

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS  
Centro de Biotecnologia - CBiot  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM

Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO SELÊNIO SOBRE A NEUROTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE,  
FUNÇÃO LOCOMOTORA E ALTERAÇÕES TECIDUAIS EM RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON  
INDUZIDO POR PARAQUAT**

**JOEL HENRIQUE ELLWANGER**

**Orientador:** Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

**Coorientador:** Prof. Dr. Daniel Prá

Porto Alegre  
Fevereiro de 2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS  
Centro de Biotecnologia - CBiot  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM

**EFEITOS DO SELÊNIO SOBRE A NEUROTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE,  
FUNÇÃO LOCOMOTORA E ALTERAÇÕES TECIDUAIS EM RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON  
INDUZIDO POR PARAQUAT**

**JOEL HENRIQUE ELLWANGER**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador:** Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

**Coorientador:** Prof. Dr. Daniel Prá

Porto Alegre  
Fevereiro de 2015

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariontes (UFRGS), Laboratório de Nutrição Experimental e Laboratório de Histologia e Patologia (ambos da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC) e contou com recursos financeiros e materiais dos três laboratórios.

## AGRADECIMENTOS

De acordo com os acontecimentos que resultaram neste trabalho, agradeço as seguintes pessoas e grupos de forma cronológica:

- **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Isabel Rech Franke**: foi minha primeira referência ao PPGBCM da UFRGS enquanto minha professora no Curso de Nutrição da UNISC. Dessa forma agradeço primeiramente à ela, tanto por despertar meu interesse já durante os primeiros semestres de graduação em cursar mestrado no CBiot, quanto por incentivar e suportar das mais diferentes formas minha jovem carreira científica durante todos esses anos.

- **Prof. Dr. Alexandre Rieger**: querido amigo e um dos meus primeiros professores da graduação. Foi outro importante incentivador de meu ingresso no PPGBCM e apoiador prático de meus projetos de pesquisa desenvolvidos durante os Cursos e Nutrição e Ciências Biológicas.

- **Clara Forres Charlier**: amiga com a qual aprendi as primeiras práticas de laboratório e pessoa com qual compartilho a fascinação pela Ciência.

- **Prof. Dr. Daniel Prá**: fui apresentado ao Prof. Daniel pela Prof.<sup>a</sup> Silvia também durante a graduação em Nutrição e desde lá trabalhamos juntos em diversos projetos de pesquisa. Atualmente meu coorientador, o Prof. Daniel foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação, tanto de forma intelectual quanto logística.

- **Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques**: minhas primeiras referências ao Prof. Henriques foram através da Prof.<sup>a</sup> Silvia, Prof. Daniel e Clara, e sempre tive vontade de ser orientado por um pesquisador do porte acadêmico que ele representa. Dessa forma, sinto-me muito feliz e agradecido por ter usufruído desta orientação. Também agradeço ao Prof. Henriques por ter me acolhido tão bem em seu grupo e fazer todo o possível para incentivar e fazer acontecer minha

formação acadêmica. Além disso, me mostrou que fazer Ciência em nosso país pode ser difícil, mas que devemos trabalhar com seriedade e de forma incansável para que nossos projetos se realizem.

- **Grupo de trabalho coordenado pelo Prof. Henriques:** fui extremamente bem acolhido por todos deste grupo, não podendo deixar de citar a Grethel L. Mejia, a Victoria J. Garcia, a Diana L. Bordin, o Iuri M. de Oliveira, o Cristiano Trindade, a Lyda Espitia-Pérez, o Gabriel Berbigier, o Leonardo Leiria, a Márcia V. Biana, a Miriana S. Machado e a Rose Candido. Porém, não posso deixar de agradecer especialmente à Larissa Milano de Souza e à Michelle de Souza Lima que compartilharam comigo um maior número de almoços e cafés.

- **Dr.<sup>a</sup> Temenouga Nikolova Guecheva e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jenifer Saffi:** desempenharam papéis muito importantes como bons exemplos de pesquisador, além de atuarem como gentis membros de minha comissão de acompanhamento.

- **Professores do PPGBCM:** foram essenciais para reforçar a ideia de que a Ciência deve ser realizada de forma organizada, estruturada, séria, competitiva e com a mais alta qualidade possível. Todas as aulas de disciplinas, discussões e seminários foram extremamente úteis para tais ensinamentos.

- Secretários do CBiot **Sílvia Regina Centeno e Luciano Saucedo:** agradeço por todas as gentilezas e eficiência.

- **Equipe do Laboratório de Histologia e Patologia da UNISC:** todas os bolsistas e estagiários que de alguma forma me auxiliaram durante as tarefas de meu mestrado foram muito importantes para que toda a logística de experimentos e meus períodos em Porto Alegre e Santa Cruz do Sul acontecessem de forma calma e organizada. Entre eles, sou especialmente grato à Danieli R. Dallemole, à Talise E. Müller, à Patrícia Molz, à Ariana P. dos Santos, ao Lucas Cappelletti, à Manoela Gonçalves e à Helen T. da Rosa Silva. Aqui destaco também o papel do

**Prof. Juarez Alaor Schmidt**, exemplo de professor, pessoa progressista e que foi crucial para que eu cursasse o mestrado.

- Minha **mãe Denise** e minha **avó Neide**: fizeram o possível e o inimaginável para incentivar minhas atividades como estudante e possibilitar que eu convivesse com todas as outras pessoas aqui citadas.

Muito obrigado!

## ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 O selênio na natureza e sua importância para a saúde humana .....	16
1.2 Doses recomendadas e fontes alimentares de selênio .....	20
1.3 Influência do selênio sobre doenças humanas .....	24
1.4 Selênio e a doença de Parkinson .....	26
1.5 Doença de Parkinson: características epidemiológicas e sociais .....	28
1.6 Sinais físicos e causas da doença de Parkinson .....	30
1.7 Fisiopatologia da doença de Parkinson .....	33
1.8 Paraquat e doença de Parkinson .....	38
2 OBJETIVOS .....	41
2.1 Objetivo geral .....	41
2.2 Objetivos específicos .....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
3.1 Aspectos éticos .....	42
3.2 Desenho experimental .....	42
3.3 Animais, Ensaio Cometa, Teste da Barra Estreita e administração de selênio e de paraquat .....	43
3.4 Teste da Força de Preensão ( <i>Grip Strength Test</i> ) .....	43
3.5 Teste da Pata Impressa ( <i>Ink Paw Test</i> ) .....	44
3.6 Técnica PIXE .....	45
3.7 Processamento histológico .....	46
3.8 Análise histopatológica .....	47
3.9 Análise histomorfométrica .....	47
3.10 Análise estatística dos resultados .....	48
4 CAPÍTULO I – Artigo de Revisão .....	50
5 CAPÍTULO II – Artigo de Dados Experimentais .....	84

