990. Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diets. *American Journal of Veterinary Research* 51: 269-274.
- GUEVARA, I., J. IWANEJKO, A. DEMBINSKA-KIEC, J. PANKIEWICZ, A. WANAT, P. ANNA, I. GOLABEK, S. BARTUS, M. MALCZEWSKA-MALEC and A. SZCZUDLIK. 1998. Determination of nitrite/nitrate in humanbiological material by the simple Griess reaction. *Clinical Chemistry Acta*, 274:177-188.
- HAWKES, W.C., A. HWANG, and Z. ALKAN. 2009. The effect of selenium supplementation on DTH skin responses in healthy North American men. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 23: 272-280.
- HAWKES, W.C., D.S. KELLEY, P.C. TAYLOR. 2001. The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men. *Biological Trace Element Research*. 81:189-213.

- HOFFMANN, F.W., A.C. HASHIMOTO, L.A. SHAFER, S. DOW, M.J. BERRY, and P.R. HOFFMANN. 2010. Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *The Journal of nutrition*. 140: 1155-1161.
- HUANG, Z., A.H. ROSE, and P.R. HOFFMANN P.R. 2012. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 16:705-43.
- KANG, B.P.S., M.P. BANSAL, and U. MEHTA. 1998. Selenium supplementation and diet induced hypercholesterolemia in the rat: changes in lipid levels, malonyldialdehyde production and the nitric oxide synthase activity. *General physiology and biophysics* 17:71-78.
- KARANIKAS, G., M. SCHUETZ, S. KONTUR, H. DUAN, S. KOMMATA, R. SCHOEN, A. ANTONI, K. KLETTER, R. DUDCZAK, and M. WILLHEIM. 2008. No immunological benefit of selenium in consecutive patients with autoimmune thyroiditis. *Thyroid* 18:7-12.
- KIM, H.W., B.P.CHEW, T.S. WONG, J.S. PARK, B.B.C. WENG, K.M. BYRNE, M.G. HAYEK, and G.A. REINHART. 2000. Dietary lutein stimulates immune response in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 74:315-327.
- KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L., M. ROY, H.I. WISHE, M.W.COHEN and G. STOTZKY. 1990. Selenium and Immune Cell Function. I. Effect on lymphocyte proliferation and production of interleukin 1 and interleukin 2. 193:136-142.
- LACETERA, N., U. BERNABUCCI, B. RONCHI, and A. NARDONE. 1999. The effects of injectable sodium selenite on immune function and milk production in Sardinian sheep receiving adequate dietary selenium. *Veterinary research* 30:363-370.
- LARSEN, H.J. Relation between selenium and immunity. 1993. *Norwegian Journal of Agriculture Science*, 11:105-109.
- MEISTER, A. and M.E. ANDERSON. 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52:711-760.
- MORAES, P.M.; MILANTONIO, R.B; CAGNANI, G.S.; SANTOS, F.A.; PADILHA, C.C.F.; LIMA, P.M.; PADILHA P.M. Analytical procedure based on slurry sampling for determining selenium in organic vegetable samples by graphite furnace

- atomic absorption spectrometry. *European Food Research and Technology*, v. 229, p. 409-414, 2009. DOI: 10.1007/s00217-009-1068-2.
- MULHERN, S.A., G.L. TAYLOR, G.L., L.E. MAGRUDER, A.R. VESSEY. 1985. Deficient levels of dietary selenium suppress the antibody response in first and second-generation mice. *Nutrition Research*. 5:201-210.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. Washington: National Academy, 398p.
- PERETZ, A.; J. NÈVE, J. DESMEDT, J. DUCHATEAU, M. DRAMAIX, M. and J.P. FAMAHEY. 1991. Lymphocyte response is enhanced by supplementation of elderly subjects with selenium-enriched yeast. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53:1323-1328.
- PICK, E. and D. MIZEL. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader, *Journal of Immunological Methods*. 46:211-226.
- PICK, E. and Y. KEISARI. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *Journal of Immunological Methods*, 38:161-170.
- PISEK, L., J. TRAVNICEK, J. SALAT, V. KROUPOVA, and M. SOCH. 2008. Changes in white blood cells in sheep blood during selenium supplementation. *Veterinarni Medicina-Praha*. 53: 255.
- PRABHU, K., F. ZAMAMIRI-DAVIS, J. STEWART, J. THOMPSON, L. SORDILLO, and C. REDDY. 2002. Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor- κ B in up-regulation. *Biochemical Journal*. 366:203-209.
- ROY, M., KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, H. I. WISHE, M. W. COHEN, and G. STOTZKY. 1992. Effect of selenium on the expression of high affinity interleukin 2 receptors. *Experimental Biology and Medicine*. 200:36-43.
- ROY, M., L. KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, H. I. WISHE, M. W. COHEN, and G. STOTZKY. 1993. Selenium supplementation enhances the expression of interleukin 2 receptor subunits and internalization of interleukin 2. *Experimental Biology and Medicine* 202:295-301.

- SAS Institute Inc., 2003. User Installation Guide for the SAS® System, Version 9.0 for Microsoft® Windows®, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SILVA, FA.; NEVES, R.C.F.; QUINTERO-PINTO, L.G.; PADILHA, C.C.F.; JORGE, S.O.M.A.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; PADILHA P.M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere*, v. 68, p. 1542-1547, 2007.
- SPALLHOLZ, J.E.; J.L. MARTIN, L.G. MARLENE, and R.H. HEINZERLING. 1973. Enhanced immunoglobulin M and immunoglobulin G antibody titers in mice fed selenium. *Infection and Immunity*, 8:841-842.
- STADMAN, T.C. 1990. Selenium Biochemistry. *Annual Review Biochemistry* 59: 111-127.
- SURAI, P.F. 2003. Selenium-vitamin E interactions: does 1+1 equal more than 2?. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A (Eds) *Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries. 2003. Proceedings...* Nottingham University, UK. p.59-76
- TURNER, R.J., J.M. FINCH. 1991. Selenium and the immune response. *Proceedings of the Nutrition Society*, 50:275–285.
- WEISS, W. P., and J. S. HOGAN. 2005. Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 88:4366-4374.
- ZHOU, Y., S. ZHANG, C.W. LIU, and Y.Q. CAI. 2009. The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK₁ cells. *Toxicology in Vitro* 23:288-294.

CAPÍTULO 3

AÇÃO ANTIOXIDANTE DO SELÊNIO EM CÃES ADULTOS

Running head: Antioxidant functions of selenium in dogs

The antioxidant action of selenium in dogs²

T.C. Putarov^{*2}, J.R. Sartori^{*}, A.C. Carciofi[†]

^{*}Department of Animal Breeding and Nutrition, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP 18610-000, Brazil;

[†] Department of Veterinary Clinic and Surgery, College of Agrarian and Veterinarian Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil.

¹ The authors acknowledge the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process number: 478050/2011-9 and 140413/2011-1), São Paulo, Brazil; Biorigin; and Mogiana Alimentos S.A. (GUABI), Campinas, Brazil

² Corresponding author: thailaputarov@gmail.com

ACÇÃO ANTIOXIDANTE DO SELÊNIO EM CÃES ADULTOS

RESUMO: Neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito de níveis e fontes de selênio sobre os parâmetros antioxidantes de cães adultos. Os tratamentos foram: CO - dieta basal com adição de selenito de sódio, totalizando 0,13 ppm de Se; SO33 - dieta basal + Se-levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + Se-levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + Se-levedura totalizando 0,99 ppm de Se; SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 90 dias com a ração CO seguidos de 120 dias de fase experimental e recebendo as dietas testes, totalizando um total de 210 dias. O sangue foi coletado para a determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px), dos teores de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH), e para a determinação de marcadores de estresse oxidativo: malonaldeído (MDA), tióis totais, capacidade antioxidante total (CAT), potencial redutor férrico (FRAP), α -tocoferol e retinol nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 da fase experimental. A relação GSH e GSSG também foi determinada. Ao término do período experimental os animais foram submetidos a estresse sonoro, o sangue foi coletado antes e após 3h30min do estresse e as análises acima citadas foram realizadas. As concentrações de MDA e FRAP reduziram linearmente ao longo do experimental. Os valores de tióis totais e de CAT foram maiores no início do experimento para os animais do SO66, porém ao final as médias entre todos os tratamentos não diferiram entre si. As concentrações de α -tocoferol, retinol e o metabolismo de glutathionas não foram influenciados pelos tratamentos. Após o estresse sonoro, verificou-se aumento das concentrações de MDA sérico para o tratamento SI66 e também aumento dos valores de α -tocoferol com a inclusão de Se-levedura. Para cães adultos em manutenção não há benefícios no status antioxidante após a suplementação de selênio o que sugere que 0,11 ppm de Se é adequado para cães em manutenção. O selenito de sódio acima de 0,66 ppm na dieta possui ação pró-oxidante quando cães adultos são expostos a pequenos estresses.