6 RESULTADOS ADICIONAIS .....	92
6.1 Teste da Força de Preensão ( <i>Grip Strength Test</i> ) .....	92
6.2 Teste da Pata Impressa ( <i>Ink Paw Test</i> ) .....	92
6.3 Técnica PIXE .....	93
6.4 Análise histopatológica .....	94
6.5 Análise histomorfométrica .....	98
6.6 Ensaio Cometa com leucócitos e células do encéfalo: análise adicional .....	99
6.7 Resultados do Grupo 5 (Pré-tratamento) .....	101
7 DISCUSSÃO GERAL .....	103
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	113
9 PERSPECTIVAS .....	115
10 REFERÊNCIAS .....	116
11 <i>CURRICULUM VITAE</i> RESUMIDO .....	148



**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES****Abreviaturas:**

DATs - *Dopamine transporters* (Transportadores de dopamina)

DI1, D1 ou Dio1 - *Iodothyronine deiodinase 1* (Iodotironina deiodinase 1)

DI2, D2 ou Dio2 - *Iodothyronine deiodinase 2* (Iodotironina deiodinase 2)

DI3, D3 ou Dio3 - *Iodothyronine deiodinase 3* (Iodotironina deiodinase 3)

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DOPAL - *3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde* (3,4-diidroxifenilacetaldeído)

GPx - Glutathione peroxidase

GPx1 - *Glutathione peroxidase 1* (Glutathione peroxidase 1)

GPx2 - *Glutathione peroxidase 2* (Glutathione peroxidase 2)

GPx3 - *Glutathione peroxidase 3* (Glutathione peroxidase 3)

GPx4 - *Glutathione peroxidase 4* (Glutathione peroxidase 4)

GPx6 - *Glutathione peroxidase 6* (Glutathione peroxidase 6)

H&E - Hematoxilina & Eosina

MPP+ - *1-methyl-4-phenylpyridinium*

MPTP - *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*

MsrB1, SelR ou SelX - *Methionine-R-sulfoxide reductase* (Metionina sulfóxido reductase)

MTH1 - *Human MutT Homolog 1*

MUTY - *DNA glycosylase MutY*

NDB No - *Nutrient Database Number*

OGG1 - *8-oxoguanine DNA glycosylase*

$\beta$ OGG1 -  *$\beta$ -8-oxoguanine DNA glycosylase*

PIXE - *Particle-Induced X-ray Emission*

PQ - Paraquat (denominação geral)

PQ<sup>+</sup> - Paraquat (estado monovalente)

PQ<sup>2+</sup> - Paraquat (denominação divalente)

RDA - *Recommended Dietary Allowances* (Recomendações de Doses Alimentares)

Se - Selênio

SelH - *Selenoprotein H* (Selenoproteína H)

SelI - *Selenoprotein I* (Selenoproteína I)

SelK - *Selenoprotein K* (Selenoproteína K)

SelM - *Selenoprotein M* (Selenoproteína M)

SelN, SEPN1 ou SepN - *Selenoprotein N* (Selenoproteína N)

SelO - *Selenoprotein O* (Selenoproteína O)

SelP - *Selenoprotein P* (Selenoproteína P)

SelS, SEPS1 ou VIMP - *Selenoprotein S* (Selenoproteína S)

SelT - *Selenoprotein T* (Selenoproteína T)

SelV - *Selenoprotein V* (Selenoproteína V)

SelW ou SEPW1 - *Selenoprotein W* (Selenoproteína W)

Sep15 - *15 kDa selenoprotein* (Selenoproteína 15 kDa)

SPS2 - *Selenophosphate synthetase 2* (Selenofosfatase sintetase 2)

TGR, TR2, TrxR3 ou TxnRd3 - *Thioredoxin/Glutathione reductase*  
(Tioredoxina/Glutationa redutase)

TR1, TrxR1 ou TxnRd1 - (Thioredoxin reductase 1) Tioredoxina redutase 1

TR3, TrxR2 ou TxnRd2 - (Thioredoxin reductase 3) Tioredoxina redutase 3

UL - *Tolerable Upper Intake* (Limite Máximo Tolerado)

USA - *United States of America*

### **Símbolos:**

↑ - Conduz a/desencadeia uma via/processo

T - Bloqueia uma via/processo

### **Unidades:**

µg - Micrograma

µm - Micrômetro

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Selenoproteínas de mamíferos, suas abreviaturas, tecidos e compartimentos celulares encontradas e principais funções/ações desempenhadas .....17
- Tabela 2.** Dose recomendada e limite máximo tolerado de Se de acordo com a idade (a partir de 1 ano) .....20
- Tabela 3.** Exemplos de quantidades de Se contidas em alguns alimentos de origem animal e vegetal .....21
- Tabela 4.** Exemplos de doenças nas quais as selenoproteínas estão envolvidas, bem como os papéis desempenhados por elas e os mecanismos envolvidos .....24
- Tabela 5.** Sinais apresentados por indivíduos acometidos pela DP .....31
- Tabela 6.** Alterações histopatológicas pesquisadas em cada órgão analisado ...47
- Tabela 7.** Resultados obtidos através da técnica PIXE .....94

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Possível influência do Se sobre a DP .....	27
<b>Figura 2.</b> Fatores endógenos e exógenos relacionados com o desenvolvimento da DP .....	33
<b>Figura 3.</b> Morte neuronal característica da DP comparando-se a representação da via nigroestriatal de um indivíduo saudável com a de um afetado pela DP .....	35
<b>Figura 4.</b> Possível sequência de eventos que acarretam nos distúrbios de movimento característicos da DP .....	37
<b>Figura 5.</b> Desenho experimental demonstrando os grupos e momentos de realização das principais metodologias usados no estudo .....	42
<b>Figura 6.</b> Exemplo dos registros obtidos através do Teste da Pata Impressa e representação das aferições realizadas .....	45
<b>Figura 7.</b> Sequência das etapas do processamento histológico .....	46
<b>Figura 8.</b> Representação do método utilizado para realizar a análise morfométrica do cerebelo .....	48
<b>Figura 9.</b> Resultados do Teste da Força de Preensão .....	92
<b>Figura 10.</b> Resultados referentes ao Teste da Pata Impressa .....	93
<b>Figura 11.</b> Análise histopatológica do pulmão .....	95
<b>Figura 12.</b> Análise histopatológica do fígado .....	96