Palavras-chave: glutathiona, estresse oxidativo, minerais, sangue total

THE ANTIOXIDANT ACTION OF SELENIUM IN HEALTHY DOGS

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the effects of selenium sources and levels on the antioxidant status of adult dogs before and after a stress condition. Treatments were: CO - control diet with sodium selenite addition, totalizing 0.13 ppm of Se; SO33 - control diet + Se-yeast, totalizing 0.33 ppm of Se; SO66 - control diet + Se-yeast, totalizing 0.66 ppm of Se; and SO99 - control diet + Se-yeast, totalizing 0.99 ppm of Se; SI66 - control diet + sodium selenite, totalizing 0.66 ppm of Se. Animals underwent though an adaptation period of 90 days and received the CO diet; the experimental phase lasted 120 days when animals received the tested diets and samples were taken on days 0, 30, 60, 90 and 120. Whole blood was collected to determine the activity of glutathione peroxidase (GPx), oxidized glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH), total glutathione (GSHT; GSH+2GSSG) and the GSH/GSSG ratio. Blood serum was also collected to evaluate malondialdehyde (MDA), ferric reducing ability of plasma (FRAP), total thiols, total antioxidant capacity (TAC), α -tocopherol and retinol. After 120 days, dogs were submitted to a stress condition playing a loud noise in the room and after three and half hour blood samples were collected and evaluated for the same analysis mentioned above. The MDA and FRAP concentrations decreased linearly along the experiment for all treatments ($P < 0.05$), however there was a trend for higher FRAP for animals receiving CO and Se-yeast 0.66 ($P < 0.1$). Total thiols and TAC were higher at the beginning for CO-fed animals, but there were no difference among treatments after 120 days. Retinol, α -tocopherol and the metabolism of glutathiones were not affected by treatments ($P > 0.05$). After the stress condition, the MDA levels was higher for SI66-fed dogs and the α -tocopherol was higher within the addition of Se-yeast. For dogs at maintenance, no additional benefits on evaluated oxidative status parameters were verified after Se supplementation. These results suggests that the level and source of added selenium have no strong influence for healthy adult dogs during maintenance. Sodium selenite, on the other hand, increased oxidative susceptibility of dogs submitted to a stress situation.

Keywords: glutathione, oxidative stress, mineral, whole blood

INTRODUÇÃO

O selênio é um elemento traço essencial para os animais (HAUG et al., 2007; SHARADAMMA et al., 2011). Suas funções fisiológicas podem ser atribuídas principalmente através de sua incorporação nas selenoproteínas, a mais conhecida é a glutathiona peroxidase (GSH-Px) que contém em sua cadeia polipeptídica, a selenocisteína, um aminoácido essencial (SODA et al., 1988; RAYMAN, 2005; HUANG et al., 2012). As proteínas que contêm selênio são necessárias para o funcionamento normal do sistema antioxidante, metabolismo da tireoide, reações de oxido-redução, sistema imunológico (ARTHUR et al., 2003) e formação de espermatozoides (RAYMAN, 2000; THOMSON, 2004).

O sistema antioxidante protege o organismo da formação de radicais livres e essa proteção ocorre por meio de antioxidantes presentes por todo o corpo. Os radicais livres são produzidos durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções importantes no metabolismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). As enzimas antioxidantes superóxido desmutase, catalase e glutathiona peroxidase formam a primeira barreira antioxidante do organismo. A atividade enzimática de GSH-Px é um dos meios de controle dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de radicais livres (COHEN e HOCHSTEIN, 1963; MEISTER e ANDERSON, 1983). O selênio pode atuar ainda, economizando a vitamina E, pois esta tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas.

As quantidades de selênio nos ingredientes dos alimentos para cães e gatos podem variar muito; as concentrações deste mineral nos vegetais dependem da região geográfica e da concentração de Se no solo (NRC, 2006; SURAI, 2002). Já nos tecidos animais sua concentração depende dos níveis de selênio da dieta (TODD e HENDRIKS, 2005). Devido a esta grande variabilidade da concentração de selênio nos ingredientes, os alimentos para cães e gatos são frequentemente suplementados. A forma mais antiga de suplementação de selênio é por meio das formas inorgânicas, onde há grandes riscos de intoxicação, interações negativas, efeitos pró-oxidantes e baixa eficiência de transferência para os tecidos (THOMSON, 1998). Em contraste, as formas orgânicas contribuem para o sistema antioxidante, tem baixa toxicidade e alta biodisponibilidade

com a habilidade de aumentar as reservas de selênio nos tecidos comparado às fontes inorgânicas (SURAI, 2002).

Não há estudos para cães em manutenção sobre exigências, metabolismo ou que demonstrem a diferença na função biológica entre as fontes de selênio; os resultados apresentados no NRC (2006) são extrapolações de outras espécies como frangos e ratos sendo que a recomendação é de 0,35 ppm de selênio (dieta com 4.000 kcal EM/kg) e não considera-se o estado fisiológico do animal. Diante do exposto, objetivou-se através deste estudo avaliar os efeitos de fontes e níveis de selênio no status antioxidante de cães adultos em manutenção.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, sob o protocolo de número 015693/12-CEUA, e está em concordância com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Delineamento experimental, animais e tratamentos

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”. Foram utilizados trinta cães adultos da raça Beagle, em manutenção, com idade média de $7,3 \pm 2,2$ anos e peso médio de $12,59 \pm 1,6$ kg, em boas condições corporais, clinicamente saudáveis, desverminados e vacinados. O experimento seguiu um delineamento em blocos completos casualizados com medidas repetidas no tempo. Os animais foram distribuídos em três blocos completos casualizados de dez animais cada, em cada bloco havia 2 repetições por tratamento totalizando 6 repetições por tratamento; o cão foi a unidade experimental. O experimento compreendeu 2 fases: a adaptação que durou 90 dias com a o fornecimento da ração controle (CO) para todos os animais; e a fase experimental com duração de 120 dias quando os animais receberam as dietas testes e as amostras foram coletadas, portanto cada bloco teve duração total (adaptação e fase experimental) de 210 dias.

As dietas experimentais (tabela 1) foram constituídas de ingredientes com reduzidos teores de selênio e, para isto, alguns ingredientes foram testados para depois serem escolhidos para a formulação. Todos os tratamentos foram compostos pela mesma dieta base, diferenciando-se apenas pela concentração e pela fonte de selênio adicionada. A dieta base foi formulada para que seus níveis nutricionais e suplementação vitamínico-mineral atendessem às recomendações nutricionais para cães em manutenção da Association of American Feed Control Official (AAFCO, 2009), com exceção dos teores de selênio. Para o experimento, foi desenvolvido, em parceria com a empresa Mcassab (São Paulo, Brasil), um premix específico sem adição de fontes de selênio e com o teor mínimo de vitamina E (30 UI/kg de ração) recomendado pela AAFCO (2009) seguindo os padrões de qualidade e garantia dos teores de vitaminas e minerais.

O selenito de sódio e o selênio levedura também foram analisados quanto aos seus teores de selênio antes de serem incluídos a dieta. Para a produção das rações, todos os ingredientes foram misturados, exceto o premix mineral-vitamínico e a fonte de selênio. O teor de selênio foi determinado nesta pré-mistura antes que fossem adicionadas as fontes do mineral em estudo. Com o teor de selênio da pré-mistura (0,07 mg de Selênio por kg de mistura – valor analisado) e das fontes de selênio, foram calculadas as quantidades necessárias de inclusão de selenito de sódio e do selênio levedura para que se atingisse os valores desejados. Para esta mistura final tomou-se o cuidado para que ocorresse uma ótima homogeneização, portanto cada fonte do mineral foi primeiramente misturada a uma quantidade pequena da pré-mistura, depois misturada com o premix e mais uma quantidade da pré-mistura em misturador Y com capacidade para 15 kg, para então ser realizada a mistura final. A mistura final foi moída em moinho de martelo com peneira de 1 mm e depois extrusada.