<b>Figura 13.</b> Análise histopatológica dos testículos .....	97
<b>Figura 14.</b> Análise histopatológica do cerebelo .....	98
<b>Figura 15.</b> Resultados obtidos através da análise histomorfométrica da camada granular .....	99
<b>Figura 16.</b> Resultados do Ensaio Cometa realizado com leucócitos e células do encéfalo comparando-se apenas o grupo controle (H <sub>2</sub> O) e PQ .....	100
<b>Figura 17.</b> Resultados obtidos do Teste da Barra Estreita (análise do grupo Pré-tratamento) .....	101
<b>Figura 18.</b> Resultados do Ensaio Cometa realizado com leucócitos (análise do grupo Pré-tratamento) .....	102

## APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação inicia com uma **Introdução** sobre a doença de Parkinson e o selênio. Após a apresentação dos **Objetivos**, no item **Materiais e Métodos** são relatadas as bases metodológicas deste trabalho. No **Capítulo I** está apresentado o artigo de revisão intitulado “*Selenium and Parkinson’s disease*”, que será submetido para publicação em uma revista científica indexada internacionalmente. Já no **Capítulo II** encontra-se o artigo intitulado “*Selenium reduces bradykinesia and DNA damage in a rat model of Parkinson’s disease*”, publicado no periódico *Nutrition* e que apresenta alguns dos resultados da parte experimental deste trabalho. No item **Resultados Adicionais** estão apresentados dados obtidos durante os experimentos realizados neste mestrado, mas que não foram incluídos em artigos científicos. Após, em **Considerações Finais**, são descritos aspectos finais e conclusões obtidas com este trabalho. Já no item **Perspectivas** estão apresentadas algumas das possibilidades de experimentos que ainda poderão ser realizados para complementar este estudo. Por último, em **Curriculum Vitae Resumido**, encontra-se atividades acadêmicas e publicações selecionadas pelo autor deste trabalho.

## RESUMO

O selênio (Se) é um nutriente essencial para o funcionamento adequado do organismo humano e também interfere na fisiopatologia de diversas doenças, principalmente daquelas que possuem o estresse oxidativo nas suas bases patológicas. Esse é o caso da doença de Parkinson (DP), que causa diversos distúrbios do movimento e afeta principalmente indivíduos idosos no mundo todo. Além do estresse oxidativo, vários outros fatores contribuem para a patogênese da DP, entre eles a exposição ao pesticida paraquat (PQ). Por causar a morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra do mesencéfalo, que é considerada a neurodegeneração característica da DP, o PQ pode ser utilizado para induzir modelos animais da doença. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é investigar os efeitos do Se sobre a neurotoxicidade, genotoxicidade, função locomotora e alterações teciduais em ratos Wistar submetidos a um modelo experimental da DP induzido por PQ. Ainda, uma ampla revisão bibliográfica sobre os efeitos do Se sobre a DP também foi conduzida. Os principais resultados experimentais deste estudo indicaram que o PQ induziu danos no DNA dos leucócitos dos animais testados, mas não às células do encéfalo, sendo que o uso do Se protegeu contra os danos no DNA encontrados nos leucócitos (dados obtidos com a aplicação do Ensaio Cometa). O PQ causou dano locomotor nos animais, que também foram evitados através do uso do Se (conforme indicou os dados do Teste da Barra Estreita). Com a realização de análises histopatológicas verificou-se que o PQ ocasionou alterações teciduais no tecido pulmonar dos ratos, mas não no fígado, testículos e cerebelo. Os efeitos tóxicos do PQ ao pulmão foram minimizados pelo Se. Através de análise histomorfométrica, não foi encontrada diferença significativa na espessura da camada granular do cerebelo entre os grupos experimentais testados. De forma integrada, os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho associados à pesquisa bibliográfica realizada indicaram que o uso do Se é promissor para combater os efeitos tóxicos do PQ. Ainda, sugeriram que o mineral possui potencial para ser usado no tratamento dietoterápico da DP e em estratégias de prevenção da mesma em indivíduos com histórico familiar da doença.

## **ABSTRACT**

*Selenium (Se) is an essential nutrient for the proper functioning of the human body, and interferes in the pathophysiology of various diseases, particularly those that have oxidative stress in their pathological bases. This is the case of Parkinson's disease (PD), which causes movement disorder and affects mainly elderly individuals worldwide. In addition to oxidative stress, several other factors contribute to the pathogenesis of PD, including exposure to pesticide paraquat (PQ). By causing the selective death of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain, which is considered the characteristic neurodegeneration of PD, PQ can be used to induce animal models of the disease. In this context, the aim of this study is to investigate the effects of Se on neurotoxicity, genotoxicity, locomotor function and tissue changes in Wistar rats submitted to an experimental model of PD induced by PQ. Still, a broad literature review on the effects of Se on PD was conducted. The main experimental results of this work indicated that the PQ induced DNA damage in leukocytes of the animals tested, but not in the brain cells, and the use of Se protected against DNA damage found in leukocytes (data obtained using the Comet Assay). The PQ caused locomotor damage in the animals, which was also avoided by the use of Se (as indicated by the data from Narrow Beam Test). By performing histopathological analysis, it was found that PQ caused injury in the lung tissue of rats, but not in liver, testis, and cerebellum. Se attenuated the toxic effects of PQ to the lung. By histomorphometric analysis, there was no significant difference in the thickness of the granular layer of the cerebellum between the tested experimental groups. In an integrated manner, the results obtained experimentally in this work associated to the performed literature review indicated that the use of Se is promising to combat the toxic effects of PQ. Also suggested that the mineral has the potential to be used in the dietary treatment of PD and in prevention strategies of the disease in individuals with a family history of the PD.*



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O selênio na natureza e sua importância para a saúde humana

Jöns Jacob Berzelius foi um químico sueco que no ano de 1817 descobriu o selênio (Se), que representa o elemento 34 da tabela periódica dos elementos químicos (BOYD, 2011). O Se é considerado um semimetal e em sua forma elementar é encontrado na natureza de forma rara. Durante muito tempo o Se foi conhecido pela sua toxicidade e só em 1957 teve sua importância para o metabolismo celular reconhecida (McLAREN, 1999; MEHDI *et al.*, 2013). Atualmente sabe-se que o Se desempenha um papel importante para o adequado funcionamento celular da maioria dos mamíferos (BOYD, 2011), sendo considerado essencial para a manutenção da saúde humana (RAYMAN, 2012).

No meio ambiente, o ciclo natural do Se envolve a atmosfera, água e solos. Processos de ação humana como a dessulfurização e a queima de carvão, assim como os sistemas de irrigação também influenciam no ciclo global do mineral (WINKEL *et al.*, 2012; MEHDI *et al.*, 2013). Os solos são a fonte do Se que é incorporado na cadeia alimentar. Dessa forma, as quantidades de Se contidas nos alimentos variam de acordo com as quantidades do mineral que haviam no solo onde esses alimentos foram produzidos. Por isso, pessoas que vivem em áreas onde os níveis de Se no solo são baixos são mais vulneráveis a deficiências nutricionais de Se, sendo importante citar que a distribuição do mineral nos solos do mundo é bastante variada (COMBS, 2001). Além de causar susceptibilidade a doenças em determinadas populações, essa diferença na distribuição do Se nos solos do mundo também pode ter papel importante no aparecimento de patologias em algumas regiões específicas. Por exemplo, solos pobres no mineral podem resultar na doença cardíaca conhecida como “Keshan Disease”, endêmica de uma região específica da china (LOSCALZO, 2014), bem como influenciar na evolução de doenças causadas por vírus (HARTHILL, 2011).

De acordo com FAIRWEATHER-TAIT *et al.* (2011), o metabolismo do Se ainda é pouco conhecido quando comparado com o que se sabe do mesmo em relação a outros nutrientes. Porém, as rotas e mecanismo básicos de absorção e metabolismo do mineral já estão descritas. Simplificadamente, a absorção do Se acontece principalmente no duodeno e no ceco e, em humanos, a excreção ocorre principalmente através da urina (MEHDI *et al.*, 2013), sendo que os níveis de Se na urina e no plasma refletem de forma rápida variações no consumo do mineral (HAWKES *et al.*, 2003). Em relação a distribuição de Se no corpo humano, sabe-se que o mineral é acumulado nos órgãos de forma desigual. Entre vinte diferentes tecidos humanos analisados por DICKSON e TOMLINSON (1967), os que apresentaram maiores quantidades de Se (em ordem decrescente) foram os provenientes da glândula tireoide, rim, gônada, músculo, glândula adrenal e fígado.

O Se é parte importante da estrutura de várias enzimas, entre elas as deiodinases, tiroxina redutases e glutathione peroxidases (MEHDI *et al.*, 2013). O conjunto das selenoproteínas, como são chamadas as proteínas que possuem selenocisteína no sítio ativo (HATFIELD *et al.*, 2014), estão apresentadas na Tabela 1, junto com suas abreviaturas, tecidos e compartimentos celulares onde são encontradas e principais funções/ações exercidas. Acredita-se que todos os efeitos desempenhados pelo Se como um nutriente essencial envolvem as selenoproteínas (GANTHER, 1999).

**Tabela 1.** Selenoproteínas de mamíferos, suas abreviaturas, tecidos e compartimentos celulares encontradas e principais funções/ações desempenhadas.

Selenoproteína	Abreviatura (no Inglês)	Tecido	Compartimento celular	Principais funções/ações
<b>Glutathione peroxidase 1</b>	GPx1	Onipresente, altamente expressa em eritrócitos, fígado, rim, pulmão	Citoplasma	Glutathione peroxidase citosólica
<b>Glutathione peroxidase 2</b>	GPx2	Fígado, epitélio do trato gastrointestinal.	Citoplasma	Glutathione peroxidase gastrointestinal
<b>Glutathione peroxidase 3</b>	GPx3	Plasma	Secretada	Glutathione peroxidase plasmática

Continuação da Tabela 1 (parte I).

<b>Glutationa peroxidase 4</b>	GPx4	Testículos	Citoplasma, mitocôndria, núcleo	Fosfolípido hidroperóxido glutaciona peroxidase
<b>Glutationa peroxidase 6</b>	GPx6	Epitélio olfatório, embriões	Secretada	Glutationa peroxidase com ação no epitélio olfatório
<b>Tioredoxina redutase 1</b>	TR1, TrxR1, TxnRd1	Onipresente	Citoplasma, núcleo	Redução da tioredoxina citosólica
<b>Tioredoxina/ Glutationa redutase</b>	TGR, TR2, TrxR3, TxnRd3	Testículos	Citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático, microssomo	Tioredoxina redutase testículo-específica
<b>Tioredoxina redutase 3</b>	TR3, TrxR2, TxnRd2	Onipresente, altamente expressa na próstata, ovário, fígado, testículos, útero, cólon, intestino delgado	Mitocôndria	Redução da tioredoxina e glutarredoxina mitocondrial
<b>Metionina sulfóxido redutase</b>	MsrB1, SelR, SelX	Coração, fígado, músculo, rim	Citoplasma, núcleo	Redução de resíduos de metionina oxidada
<b>Selenofosfatase sintetase 2</b>	SPS2	Fígado	Citoplasma	Síntese de selenofosfatase
<b>Iodotironina deiodinase 1</b>	DI1, D1, Dio1	Fígado, rim, tireoide, glândula pituitária, ovários	Retículo endoplasmático e membrana plasmática	Ativadora do hormônio da tireoide iodotironina deiodinase
<b>Iodotironina deiodinase 2</b>	DI2, D2, Dio2	Tireoide, coração, encéfalo, cordão espinhal, músculo esquelético, placenta, rim, pâncreas	Membrana do retículo endoplasmático	Ativadora tecido-específica do hormônio da tireoide iodotironina deiodinase
<b>Iodotironina deiodinase 3</b>	DI3, D3, Dio3	Placenta, tecidos fetais, pele	Membrana celular e endossomal	Desativadora tecido-específica do hormônio da tireoide iodotironina deiodinase
<b>Selenoproteína N</b>	SelN, SEP1, SepN	Onipresente, abundante no músculo esquelético, encéfalo, pulmão, placenta	Membrana do retículo endoplasmático	Suposto papel durante o desenvolvimento muscular
<b>Selenoproteína P</b>	SelP	Expressa no fígado, coração e encéfalo, secretada no plasma; Encontrada também no rim	Secretada	Transporte de Se
<b>Selenoproteína 15 kDa</b>	Sep15	Altos níveis na próstata e na tireoide; Pulmão, encéfalo, rim	Lúmen do retículo endoplasmático	Suposto papel no "controle de qualidade" do dobramento de proteínas no retículo endoplasmático
<b>Selenoproteína M</b>	SelM	Principalmente no encéfalo; Rim, pulmão e outros tecidos	Região perinuclear, lúmen do retículo endoplasmático, aparato de Golgi	Desconhecido
<b>Selenoproteína K</b>	SelK	Vários tecidos; Abundante no coração	Membrana do retículo endoplasmático	Suposto papel na degradação associada ao retículo endoplasmático
<b>Selenoproteína S</b>	SelS, SEPS1, VIMP	Plasma, vários tecidos	Membrana do retículo endoplasmático	Suposto papel na degradação associada ao retículo endoplasmático