As dietas experimentais foram extrusadas na Fábrica de Rações da FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal e devidamente armazenadas. Os parâmetros de processos foram controlados por toda a extrusão; a cada 30 minutos leituras destes parâmetros eram realizadas para que todas as fontes de selênio fossem extrusadas na mesma condição, uma vez que o processo influencia na concentração final do mineral na ração. A dieta basal apresentou a concentração de selênio menor que o mínimo recomendado e portanto, teve que receber a adição de fonte de selênio padrão (selenito

de sódio) para que esta ficasse dentro do mínimo recomendado pela AAFCO (2009), a indução da deficiência de nutrientes não é aceitável para cães de acordo com as normas de bem-estar animal.

As determinações de selênio foram feitas no laboratório de Espectrometria Atômica Aplicado do Departamento de Química e Bioquímica/UNESP-Botucatu-SP utilizando a técnica de espectrometria atômica e o método por atomização em forno de grafite (SILVA et al, 2007; MORAES et al., 2009). Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA) e matéria mineral (MM) segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995). Os valores de energia bruta foram determinados por meio de calorímetro adiabático (PARR Instrument-1281, Moline, EUA).

Os animais foram submetidos a cinco tratamentos: CO - dieta basal com adição de selenito de sódio, totalizando 0,13 ppm de Se; SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. A quantidade de ração administrada foi calculada de acordo com o valor energético da ração e a necessidade energética do animal (NRC, 2006). Os animais foram pesados semanalmente e a quantidade de ração ajustada caso ocorresse aumento ou redução de peso.

O alimento foi oferecido duas vezes ao dia às 8h00 e às 16h00, e água fresca ficou disponível todo o tempo. A dieta controle (CO) foi oferecida aos animais por um período de adaptação de 90 dias antes da introdução das rações experimentais. Esta dieta teve como função igualar a condição nutricional dos animais. O peso dos animais e a ingestão de alimento também foram controlados por todo período de adaptação. Após este período os cães passaram a receber seus respectivos tratamentos por mais 120 dias.

Tabela 1. Inclusão (%) dos ingredientes e composição nutricional das rações experimentais.

Ingrediente	Tratamentos ¹				
	CO	SO33	SO66	SO99	SI66
Milho, grão	48,04	48,00	48,00	48,00	48,04
Protenose, 60%	19,19	19,15	19,05	19,00	19,19
Farelo de soja, 45%	17,00	17,00	17,00	17,00	17,00
Óleo de vísceras	8,54	8,54	8,54	8,54	8,54
Fibra de cana-de-açúcar	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Fosfato bicálcico	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
Suplemento mineral-vitamínico ²	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Calcário calcítico	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Óleo de peixe	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Cloreto de colina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Cloreto de potássio	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Antifúngico ³	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
L-triptofano	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Antioxidante ⁴	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
L-Lisina	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29
Selenito de sódio ⁵	-	-	-	-	0,001
Selênio levedura ⁶	-	0,09	0,21	0,325	-
Total	100,00	100,01	100,03	100,09	100,00
Valores nutricionais analisados das dietas ⁹					
Energia Metabolizável, (kcal/kg) ⁷	3.680	3.720	3.670	3.690	3.670
Matéria seca (%)	92,81	92,41	92,22	92,21	92,51
Proteína Bruta (%)	25,96	24,71	24,76	25,11	24,83
Extrato Etéreo em Hidrólise ácida (%)	14,95	15,15	14,15	15,25	14,30
Matéria Mineral	5,90	5,81	5,67	5,46	5,43
Fibra Bruta (%)	5,40	4,87	4,81	5,34	5,19
Cálcio (%)	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
Fósforo total (%)	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Vitamina E (UI/kg)	30	30	30	30	30
Selênio (ppm - mg/kg) ⁸	0,13	0,342	0,677	0,971	0,674

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ² Adição por quilograma de dieta: Ferro 150 mg, Cobre 15 mg, Manganês 7 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg, Vit A 15000 UI, Vit D 1000 UI, Vit. E 30 UI, Tiamina 4 mg, Riboflavina 5 mg, Ácido pantotênico 20 mg, Niacina 30 mg, Piridoxina 4 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,04 mg e Colina 1500 mg. ³ Mold-Zap AS, Alltech, Inc., EUA. ⁴ Antiox-RC, Alltech, Inc., EUA. ⁵ Selenito de sódio PA (VETEC Química Fina LTDA., Brasil) com 448,0 mg de selênio por grama do produto. ⁶ Selemax® (Açucareira QUATÁ S.A., Brasil) com 998,7 mg de selênio por quilograma do produto. ⁷ Valor calculado pelo fórmula do NRC (2006). ⁸Valores analisados. ⁹ Com base na matéria seca.

Coleta e preparação das amostras

Nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 do período de avaliação das cinco dietas experimentais, 20 mL de sangue foram coletados por punção da veia jugular com seringas sem anticoagulante. O sangue foi então transferido para tubos com heparina sódica (10 µL de heparina sódica por mililitro de sangue para obtenção do sangue total e para tubos sem anticoagulante para obtenção do soro sanguíneo dos animais. As análises abaixo mencionadas foram realizadas.

Determinação da atividade da GSH-Px

Para análise da atividade da GSH-Px 100 µL de sangue total foram misturados a 900 µl de tampão fosfato (H_2PO_4) 50 mM pH=7 - 7,4 em microtubo de 2 ml. O microtubo foi centrifugado a 4°C por 12 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para a análise. O método baseia-se nos trabalhos de Paglia e Valentine (1967) onde a GSH-Px catalisa a oxidação da GSH por hidroperóxido (H_2O_2). Na presença de glutathione redutase e NADPH, a glutathione é imediatamente convertida à forma reduzida com concomitante conversão do NADPH em NADH+. A diminuição da concentração de NADPH foi mensurada por absorbância em comprimento de onda 340 nm.

Determinação da glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG)

O método utilizado para determinação da glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) Tietze, modificado por Rahma et al. (2007) que baseia-se na reação da GSH com o DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico; Reagente de Ellman) que produz o conjunto glutathione oxidada-TNB (GS-TNB) e o cromóforo TNB (ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzóico) que possui máxima absorbância a 412 nm. Para a determinação de glutathione oxidada (GSSG) é necessário evitar a oxidação de GSH durante o processamento das amostras, o que pode levar a uma produção artefactual de GSSG. A taxa de formação do TNB é proporcional à concentração de GSH na amostra. A glutathione dissulfeto (GSSG, forma oxidada) é então reduzida pela glutathione redutase (GR) na presença de NADPH, recolocando a GSH novamente na reação. Amostras de sangue total foram precipitadas com TCA 12% nas diluições 1:10 (p/v) para a obtenção dos extratos ácidos. A adição de 0,2 ml de DTNB (2,5 mM) nas cubetas contendo 1,9

mL de tampão fosfato de potássio 80 mM pH 8,0 e 0,1 ml do extrato ácido irá permitir, após cerca de 2 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em mmol g^{-1} .

Produção de malonaldeído (MDA)

A análise de produção de MDA foi realizada de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al. (1998), com algumas adaptações. Para a dosagem de MDA no soro foram utilizados 200 μl de amostra em microtubos. A este foi adicionado 650 μl de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 150 μl de HCL puro (37%). Logo após, os microtubos foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e em seguida os microtubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorbância com comprimento de onda de 586nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado.

Determinação dos valores de tióis totais

Os tióis totais foram analisados de acordo com metodologia proposta por (COSTA et al., 2006). A primeira leitura de absorbância foi realizada com 25 μl de amostra e 1 ml de Tris-EDTA (0,25mol/L Tris base, 0,20mol/L EDTA, pH 8,2) em 412 nm. Após isto, adicionou-se 25 μl de DTNB (10mmol/L em metanol absoluto) e após 15 minutos à temperatura ambiente fez-se a segunda leitura de absorbância. A concentração dos grupos sulfidríla é calculada utilizando uma curva padrão de Glutathione reduzida.