*Continuação da Tabela 1 (parte II).*

<b>Selenoproteína O</b>	SeIO	Vários tecidos	Desconhecida	Desconhecido
<b>Selenoproteína W</b>	SeIW, SEPW1	Vários tecidos, abundante nos músculos	Citoplasma	Desconhecido
<b>Selenoproteína T</b>	SeIT	Onipresente	Retículo endoplasmático, aparato de Golgi	Desconhecido
<b>Selenoproteína H</b>	SeIH	Vários tecidos, principalmente expressa em células embrionárias e tumorais	Núcleo	Desconhecido
<b>Selenoprotein V</b>	SeIV	Testículos	Desconhecida	Desconhecido. Expressão testículo-específica
<b>Selenoprotein I</b>	SeII	Vários tecidos; Abundante no encéfalo	Membrana do retículo endoplasmático	Desconhecido

Fonte: adaptado de KRYUKOV *et al.* (2003), HATFIELD *et al.* (2014) e ROMAN *et al.* (2014).

Conforme mostrado através da Tabela 1, as selenoproteínas distribuem-se pelos mais diversos tecidos e desempenham papéis essenciais para a manutenção da homeostasia corporal. Por isso a deficiência de Se ou injúrias que afetam diretamente as selenoproteínas possuem um grande impacto para a saúde humana. Nesse contexto, polimorfismos em genes das selenoproteínas merecem ser investigados com maior detalhe, pois essas alterações genéticas podem modificar não apenas o estado nutricional de Se, bem como a resposta do organismo a processos patológicos (ROMAN *et al.*, 2014).

Conhecer as interações que as selenoproteínas exercem com outros metabólitos também é importante para melhor entender o efeito do Se sobre distúrbios que afetam a saúde humana (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011). Por fim, deve-se ressaltar que as quantidades de Se ingeridas através da dieta influenciam nas atividades e ações que são atribuídas às selenoproteínas (WEEKS *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013), por isso entender a relação da dieta com o estado nutricional de Se é muito relevante, seja em situações de homeostasia corporal ou quando esta é perturbada durante um processo patológico. Isso possibilitará desenvolver melhores estratégias dietoterápicas para potencializar a ações das selenoproteínas (quando este efeito for necessário) através do manejo do estado nutricional de Se.

## 1.2 Doses recomendadas e fontes alimentares de selênio

Deficiências de Se causam diversos distúrbios no metabolismo corporal saudável (MEHDI *et al.*, 2013). Por outro lado, o mineral em excesso causa toxicidade (SPILLER e PFIEFER, 2007; MÉZES e BALOGH, 2009; MacFARQUHAR *et al.*, 2010). Porém, ainda é difícil definir o que representa um estado nutricional de Se “normal”, mesmo porque os parâmetros adequados para avaliar esse estado também não estão bem definidos (ROMAN *et al.*, 2014). Neste mesmo sentido, também ainda é difícil determinar as recomendações alimentares de Se para cada indivíduo, pois cada pessoa possui suas particularidades quanto a aspectos genéticos e de estado de saúde e doença, fatores que podem fazer variar as necessidades individuais de ingestão do mineral (RAYMAN, 2008).

Apesar das dúvidas a respeito dos níveis ideais de Se para a manutenção da saúde humana, as recomendações em relação às quantidades de Se que devem ser consumidas estão estabelecidas e são relativamente fáceis de serem atingidas. Na Tabela 2 estão apresentados os valores para ingestão recomendada e limite máximo tolerado de Se para indivíduos homens e mulheres a partir de 1 ano de idade.

**Tabela 2.** Dose recomendada e limite máximo tolerado de Se de acordo com a idade (a partir de 1 ano).

Faixa de idade	Recomendações de doses alimentares (RDA, diário)	Limites de ingestão máxima tolerável (UL, diário)
1 – 3 anos	20 µg	90 µg
4 – 8 anos	30 µg	150 µg
9 – 13 anos	40 µg	180 µg
14 – 18 anos	55 µg	400 µg
19 – 30 anos	55 µg	400 µg
31 – 50 anos	55 µg	400 µg
51 – 70 anos	55 µg	400 µg
> 70 anos	55 µg	400 µg

Fonte: IOM (2000). RDA: *Recommended Dietary Allowance*; UL: *Tolerable Upper Intake Level*.

A quantidade de Se presente em uma dieta varia de acordo com os tipos de alimentos consumido e conforme a origem geográfica destes alimentos

(KIELISZEK e BŁAŻEJAK, 2013). Mudanças sazonais, o conteúdo proteico, o processamento e o procedimento de cocção empregados também são fatores que podem influenciar nas quantidades de Se presentes nos alimentos (NAVARRO-ALARCON e CABRERA-VIQUÉ, 2008). Uma dieta na qual o consumo variado de alimentos de origem animal e vegetal está presente é importante para que as recomendações de consumo diário de Se sejam atingidas. Conforme apresentado na Tabela 3, as quantidades do mineral presentes nos alimentos são bastante variadas.

**Tabela 3.** Exemplos de quantidades de Se contidas em alguns alimentos de origem animal e vegetal.

Alimentos de origem vegetal			Alimentos de origem animal		
Alimento	NDB No	Se (µg)	Alimento	NDB No	Se (µg)
Abacaxi	09266	0,10	Carne de frango	05748	40,20
Agrião	11591	0,90	Carne de gado	13806	27,10
Alface	11253	0,60	Carne de peru	05293	25,70
Alho	11215	14,20	Carne de porco	10981	33,70
Banana	09040	1,00	logurte	43261	6,00
Batata	11367	0,30	Leite	01078	2,00
Brócolis	11742	1,60	Manteiga	01001	1,00
Cebola	11282	0,50	Ovo	01128	33,10
Feijão	16005	5,70	Presunto	07028	31,60
Laranja	09200	0,50	Queijo	01026	17,00
Lentilha	16370	2,80	Salmão	15083	31,40
Melancia	09326	0,40	Sardinha	15088	52,70

Fonte: USDA (2014). NDB No: *Nutrient Database Number* (número de referência ao alimento selecionado na tabela). Os valores de Se referem-se a porções de 100g de alimento.