Determinação da vitamina E e vitamina A sérica

A análise de vitamina E foi realizada em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Shimadzu Co, Kyoto, Japan) a 292 nm. As amostras foram preparadas em tubos de ensaio protegidos com papel alumínio, e foram compostas por 200 μl de soro, 100 μl de etanol 100% com 0,125% BHT, 100 μl da solução padrão interno (acetato de alfa-tocoferila). As amostras foram agitadas em vortex por 5 segundos, em seguida a

vitamina foi extraída com a adição de 400 µl de hexano, agitadas por 2 minutos, e centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos. Então foram retirados 200 µl da fase hexânica para outro tubo e secas em fluxo de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em 200 µl de fase móvel (acetonitrila diclorometano e metanol). Para quantificação foi utilizada a razão entre a área do analito (vitamina) e a área do padrão interno, e a comparação com a curva de calibração (ARNAUD et al., 1991).

Capacidade antioxidante total (TAC)

Para a determinação da capacidade antioxidante total foi utilizada a metodologia descrita por Erel (2004), onde a molécula de ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) reduzida será oxidada a ABTS⁺ utilizando-se peróxido de hidrogênio em meio ácido (tampão acetato 3 mmol/l, pH 3,6). Na solução de tampão acetato, as moléculas do concentrado (verde escuro) ABTS⁺ permanecem estáveis por mais tempo. Enquanto as moléculas são diluídas com uma solução tampão acetato mais concentrada e em pH maior (0,4 mol/l, pH 5,8), ocorre a descoloração espontânea e lenta da coloração verde escuro, esta descoloração é inversamente proporcional à concentração de TAC da amostra. A taxa da reação é calibrada com uma curva de TROLOX e os resultados expressos em mmol de equivalente de Trolox/L.

Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

O FRAP é um teste de medida direta de oxidação lipídica. Para esta análise, o soro dos cães (100 µl) foi colocado em contato com o FRAP (TPTZ - 2,4,6-tripiridyl-s-triazina 10 mM em 40 mM de HCl; tampão acetato 300 mM pH 3,6; FeCl₃ 6H₂O 20 mM), sendo que este em baixo pH e com a presença de antioxidantes se reduz, formando uma coloração azul intensa, que foi monitorada pela medida da mudança na absorção em 593 nm. A mudança na absorbância estará diretamente relacionada com a combinação de "poder redutor total" de antioxidantes doadores de elétrons presentes na mistura de reação. O "poder antioxidante total" foi calculado utilizando como padrão o ácido ascórbico.

Avaliação do perfil antioxidante após estresse sonoro

No dia 120 da fase experimental, os animais foram submetidos a estresse sonoro que foi realizado por meio do estouro de estalinhos (fogos de artifício) no recinto onde estavam os animais. Os estalinhos foram estourados por cinco minutos e após 3h30min amostras de sangue foram coletadas para avaliação do perfil antioxidante utilizando-se as mesmas análises acima mencionadas.

Análise estatística

Todas as variáveis foram inicialmente testadas para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quando necessário foi realizada transformação por log. Os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo utilizando-se o procedimento PROC MIXED (SAS Inst. Inc., 2003) e o desdobramento realizado através do procedimento PROC GLM do mesmo software. Procedeu-se, também, análise por contrastes polinomiais ortogonais (linear e quadrático) e contrastes para se avaliar o efeito do selênio levedura independentemente de seu nível de inclusão, comparando-se as médias obtidas para as variáveis da dieta SI66 versus os demais tratamentos (SO33, SO66 e SO99). Outro contraste ortogonal foi determinado para avaliar o efeito da fonte inorgânica de selênio (SI66) comparado com a dieta sem selênio (CO). Os marcadores da oxidação avaliados após o estresse sonoro foram submetidos a análise de covariância. As médias também foram submetidas ao teste de Tukey. Considerou-se significativo o valor de $P < 0,05$ e tendência $P < 0,10$.

RESULTADOS

Concentrações de malonaldeído e tióis totais

Os valores das concentrações de malonaldeído e de tióis totais estão apresentadas na tabela 2. As concentrações de MDA não apresentaram efeito de tratamento ou interação tratamento x período ($P > 0,05$), porém os valores reduziram linearmente ao longo do período experimental ($P = 0,0027$).

Na tabela 2 verifica-se que os animais do tratamento SO66 apresentaram maiores concentrações de tióis totais no início do período experimental, porém após 30 dias não verificou-se mais esta diferença. Ainda aos 30 dias, os animais que receberam a dieta SI66 apresentaram médias superiores comparado aos demais tratamentos, e estes animais apresentaram tendência ($P = 0,0605$) em elevar as concentrações de tióis totais

no soro sanguíneo quando comparados aos que receberam selênio levedura. Com 60 dias de experimento, os animais do tratamento SO66 apresentaram maiores concentrações de tióis totais comparados aos animais que receberam a dieta com suplementação de ambas as fontes de selênio, porém não diferiu do grupo CO. Os animais do SO66 continuaram com valores superiores aos demais aos 90 dias, porém diferiram estatisticamente apenas do tratamento SO33. Aos 120 dias, não houve diferença entre as médias pelo teste de Tukey, porém para cães que receberam fontes de selênio orgânico observou-se houve uma tendência de comportamento quadrático, sendo que o tratamento SO66 apresentou a maior média. Os animais do tratamento SI66 apresentaram efeito de período com comportamento quadrático ($P < ,0001$), sendo que a concentração de tióis totais foi maior aos 30 dias de experimento comparada aos demais períodos.

Tabela 2. Concentrações de malonaldeído e tióis totais no soro sanguíneo de cães adultos alimentados com dietas suplementadas com selênio

Item	Dia	CO ¹	Selênio levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs. SI
MDA, µM/L												
	0	8,78	9,6	9,36	9,44	9,00	9,24 A	0,18				
	30	7,87	8,47	8,28	8,21	8,36	8,24 AB	0,20				
	60	7,67	6,74	7,72	5,59	7,12	6,97 C	0,19				
	90	3,74	3,29	5,43	3,35	3,6	3,88 D	0,19				
	120	1,69	2,01	1,71	1,63	1,91	1,79 E	0,11				
	Média	5,95	6,02	6,5	5,64	6,00			NS	NS	NS	NS
	EPM	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19						
	Tratamento	0,4060										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,9058										
Contrastes ⁴												
	L						0,0027					
	Q						NS					
Tióis totais, mM/ml												
	0	0,58 ^b	0,48 ^b	0,75 ^a	0,56 ^b	0,58 ^{bB}	0,59	0,01	NS	NS	NS	NS
	30	0,65 ^b	0,69 ^b	0,65 ^b	0,63 ^b	0,87 ^{aA}	0,70	0,02	NS	NS	0,0605	NS
	60	0,73 ^{ab}	0,56 ^b	0,94 ^a	0,60 ^b	0,63 ^{bB}	0,69	0,02	NS	NS	NS	NS
	90	0,84 ^{ab}	0,62 ^b	0,88 ^a	0,68 ^{ab}	0,68 ^{abB}	0,74	0,02	NS	NS	NS	NS
	120	0,68	0,71	0,76	0,59	0,68 ^B	0,68	0,01	NS	0,0740	NS	NS
	Média	0,70	0,61	0,80	0,611	0,69						
	EPM	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02						
	Tratamento	0,0191										
	Período	0,0193										
	Trat*período	0,0295										
Contrastes ⁴												
	L	NS	NS	NS	NS	NS						
	Q	NS	NS	NS	NS	<,0001						

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴ Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ^{abc} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05). ^{ABC} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Capacidade antioxidante total e poder redutor férrico

Na tabela 3 estão apresentados os resultados de capacidade antioxidante total e o poder redutor férrico, ambas avaliações do perfil antioxidante do sangue periférico dos animais. Os 90 dias de adaptação também não foram suficientes para igualar os valores de CAT no sangue periférico dos animais em estudo, provavelmente devido a diferenças individuais de cada animal. Já, aos 120 dias de experimento, não houve diferença entre os tratamentos para os valores de CAT. Os animais do tratamento SO66 iniciaram o experimento com médias mais altas que os demais de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$), porém aos 30 dias de experimento não houve diferença entre as médias e isto permaneceu até os 90 dias, onde o grupo CO apresentou a maior média em relação aos grupos SO33 e SI66. Avaliando-se os contrastes aos 90 dias de experimento, verificou-se efeito quadrático entre os tratamentos suplementados com selênio orgânico ($P < 0,05$), diferenças entre a fonte orgânica e inorgânica de selênio, e a fonte inorgânica também apresentou média inferior ao tratamento controle. Mas, aos 120 dias não houve diferença estatística entre as médias dos animais, ocorrendo uma tendência ($P = 0,0842$) de efeito quadrático, com reduzida capacidade antioxidante total dos animais alimentados com as dietas SO33 e SO66.

Para o poder redutor férrico houve apenas efeito de período ($< 0,0001$), sendo que os valores de FRAP reduziram linearmente ao longo de período experimental. Porém, os cães do grupo SI66 que receberam dietas com suplementação de selenito de sódio apresentaram tendência ($P = 0,0812$) para médias de FRAP menores que os que receberam fonte de selênio orgânico e o tratamento controle (CO).

Tabela 3. Avaliação da capacidade antioxidante total e do poder antioxidante de redução do ferro em soro sanguíneo de cães adultos

Item	Dia	CO	Selênio levedura			SI66	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs. SI
CAT, µM/ml												
	0	1,50 ^{bB}	1,59 ^{bB}	1,85 ^{aA}	1,57 ^{bAB}	1,51 ^{bAB}	1,60	0,01	NS	0,0184	NS	0,0788
	30	1,85 ^A	1,88 ^A	1,78 ^{AB}	1,75 ^A	1,72 ^A	1,80	0,02	NS	NS	NS	NS
	60	1,50 ^B	1,63 ^B	1,49 ^{BC}	1,46 ^B	1,51 ^{AB}	1,56	0,01	NS	NS	NS	NS
	90	1,57 ^{aB}	1,33 ^{bcC}	1,43 ^{abC}	1,47 ^{abB}	1,26 ^{cB}	1,41	0,01	0,0460	0,0304	0,0375	0,0014
	120	1,46 ^B	1,31 ^C	1,35 ^C	1,49 ^B	1,52 ^{AB}	1,43	0,02	NS	0,0842	NS	NS
	Média	1,57	1,55	1,503	1,55	1,50						
	EPM	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01						
	Tratamento	0,5257										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,0348										
Contrastes ⁴												
	L	0,0249	<,0001	0,0014	NS	NS						
	Q	0,0067	0,0024	NS	NS	NS						
FRAP, µM/ml												
	0	178,76	178,06	202,32	158,75	182,07	179,99 ^A	2,17				
	30	171,35	177,8	157,42	147,64	163,54	163,55 ^B	2,22				
	60	169,35	144,03	176,16	142,63	140,75	154,58 ^B	2,17				
	90	159,28	123,97	144,22	128,65	125,65	136,36 ^C	1,90				
	120	125,81	125,96	133,36	129,9	119,16	126,84 ^C	1,41				
	Média	160,91	149,97	162,69	146,23	141,51			NS	NS	0,0763	0,0916
	EPM	2,87	2,87	2,87	2,87	2,87						
	Tratamento	0,0812										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,1552										
Contrastes ⁴												
	L						<,0001					
	Q						NS					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴ Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ^{abc} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05). ^{ABC} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Determinação de α -Tocoferol e retinol

Os valores de α -Tocoferol e retinol estão apresentados na tabela 4. Não houve efeito de tratamento e interação entre tratamento e período para os valores de α -Tocoferol no sangue de cães adultos ($P>0,05$), mas houve efeito de período, sendo que as maiores médias foram encontradas ao início do experimento e aos 90 dias.

Para os valores de retinol sérico não houve efeito significativo de tratamento, período e interação entre tratamento e período, porém verificou-se uma tendência para efeito de tratamento ($P=0,0620$). Também verificou-se uma tendência de efeito quadrático ($P=0,0689$) para os valores de retinol sérico comparando-se apenas os tratamentos com selênio orgânico, sendo que os cães de tratamento SO66 apresentaram a maior média. Não foi observada diferença pelo contraste entre as fontes, mas o tratamento suplementado com selenito de sódio tende a ser diferente do tratamento controle ($P=0,0837$).

Tabela 4. Concentrações de α -Tocoferol (Vitamina E) e retinol (Vitamina A) no sangue de cães adultos

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs. SI	CO vs. SI
α -Tocoferol, μ M/L												
	0	24,56	30,61	24,80	25,43	16,62	24,81 ^{AB}	0,95				
	30	23,78	30,24	20,43	17,91	16,21	21,71 ^B	1,20				
	60	28,48	23,91	19,53	18,52	16,60	21,41 ^B	0,86				
	90	34,56	22,72	27,88	27,59	17,28	26,00 ^A	0,99				
	120	25,31	15,06	18,61	24,38	14,76	19,62 ^B	0,84				
	Média	27,34	24,51	22,25	22,77	16,69			NS	NS	NS	NS
	EPM	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73				
	Tratamento	0,3906										
	Período	0,0077										
	Trat*período	0,7804										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						NS					
Retinol, μ M/L												
	0	2,3333	1,9583	2,5383	1,535	2,0583	2,0847	0,05				
	30	1,75	2,1817	2,32	2,3617	2,0183	2,1263	0,06				
	60	1,9633	2,0283	2,6	1,815	2,085	2,0983	0,05				
	90	1,8417	1,8533	3,0133	1,94	2,6067	2,251	0,08				
	120	1,8267	1,6917	2,8717	1,83	2,4983	2,1437	0,08				
	Média	1,943	1,9427	2,6687	1,8963	2,2533			NS	0,0689	NS	0,0837
	EPM	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10						
	Tratamento	0,0620										
	Período	0,9128										
	Trat*período	0,7317										
Constrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						NS					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴ Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ^{ABC} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Perfil de glutathionas dependentes e não dependentes de selênio

Na avaliação das glutathionas não foi verificado efeito de tratamento e interação tratamento x período para os grupos estudados (Tabela 5). Para as glutathionas não dependentes de selênio (GSH-t, GSH e GSSG) foi verificado efeito de período ($P=0,0037$, $P<0,001$ e $P<,0001$, respectivamente) com comportamento quadrático dos valores, o que também foi encontrado para a relação entre GSH/GSSG ($P=0,0033$). O perfil da enzima dependente de selênio GSH-Px, ao contrário do esperado, não foi alterado com as inclusões de selênio na dieta, porém sofreu efeito de período ($P<,0001$), sendo que as médias foram maiores ao final do experimento comparado com o período inicial.

Tabela 5. Perfil de glutatonas não dependentes e dependentes de selênio no sangue total heparinizado de cães adultos.

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs SI	CO vs SI
GSH-t, µM/ml												
	0	20,50	19,26	20,27	17,71	18,40	19,23 ^B	2,88				
	30	13,83	12,89	11,58	14,68	12,36	13,07 ^C	2,88				
	60	9,40	10,11	12,82	10,77	12,70	9,78 ^C	2,90				
	90	21,66	23,05	25,23	20,26	22,20	22,48 ^B	2,88				
	120	33,06	44,61	31,28	44,70	35,24	37,75 ^A	2,88				
	Média	20,09	21,96	20,24	20,78	19,64			NS	NS	NS	NS
	EPM	3,17	3,15	3,15	3,15	3,15						
	Tratamento	0,9450										
	Período	<0,0001										
	Trat*período	0,6830										
Contrastes ⁴												
	L						NS					
	Q						0,0037					
GSH, µM/ml												
	0	20,27	19,08	20,07	17,53	18,23	19,03 ^B	2,87				
	30	13,71	12,8	11,48	14,57	12,23	12,96 ^C	2,87				
	60	11,27	10,00	12,73	6,45	9,93	10,08 ^C	2,89				
	90	21,48	22,85	25,01	20,09	22,02	22,29 ^B	2,87				
	120	32,87	44,25	31,04	44,38	35,02	37,51 ^A	2,87				
	Média	19,90	21,80	20,07	20,60	19,49			NS	NS	NS	NS
	EPM	3,15	3,14	3,14	3,14	3,14						
	Tratamento	0,9583										
	Período	<0,0001										
	Trat*período	0,6626										
Contrastes ⁴												
	L						<,0001					
	Q						<,0001					

Continua...