Além dos alimentos apresentados na Tabela 3 merece destaque a castanha-do-Pará (ou “Brazil nut”), que possui quantidades elevadas do mineral em uma pequena quantidade de alimento. Devido ao fato de não precisar de preparo para ser consumida quanto comprada já processada (sem casca) e possuir facilidade de transporte, armazenamento e consumo, esse alimento pode ser considerado uma fonte alimentar natural de Se para ser usada em dietas que visem aumentar o consumo do mineral e o estado nutricional de Se (THOMSON *et al.*, 2008; STOCKLER-PINTO *et al.*, 2010; COMINETTI *et al.*, 2012). Em recente estudo realizado por COLPO *et al.* (2014) também foi demonstrado que o consumo da castanha-do-Pará pode estar associado com a diminuição dos

marcadores inflamatórios Interleucina-1, Interleucina-6, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  e Interferon- $\gamma$ . Também recentemente, em um estudo realizado com pacientes em hemodiálise foi descrito que o consumo de castanha-do-Pará (uma castanha por dia durante três meses) reduziu os indicadores de inflamação, estresse oxidativo e risco aterogênico, além de aumentar a atividade da GPx e defesas antioxidantes nestes pacientes, que podem ser relacionadas com o aumento nos níveis de Se plasmático observado (STOCKLER-PINTO *et al.*, 2014).

FERREIRA *et al.* (2002) relataram que no Brasil os alimentos de origem animal (com destaque para os pescados) são de grande importância para que as doses de Se recomendadas sejam ingeridas, uma vez que os alimentos de origem vegetal comumente consumidos no país possuem teores mais baixos do mineral em comparação com os cárneos. Apesar das carnes serem uma fonte relevante para a ingestão de Se, um estado nutricional adequado do mineral pode ser atingido mesmo sem o consumo deste grupo alimentar, uma vez que De BERTOLI e COZZOLINO (2009) reportaram não haver deficiência de Se no plasma e eritrócitos em um grupo de indivíduos vegetarianos. Essas informações demonstram que apesar dos alimentos de origem animal possuírem Se em maior quantidade em suas composições em comparação aos de origem vegetal, é possível consumir os níveis adequados do Se através de uma alimentação com produtos vegetais. Entretanto, para que isso seja possível presume-se que esse consumo deve ser de alimentos bastante variados, para que assim seja possível suprir as necessidades mínimas do mineral. Os alimentos de origem vegetal industrializados também não devem ser subestimados quanto aos níveis de Se que possuem e podem também ser usados para suprir as necessidades básicas do mineral. Por exemplo, uma porção de 100g de um tipo de cereal matinal comercial pode fornecer 28,90  $\mu\text{g}$  de Se (USDA, 2014 – NDB No 08005).

Pouco se sabe sobre o estado nutricional de Se na população brasileira, mas há evidências de que indivíduos de algumas regiões do país sofrem com a deficiência do mineral (MORAES *et al.*, 2009). Para populações deficientes de Se

nas quais uma dieta variada não é o suficiente para atingir as recomendações de ingestão do mineral, as estratégias sugeridas por LYONS *et al.* (2003) para aumentar o consumo populacional do Se onde este está diminuído na cadeia alimentar mostram-se bastante úteis, sendo elas: 1) aplicar ações de educação nutricional para aumentar o consumo de alimentos ricos em Se; 2) fazer o uso de suplementos de Se; 3) fortificar os alimentos com Se; 4) suplementar os animais utilizados na pecuária; 5) fertilizar as culturas e desenvolver melhoramento das plantas para que essas acumulem mais Se em suas composições.

O uso de alimentos de origem vegetal enriquecidos com Se destaca-se como estratégia a ser usada em grupos de indivíduos suscetíveis a deficiência nutricional de Se. BENTLEY-HEWITT *et al.* (2014) relataram que o consumo de brócolis enriquecido com Se (via fertilização do solo de cultivo com selenato de sódio) pode aumentar os níveis de Se plasmático e melhorar a resposta imune de humanos. Já GIACOSA *et al.* (2014) observaram um aumento nos níveis de Se séricos em indivíduos que consumiram arroz enriquecido com Se (via fertilização foliar usando selenato de sódio). Ainda, é interessante citar que o cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) também se mostrou como um potencial alimento para sofrer enriquecimento com Se (NUNES *et al.*, 2012).

Neste contexto, BERMINGHAM *et al.* (2014), através de metanálise, concluíram que para aumentar a atividade de GPx em diferentes espécies animais é mais vantajoso utilizar alimentos enriquecidos com Se do que fazer uso de selenometionina para esta finalidade. Apesar de alimentos específicos poderem ser usados como uma forma suplementar de Se, é importante lembrar que estudar a biodisponibilidade do mineral, e não apenas sua quantidade no alimento, é de extrema importância para o sucesso deste tipo de suplementação (FINLEY, 2006). De forma geral, estima-se que 80% do Se consumido através dos alimentos é absorvido (NAVARRO-ALARCON e CABRERA-VIQUE, 2008). Já THIRY *et al.* (2013) relataram que a taxa de absorção do nutriente foi de no máximo 14% em três suplementos alimentares estudados (levedura enriquecida com Se, suplemento alimentar baseado em selenato de sódio e suplemento



alimentar baseado em selenito de sódio). A interação do Se com outros nutrientes também deve ser levada em consideração. Sabe-se, por exemplo, que a vitamina B12 aumenta a excreção de Se (GAD e EL-TWAB, 2009). Já a anemia causada pela deficiência de ferro pode aumentar a retenção de Se (DÍAZ-CASTRO *et al.*, 2011). O monitoramento do estado nutricional de Se também é muito importante nessas situações, podendo ser realizado através da análise dos níveis do mineral no sangue total, plasma, soro, urina, cabelo e unhas, tendo cada uma dessa metodologias vantagens e desvantagens específicas que devem ser consideradas (HAYS *et al.*, 2014). Na pesquisa científica, o uso de técnicas analíticas altamente sensíveis, como o *Particle-Induced X-ray Emission* (PIXE) podem ser aplicadas (MOLZ *et al.*, 2014).

### 1.3 Influência do selênio sobre doenças humanas

É fato que o Se exerce papel relevante no metabolismo de diversas doenças que afetam os humanos. O envolvimento do mineral na fisiopatologia de processos patológicos é geralmente através das selenoproteínas como as do grupo da GPx, que por possuírem atividade antioxidante influenciam nas patologias nas quais o estresse oxidativo em níveis elevados é uma das causas ou exerce papel na progressão do processo patológico. Espermatogênese, sinalização por cálcio e função encefálica também são processos que podem ser alterados por desajustes metabólicos de selenoproteínas (ROMAN *et al.*, 2014). Na Tabela 4 são encontradas algumas das principais doenças influenciadas pelo Se através da atividade das selenoproteínas.

**Tabela 4.** Exemplos de doenças nas quais as selenoproteínas estão envolvidas, bem como os papéis desempenhados por elas e os mecanismos envolvidos.

Doença	Selenoproteínas envolvidas	Papeis desempenhados	Mecanismos envolvidos
Distúrbios musculares	SeIN, SeIW	Prevenção	Homeostase da sinalização de Ca <sup>2+</sup>
Doenças cardiovasculares	GPxs, TrxRx, SeIR	Prevenção/mitigação	Defesa antioxidante
	DIO1	Prevenção/mitigação	Fornecimento do hormônio T3 para o metabolismo lipídico
	SeIS	Prevenção	Desconhecido
Hepatopatias	GPxs	Mitigação	Defesa antioxidante
Insuficiência renal	GPxs	Prevenção/mitigação	Defesa antioxidante

Continuação da Tabela 4.

<b>Epilepsia, transtornos de humor</b>	GPxs	Prevenção	Defesa antioxidante
<b>Doenças neurológicas (outras)</b>	SelP, GPxs, TrxRs, SelW, SelH, SelM	Mitigação	Defesa antioxidante
<b>Resposta inflamatória</b>	TrxRs	Promoção	Regulação do início da sinalização celular imunológica
	GPxs	Inibição	Regulação avançada da sinalização celular imunológica
	SelS	Inibição	Defesa antioxidante, regulação de citocinas
<b>Infecção pelo HIV</b>	GPxs, outras	Mitigação	Defesa antioxidante
<b>Diabetes tipo 2</b>	GPxs	Promoção/mitigação	Inibição da sinalização de insulina/Defesa antioxidante
	SelP	Promoção	Inibição da síntese de insulina
	TrxRs	Prevenção/mitigação	Estimulação da sinalização de insulina/Defesa antioxidante
<b>Doenças endócrinas</b>	DIOs	Prevenção	Regulação do metabolismo dos hormônios da tireoide
<b>Infertilidade masculina</b>	GPx4	Prevenção	Defesa antioxidante, suporte estrutural
<b>Câncer</b>	GPxs, SelP, TrxRs	Prevenção	Defesa antioxidante

Fonte: adaptado de ROMAN *et al.* (2014).

Analisando os dados que foram apresentados na Tabela 4, a defesa antioxidante é a forma de atuação do Se que mais se destaca no combate às doenças humanas. É interessante observar que quase em todas as situações as selenoproteínas desempenham um papel benéfico através da prevenção ou mitigação dos processos patológicos. As pertencentes da família da GPx são as mais citadas, talvez por essa ser uma família de enzimas que recebeu bastante atenção dos pesquisadores até o momento. Porém, os papéis exercidos pelas demais famílias de selenoproteínas ainda merecem ser estudados com maior detalhe.

É possível que em situações patológicas as quantidades de Se corporais necessárias sejam superiores do que as normalmente sugeridas (RAYMAN, 2002). Como exemplo, é possível que no tratamento de queimaduras graves doses de até 400 µg de Se/dia sejam adequadas. Já doses entre 60 e 100 µg de Se/dia podem ser recomendadas para indivíduos em estado pós-cirúrgico (SHERKIN, 2009). Nessas situações, o uso de suplementos nutricionais pode ser necessário. Os resultados dos estudos que avaliaram os efeitos do uso do Se sob forma de suplementos variam de acordo com o estado nutricional basal do

mineral, população estudada, níveis de Se consumido, diferenças no metabolismo e fatores genéticos. Isso demonstra o quão complexo pode ser o estudo dos papéis do Se sobre as doenças humanas (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011).

De acordo com o que foi descrito, manter os níveis corporais de Se entre as faixas recomendadas pelo “Institute of Medicine – USA” (IOM, 2000) é bastante benéfico para o combate de um amplo espectro de doenças. Porém, essa faixa representa uma variação bem grande entre o limite mínimo recomendado (RDA) e o máximo tolerado (UL), sendo que estabelecer os valores ideais de Se para o combate de determinadas doenças (mantidos dentro desta faixa) ainda é um amplo objeto de pesquisa a ser explorado.

#### 1.4 Selênio e a doença de Parkinson

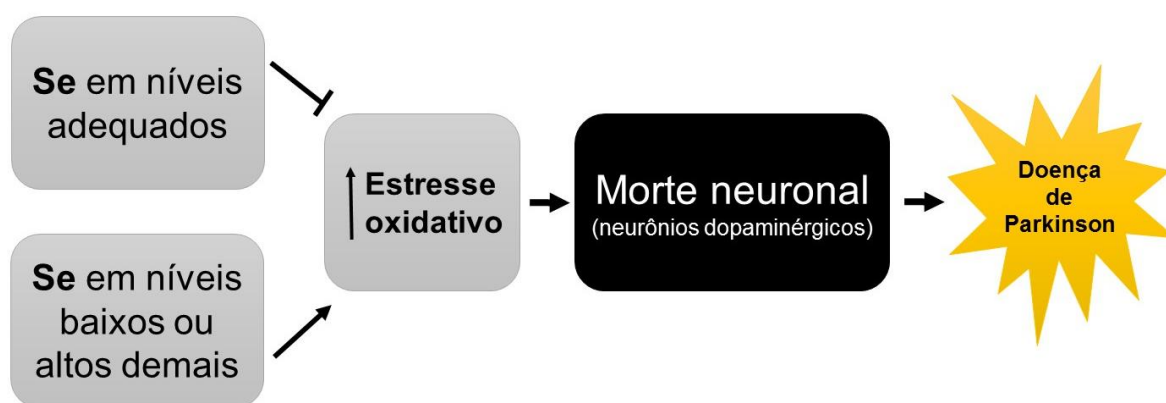
A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa que acomete os movimentos dos indivíduos afetados e desperta bastante atenção da comunidade científica. Uma busca na base de dados “*PubMed*” com o termo “*Parkinson’s disease*” resulta em 76.380 resultados, já uma pesquisa usando o termo “*selenium*” resulta em 27.300 ocorrências de artigos científicos. Porém, uma busca associando os termos “*Parkinson’s disease*” e “*selenium*” resulta em apenas 48 resultados\*. Esse fato demonstra que apesar da doença e do mineral serem muito estudados, a influência do Se especificamente sobre a doença foi pouco explorada. Dessa forma, justifica-se a realização de mais trabalhos com este objetivo, tanto utilizando abordagens experimentais quanto teóricas.