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs SI	CO vs SI
GSSG, µM/ml												
	0	113,87	86,8	99,01	88,39	89,46	95,51 ^B	8,73				
	30	62,92	50,18	49,11	55,49	61,32	55,80 ^C	8,73				
	60	48,59	49,11	45,93	48,05	49,11	48,16 ^C	8,73				
	90	91,04	103,25	109,09	90,52	94,76	97,74 ^{AB}	8,73				
	120	97,42	104,32	120,77	156,34	105,38	116,85 ^A	8,73				
	Média	82,77	78,73	84,79	87,78	80,00			NS	NS	NS	NS
	EPM	9,06	9,06	9,06	9,06	9,06						
	Tratamento	0,8855										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,5499										
Contrastes												
	L						NS					
	Q						<,0001					
GSH/GSSG												
	0	187	222	205	196	198	202 ^B	24				
	30	246	272	233	586	219	251 ^B	24				
	60	223	222	277	104	212	207 ^B	25				
	90	248	223	232	227	239	234 ^B	24				
	120	333	434	281	311	350	342 ^A	24				
	Média	247	275	246	225	243			NS	NS	NS	NS
	EPM	23	23	23	23	23						
	Tratamento	0,1917										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,3373										
Contrastes												
	L						<,0001					
	Q						0,0033					

Continua...

Item	Dia	CO ¹	Seleno levedura ²			SI66 ³	Média	EPM	Contrastes ⁴			
			SO33	SO66	SO99				L	Q	SO vs SI	CO vs SI
GSH-Px, U/g de PT												
	0	81,16	87,70	80,90	84,20	83,95	83,58 ^A	2,23				
	30	77,37	72,00	74,57	69,25	73,37	73,27 ^B	2,27				
	60	59,28	53,81	60,33	65,85	55,01	58,86 ^C	2,24				
	90	85,70	88,88	86,62	86,58	90,88	87,73 ^A	2,23				
	120	67,60	68,95	71,51	70,80	94,85	68,74 ^B	2,24				
	Média	74,22	74,27	74,78	75,33	73,57			NS	NS	NS	NS
	EPM	2,27	2,24	2,24	2,24	2,24						
	Tratamento	0,9795										
	Período	<,0001										
	Trat*período	0,8819										
Contrastes												
	L						NS					
	Q						NS					

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴ Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ^{ABC} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Avaliação do estresse sonoro

Os parâmetros avaliados após o estresse estão apresentados na tabela 6. Não observou-se efeito de tratamento para as concentrações de tióis totais, CAT, FRAP, retinol, GSH-t, GSH, GSSG, GSH/GSSG e GSH-Px.

Os valores de MDA foram maiores para o tratamento SI66 ($P=0,0003$) que diferiu dos demais tratamentos e, isto indica que o selenito de sódio agiu como um pró-oxidante aumentando os produtos da oxidação no soro de cães adultos. Os resultados de MDA para cães em função da inclusão de seleno levedura apresentaram um comportamento quadrático ($P=0,0080$) uma vez que o menor valor de MDA foi dos animais do tratamento SO66. Ao se considerar os contrastes verifica-se diferença entre as fontes de selênio, orgânica e inorgânica ($P<,0001$) e também diferença entre o tratamento CO e SI ($P=0,0010$).

Para os valores de vitamina E (α -Tocoferol) no sangue observam-se maiores concentrações para os tratamentos com inclusão de selênio orgânico ($P=0,0455$), quando comparados aos tratamentos controle e suplementado com selenito de sódio, que não diferiram entre si ($P>0,05$). A análise de contraste entre os valores médios de vitamina E no sangue dos cães que receberam fonte de selênio orgânica (SO) e inorgânica (SI), mostra diferença significativa ($P=0,0323$) com maior valor de vitamina E para cães SO. Os valores de vitamina E aumentaram linearmente ($P=0,0230$) com a inclusão de selênio orgânico na dieta e isto indica que a fonte orgânica de selênio talvez seja mais eficiente em economizar vitamina E do que a fonte inorgânica frente a uma situação de estresse.

Tabela 6. Efeito do estresse sonoro nos parâmetros de avaliação de oxidação no soro sanguíneo de cães adultos

Item	Dia	CO	Selênio levedura			SI66	Tratamento	Contrastes			
			SO33	SO66	SO99			L	Q	SO vs SI	CO vs SI
MDA, $\mu\text{M/L}$		3,38 \pm 0,16 ^{bc}	3,22 \pm 0,16 ^{bc}	2,62 \pm 0,24 ^c	3,56 \pm 0,16 ^b	4,29 \pm 0,16 ^a	0,0003	NS	0,0080	<,0001	0,0010
Tióis totais. mM/ml		0,60 \pm 0,04	0,55 \pm 0,04	0,66 \pm 0,05	0,60 \pm 0,04	0,50 \pm 0,04	0,3278	NS	NS	NS	NS
CAT. $\mu\text{M/ml}$		1,39 \pm 0,09	1,53 \pm 0,09	1,32 \pm 0,10	1,60 \pm 0,09	1,47 \pm 0,09	0,3725	NS	NS	NS	NS
FRAP $\mu\text{M/ml}$		130 \pm 5,8	117 \pm 5,9	115 \pm 6,5	127 \pm 5,8	119 \pm 6,0	0,3990	NS	NS	NS	NS
α -Tocoferol. $\mu\text{M/L}$		14 \pm 2,9 ^b	23 \pm 2,8 ^a	23 \pm 3,1 ^a	25 \pm 2,8 ^a	16,3 \pm 2,9 ^b	0,0455	0,0230	NS	0,0323	NS
Retinol, $\mu\text{M/L}$		2,1 \pm 0,4	2,5 \pm 0,4	2,5 \pm 0,4	1,8 \pm 0,4	2,0 \pm 0,4	0,5598	NS	NS	NS	NS
GSH total, $\mu\text{M/ml}$		67,6 \pm 8,5	67,1 \pm 8,8	78,4 \pm 9,7	50,1 \pm 9,0	75,4 \pm 8,9	0,3110	NS	NS	NS	NS
GSH, $\mu\text{M/ml}$		66,7 \pm 8,5	66,1 \pm 8,7	77,7 \pm 8,8	49,5 \pm 8,9	74,5 \pm 8,8	0,3090	NS	NS	NS	NS
GSSG, nM/ml		428 \pm 51	455 \pm 52	347 \pm 58	341 \pm 56	478 \pm 53	0,3033	NS	NS	NS	NS
GSH /GSSG		159 \pm 14	142 \pm 17	206 \pm 16	154 \pm 15	158 \pm 15	0,0959	NS	NS	NS	NS
GSH-Px, U/ g de proteína		155 \pm 10	124 \pm 11	133 \pm 16	139 \pm 11	149 \pm 10	0,3020	NS	NS	NS	NS

¹CO - dieta basal sem adição de fontes de selênio, totalizando 0,13 ppm de Se; ²SO33 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,33 ppm de Se; SO66 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,66 ppm de Se; SO99 - dieta basal + selênio levedura totalizando 0,99 ppm de Se; ³SI66 - dieta basal + selenito de sódio totalizando 0,66 ppm de Se. ⁴Contrastes polinomiais ortogonais: L = linear; Q = quadrático; SO vs. SI = fontes de selênio orgânico vs selenito de sódio; CO vs. SI = ração basal vs selenito de sódio. ^{abc}Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05).

DISCUSSÃO

O biomarcador mais utilizado para se determinar a oxidação lipídica é o MDA, produto de oxidação mais abundante no organismo presente em células e tecidos (DE ZWART et al., 1999). Apesar de sua importância como marcador do estresse oxidativo para todas as espécies, valores de referência para cães não estão claramente determinados. Encontra-se na literatura valores extremos de MDA entre 1,26 $\mu\text{mol/L}$ (WANDER et al., 1997; MARSHAL et al., 2002) e 380 $\mu\text{mol/L}$ (VAJDOVICH et al., 1997) no soro sanguíneo de cães saudáveis sem considerar a idade e sexo dos animais, sendo que a maioria dos trabalhos apresentam concentrações entre 4 e 30 $\mu\text{mol/L}$ (TODOROVA et al., 2005; PUTAROV, 2010; PASKALEV, M., 2011; FARSAD et al., 2013; BEIGH et al., 2014).

Os valores encontrados neste estudo estão dentro dos valores normais apresentados na literatura e talvez a redução nos valores de MDA ao longo do experimento tenha mostrado uma adaptação dos animais aos manejos de coletas realizados. Todas as fontes e os níveis de selênio estudados foram eficazes em manter os níveis de MDA no soro de cães adultos saudáveis dentro dos valores encontrados na literatura, porém quando os animais foram submetidos ao estresse sonoro ao final do experimento houve diferença entre as fontes de selênio. O selênio levedura foi mais eficiente em manter os níveis de MDA mais baixos em relação ao selenito de sódio e talvez possa ter um controle maior na peroxidação lipídica. Há estudos na literatura que demonstram que as fontes de selênio inorgânico atuam, em algumas situações, como um agente pró-oxidante quando em altas concentrações (MAHAN et al., 1999; FORCEVILLE et al., 2007; XIANG et al., 2009) e que fontes orgânicas não possuem este efeito (SPALLHOZ, 1994; FORCEVILLE et al., 2007). Discute-se que a ação anticancerígena do selênio está relacionada com a propriedade pró-oxidante de alguns compostos que contém selênio e que induzem a apoptose de células cancerígenas através da produção de radicais livres em excesso (SPALLHOZ, 1994; XIANG et al., 2009), porém em animais sadios esta situação não é favorável, pois a produção excessiva de radicais livres também afeta as células do organismo.

Os tióis são importantes antioxidantes que protegem as células dos danos causados pelos radicais livres e estão presentes nos meios extra e intracelulares

(COSTA et al., 2006). O selenito de sódio aumentou mais rapidamente as concentrações de tióis totais, aos 30 dias de experimento, comparado as fontes orgânicas de selênio, porém os animais do tratamento SO66 iniciaram o experimento com níveis mais altos de tióis totais do que os demais. Talvez o aumento de tióis no grupo SI66 possa ser explicado pela ação pró-oxidante de altos níveis de selênio inorgânico, sendo que a ingestão de 0,66 ppm de selênio inorgânico pode ter provocado um estresse oxidativo e a resposta do organismo foi aumentar os níveis de compostos antioxidantes circulantes.

A capacidade antioxidante total também foi alta no início do experimento para os animais do grupo SO66, o que mais uma vez pode ser explicado pela variação individual dos animais e que sugere um maior período de adaptação para estas variáveis. Porém, aos 90 dias de experimento ocorreram diferenças entre as fontes de selênio, sendo que a fonte inorgânica apresentou a menor CAT comparada as demais. Dunstan et al. (2007) avaliou um composto com vários antioxidantes incluindo o selênio e verificou que apesar de aumentar a concentração de selênio no soro de humanos, o composto não aumentou a CAT dos indivíduos. O tratamento controle apresentou maior média de CAT comparado aos demais, o que pode indicar uma adaptação dos animais do tratamento controle frente a baixas quantidades de selênio na dieta, os animais do tratamento controle permaneceram por 7 meses com uma dieta com o mínimo de selênio recomendado. Brummer et al., 2013 avaliando o efeito de fontes de selênio na função imunológica de equinos forneceram por 8,5 meses dieta com baixo selênio antes do início do experimento e concluíram que a ausência de respostas nas variáveis estudadas foi devido a adaptação dos animais em utilizarem baixas concentrações de selênio durante este período.

A maioria dos trabalhos apresentados na literatura demonstram dados com animais que passaram por períodos de deficiência de selênio ou animais doentes, no presente estudo não houve período de depleção e os animais nunca passaram por depleção de nutrientes em suas vidas. Provavelmente há estoques de selênio (FRANKENBERGER e BENSON, 1994; JACQUES, 2001; SIMCOCK et al., 2002; TODD e HENDRIKS, 2005) no organismo do animal e quando em baixas concentrações no soro, o animal mobiliza o selênio para que a homeostase seja mantida.

Os demais marcadores do estresse oxidativo (FRAP, α -Tocoferol e retinol) avaliados neste estudo parecem não sofrer efeitos das fontes e níveis de selênio

adicionadas a dieta de cães adultos saudáveis. Mesmo o α -Tocoferol que atua em parceria com o selênio na proteção antioxidante não sofreu alterações com o experimento.

Estes resultados sugerem que a ingestão da fonte orgânica de selênio apresenta propriedades antioxidantes superiores quando comparadas com alta ingestão de selenito de sódio, porém também mantem o sistema antioxidante em equilíbrio.

O selênio age no sistema antioxidante sendo componente das selenoproteínas, principalmente a GSH-Px, e atua indiretamente ou diretamente evitando o estresse oxidativo. Os níveis de GSH-Px não foram alterados pelos níveis de selênio na dieta, o que difere de muitos estudos encontrados na literatura (BUTLER et al., 1991; IWANIER e ZACHARA, 1995; MAHAN e PARRET, 1996).

A GSH-t, GSH e GSSG tiveram seus valores aumentados a partir dos 90 dias de experimento, o que provavelmente é a resposta do organismo frente ao estresse provocado pela inoculação de SRBC. Os animais receberam as inoculações nos dias 60 e 90 do experimento e, o aumento aos 90 dias é a resposta frente a primeira inoculação e o valor aos 120 dias é a resposta à segunda inoculação, já que a coleta foi realizada sempre antes das inoculações. O organismo quando em condição de estresse aumenta a síntese de GSH para que esta atue junto com a GSH-Px nos hidroperóxidos lipídicos produzidos pelos radicais livres. A GSH-Px funciona convertendo a glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e formando água: $2GSH + H_2O_2 \rightarrow$ ação GSH-Px \rightarrow GSSG + $2H_2O$ (SURAI, 2006). Todos os tratamentos foram eficientes em manter o equilíbrio antioxidante frente a inoculação do SRBC, inclusive a relação GSH/GSSG indica que não houve desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes, pois a relação continuou alta.

Ressalta-se que após o estresse sonoro ao final do experimento também não ocorreram alterações na maioria dos parâmetros estudados, sendo que apenas o MDA e α -Tocoferol tiveram seus valores modificados. A concentração de MDA, como já foi explicado acima, aumentou significativamente no grupo SI66, evidenciando uma possível ação pró-oxidante da fonte inorgânica de selênio. O grupo SO66 apresentou a menor média para concentração de MDA o que sugere que 0,66 ppm de selênio orgânico atue mais adequadamente no sistema antioxidante. Os valores de vitamina E após o estresse mostram que a fonte orgânica de selênio é mais eficiente em economizar

α -Tocoferol que a fonte de inorgânica, e que quanto maior a inclusão de selênio maior será a economia. Isto demonstra o efeito aditivo ou cooperativo que existe entre o selênio e a vitamina E o que já é bem estabelecido na literatura (FINCH e TURNER. 1996; MARIN-GUZMAN et al., 1997; SURAI, 2003).

CONCLUSÃO

Para cães adultos em manutenção ambas as fontes de selênio são eficientes em manter o status antioxidante do animal. Não há benefícios no status antioxidante após a suplementação de selênio o que sugere que 0,11 ppm de Se é adequado para cães em manutenção. O selenito de sódio acima de 0,66 ppm na dieta possui ação pró-oxidante quando cães adultos são expostos a pequenos estresses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNAUD, J., L. FORTIS, S. BLACHIER, D. KIA and A. FAVIER. 1991. Simultaneous determination of retinol, a-tocopherol and b-carotene in serum by isocratic high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 572:103–116
- ARTHUR, J. R., R. C. MCKENZIEY, and G. J. BECKETT. 2003. Selenium in the immune system. *Journal of Nutrition* 133: 1457-1459.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). 2009. Official Publication. Oxford.
- BEIGH, S. A., J. S. SOODAN, R. SINGH, A. M. KHAN; M. A. DAR. 2014. Evaluation of trace elements, oxidant/antioxidant status, vitamin C and β -carotene in dogs with dermatophytosis. *Mycoses*, 57:358-365.
- BRUMMER, M., S. HAYES, A.A. ADAMS, D.W. HOROHOV, K.A. DAWSON and L.M.LAWRENCE. 2013. The effect of selenium supplementation on vaccination response and immune function in adult horses. *Journal of Animal Science*. 91:3702-3715.
- BUTLER, J.A., C.D. THOMSON, P.D. WHANGER, P.D. and M.F. ROBINSON. 1991. Selenium distribution in blood fractions of New Zealand women taking organic or inorganic selenium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53:748-754.

- COHEN, G. and P. HOCHSTEIN. 1963. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 2:1420-1428.
- COSTA, C. M., R.C.C. DOS SANTOS, and E. S. LIMA. 2006. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42:345-350.
- DE-ZWART, L.L., J.H. MEERMAN, J.N.M. COMMANDEUR, and N.P. VERMEULEN. 1999. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:202-226.
- DUNSTAN, J.A., L. BRECKLER, J. HALE, H. LEHMANN, P. FRANKLIN, G. LYONS, S.Y.L. CHING, T.A. MORI, A. BARDEN, and S.L. PRESCOTT. 2007. Supplementation with vitamins C, E, β -carotene and selenium has no effect on antioxidant status and immune responses in allergic adults: a randomized controlled trial. *Clinical & Experimental Allergy* 37:180-187.
- EREL, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37:277-285.
- FARSAD, A.G., M.N. GHARAMALEKI, and G. MOUSAVI, G. 2013. Effects of erythropoietine and oxymetolone coadministration on serum level of malonyldehaldyde, sorbitol dehydrogenase, glutathione reductase, serum creatinine and BUN after kidney ischemic reperfusion in dog. *European Journal of Experimental Biology*, 3:68-72.
- FINCH, J. M. and R.J, TURNER, R.J. 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Research in Veterinary Science*, 60:97-106.
- FORCEVILLE, X., B. LAVIOLLE, D. ANNANE, D. VITOUX, G. BLEICHNER, J.M. KORACH, and E. CANTAIS. 2007. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock: a placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study. *Critical Care*, 11:R73.
- GERARD-MONNIER, D.; I. ERDELMEIER, K. REGNARD, K. N. MOZE-HENRY, J.C. YADAN, and J. CHAUDIERE. 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a

- colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*. 11:1176-83.
- HALLIWELL, B. and J.M.C. GUTTERIDGE. 1989. *Free Radical in Biology and Medicine*. 2ed. Oxford: University Press, 1989. 543p.
- HAUG, A., R. D. GRAHAM, O. A. CHRISTOPHERSEN, and G. H. LYONS. 2007. How to use the world's scarce selenium resources efficiently to increase the selenium concentration in food. *Microbial ecology in health and disease* 19: 209-228.
- HUANG, Z., A. H. ROSE, and P. R. HOFFMANN. 2012. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling* 16: 705-743.
- IWANIER, K. and B.A. ZACHARA. 1995. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoa quality characteristics in subfertile men. *Journal of Andrology*, 16:441-447.
- MAHAN, D.C. and N.A. PARRET. 1996. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. *Journal of Animal Science*. 74: 2967-2974.
- MAHAN, D.C., T.R. CLINE, and B. RICHERT. 1999. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality. *Journal of Animal Science*. 77:2172-2179.
- MARIN-GUZMAN, J. D.C. MAHAN, Y.K. CHUNG, J.L. PATE, and W.F. POPE, W.F. 1997. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *Journal of Animal Science*, 75:2994-3003.
- MARSHALL, R.J., K.C. SCOTT, R.C. HILL, D.D. LEWIS, D. SUNDSTROM, G.L. JONES, and J. HARPER. 2002. Supplemental vitamin C appears to slow racing greyhounds. *The Journal of Nutrition*, 132:1616S-1621S.

- MCBRIDE, T.J., B.D. PRESTON, and L.A. LOEB. 1991. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry*, 30:207-213.
- MEISTER, A. and M.E. ANDERSON. 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52:711-760.
- PAGLIA, D.E. and W.N. VALENTINE. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70:158-9.
- PASKALEV, M. 2011. Relationship between blood malondialdehyde and catalase concentrations and the time of occurrence of non-fixed long bone fractures in dogs. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 14:231-237.
- PUTAROV, T.C. 2010. Avaliação de fontes de selênio e seus efeitos no perfil metabólico e condição reprodutiva de cães. Dissertação (MESTRADO). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 72p.
- RAHMAN, I., A. KODE, and S.K. BISWAS, S.K. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1:3159-3165.
- RAYMAN, M. P. 2000. The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356: 233-241.
- SHARADAMMA, K. C., B. PURUSHOTHAM, P. M. RADHAKRISHNA, P. M. ABHILEKHA, and H. M. VAGDEVI. 2011. Role of selenium in pets health and nutrition: Review. *Asian Journal of Animal Sciences*: 64-70.
- SODA, K., H. TANAKA, and N. ESAKI. 1988. Biochemistry of Selenium Amino Acids. *Trace Nutrients Research*: 1-5.
- SPALLHOLZ, J.E. 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 17:45-64.
- SURAI, P.F. 2003. Selenium-vitamin E interactions: does 1+1 equal more than 2?. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A (Eds) *Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries*.2003. Proceedings... Nottingham University, UK. p.59-76.
- SURAI, P.F. 2006. *Selenium in nutrition and health*. Nottingham: Nottingham University Press. 974p.

- THOMSON, C. D. 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European journal of clinical nutrition* 58: 391-402.
- TODOROVA, I., G. SIMEONOVA, D. KYUCHUKOVA, D. DINEV, and V. GADJEVA. 2005. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comparative Clinical Pathology*, 13:190-194.
- VAJDOVICH, P., T. GAAL, A. SZILAGYI; A. HARNOS. 1997. Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old Beagle dogs. *Veterinary Research Communications* 21: 463-470.
- WANDER, R.C., J.A. HALL, J.L. GRADIN, S.H. DU, and D.E. JEWELL. 1997. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *The Journal of Nutrition*, 127:1198-1205.
- XIANG, N., R. ZHAO, and W. ZHONG. 2009. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63:351-362.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

Pelos resultados obtidos nas condições do presente trabalho, embora não respaldados pela estatística clássica com níveis de significância menor que 5%, mas apresentando várias tendências ($P < 0,10$) de efeitos dos tratamentos, pode-se inferir que o selênio possui ação na proliferação de linfócitos e monócitos como apresentado no capítulo 3, o que pode ser explicado pela influência do selênio no receptor de interleucina 2 (IL-2R) que possui a função de ativar os linfócitos. O fato de não haver na literatura métodos de separação celular, envolvendo gradientes de separação específicos para células caninas e, até mesmo, de mensuração das análises propostas padronizadas para cães, dificultou a execução das análises laboratoriais, além de que para estes testes seria interessante um número maior de repetições por tratamento devido à variação individual de cada animal. Considerando-se as respostas antioxidantes, pode-se destacar uma diminuição das concentrações de MDA sérico de todos os cães ao longo do experimento, à medida que os animais se adaptaram aos manejos experimentais.

Os cães utilizados neste estudo são saudáveis e receberam dietas nutricionalmente balanceadas e completas ao longo de toda sua vida, o que pode ter contribuído para que não houvesse diferença entre os tratamentos. A maioria dos estudos que evidenciam as diferenças entre as fontes e os níveis de selênio nos parâmetros estudados provocam a deficiência de selênio no próprio animal ou em gerações anteriores. Provavelmente, os cães deste estudo possuíam reservas de selênio em seu organismo, o que poderia ter sido verificado por meio do teste de biodisponibilidade e coleta de amostras de sangue, pelo e sêmen para determinação deste micro mineral. O organismo dos cães que receberam dietas com baixas doses de selênio podem ter mobilizado o selênio estocado para que todas as demais funções fisiológicas se mantivessem adequadas frente a situações de estresse. Os animais que receberam dietas com doses maiores de selênio podem ter aumentado a excreção de selênio ou então, os estoques de selênio no organismo.

Estudos com selênio, ou outros elementos traços são de grande importância, pois estes poderão ser o diferencial quando animais forem submetidos a estresses graves.

Porém, a avaliação destes minerais e as metodologias empregas necessitam de maior padronização para que os resultados apresentem maior confiabilidade.