Ainda discute-se se há uma relação direta entre o estado nutricional de Se e a DP. Os estudos que investigaram os níveis de Se em pacientes com DP são poucos e realizaram esta análise utilizando diferentes metodologias. Comparando com indivíduos controles, alguns autores não encontraram diferenças nos níveis de Se em indivíduos com DP (AGUILAR *et al.*, 1998; MISCHLEY *et al.*, 2012; YOUNES-MHENNI *et al.*, 2013). Já outros relataram deficiência de Se (NIKAM *et al.*, 2009) ou, por outro lado, níveis aumentados do mineral também em

\*Pesquisas realizadas em 06 de dezembro de 2014.  
PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

comparação com indivíduos de grupos controle (QURESHI *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2013). Ou seja, uma relação direta entre níveis corporais de Se e a DP ainda não foi estabelecida.

Apesar de ainda não ser possível descrever completamente qual a influência dos níveis corporais de Se sobre a DP a partir de estudo que fizeram este tipo de associação, outras evidências apontam que esta influência existe, pois sabe-se que (I) o estresse oxidativo é uma das principais causas da morte neuronal que ocorre na DP (SEET *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2013; GAKI e PAPAVALASSIOU, 2014) e que (II) o Se pode combatê-la por possuir ação antioxidante (MALDONADO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014), sendo que (III) a atividade neuroprotetora demonstrada pelo Se (LU *et al.*, 2014; ŞENOL *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014) também contribuiu para reforçar essa hipótese. Dessa forma, níveis baixos de Se poderiam ser prejudiciais por não combater as taxas de estresse oxidativo inerentes à doença. Por outro lado, níveis elevados do mineral poderiam contribuir para a patogênese ou progressão da doença por também poderem aumentar este tipo de estresse (ESTEVEZ *et al.*, 2012; LEE e JEONG, 2012; SELVARAJ *et al.*, 2013; GALAN-CHILET *et al.*, 2014). A relação simplificada entre Se, estresse oxidativo e DP está ilustrada na Figura 1.



**Figura 1.** Possível influência do Se sobre a DP. Desbalanços nutricionais de Se estariam relacionados com o aumento do estresse oxidativo, que acarretaria na morte neuronal característica da DP. Níveis adequados do mineral bloqueariam este processo.

Os dados disponíveis até o momento reforçam a necessidade de manter níveis adequados de Se em pacientes que sofrem de DP ou que possuem maior risco para desenvolver a doença, além de tentar esclarecer se doses acima das recomendadas são eficazes na terapia nutricional da DP. Outras informações e uma discussão mais detalhada sobre a interação entre Se e DP serão encontradas no Capítulo I (artigo de revisão) e no Capítulo II (artigo de dados experimentais) desta dissertação.

### **1.5 Doença de Parkinson: características epidemiológicas e sociais**

A DP é uma desordem neurodegenerativa que afeta os movimentos. A DP perpetua o nome de James Parkinson, um médico britânico que em 1817 fez a primeira descrição médica da doença. Já o francês Jean-Martin Charcot foi o responsável por melhor caracterizar a descrição feita em 1817 e divulgar informações sobre DP no mundo, tendo junto com Parkinson um papel de grande importância na história da DP nos anos de 1800 (GOETZ, 2011).

A DP é uma doença neurodegenerativa grave, mas comum. Apenas a doença de Alzheimer ocorre com maior frequência do que a DP (De LAU e BRETELER, 2006). De acordo com PRINGSHEIM *et al.* (2014), a prevalência da doença aumenta de acordo com o aumento da idade. Dessa forma, ocorre comumente em indivíduos idosos. Em termos mundiais, acredita-se que aproximadamente 1% de todas as pessoas com mais de 60 anos sofrem com a DP (NUSSBAUM e ELLIS, 2003; De LAU e BRETELER, 2006). No Brasil a prevalência da doença pode ser considerada similar com a encontrada em países Americanos, Europeus e Orientais. Foi encontrada uma prevalência da DP de 3,3% no país quando 1.186 pessoas com mais de 64 anos foram avaliadas na cidade de Bambuí, no estado de Minas Gerais (BARBOSA *et al.*, 2006).

A origem étnica das pessoas parece possuir uma relação com a incidência da DP. Van Den EEDEN *et al.* (2003) relataram que a doença incide de forma mais elevada em Hispânicos, seguidos (em ordem decrescente) por: Brancos não

Hispanicos, Asiaticos e Negros. Esse dado é bastante importante para o direcionamento de políticas públicas específicas para os grupos étnicos mais afetados pela doença.

Apesar de ser corriqueiramente relacionada a grandes debilitações motoras, a DP não é comumente associada ao risco de morte. Esse conceito é reforçado pelo achado de que a descrição da DP como causa de morte em atestados de óbito ainda não é comum. Porém, a DP deve ser considerada como um importante fator de risco para morte em pessoas idosas e merece maior atenção de profissionais da saúde que trabalham com pacientes neste estágio de vida (BENITO-LEÓN *et al.*, 2014).

A DP causa grande prejuízo econômicos para os países, pois acarreta em gastos com o cuidado dos pacientes e na perda da força de trabalho pelos indivíduos acometidos pela doença (KOWAL *et al.*, 2013). Em um estudo realizado recentemente por ARMSTRONG *et al.* (2014) foi descrito que fatores como saúde mental e tempo de duração da doença contribuem em maior grau para que indivíduos que sofrem da DP deixem a força de trabalho do que propriamente os danos locomotores. Esse dado demonstra que a DP não deve ser considerada como apenas uma doença que afeta a mobilidade dos indivíduos, mas sim como uma situação patológica que pode desestabilizar também a saúde mental dos acometidos e dessa forma afetar demais aspectos nas suas vidas individuais e sociais.

Além da DP ocorrer com maior incidência entre indivíduos do sexo masculino (Van Den EEDEN *et al.*, 2003), os impactos na saúde e bem estar dos pacientes com DP afetam mais homens do que mulheres, sendo que esse maior impacto também acarreta em maiores cuidados destes pacientes (LUBOMSKI *et al.*, 2014). Essa atenção exigida pelos doentes afeta diretamente a rotina familiar ou causa altos gastos financeiros com cuidadores, o que desestabiliza ainda mais a rotina e saúde emocional dos pacientes e seus familiares.

Por fim, mais do que uma condição que causa neurodegeneração e debilita o sistema locomotor, a DP é uma doença que ocasiona grandes problemas sociais. Tanto os indivíduos afetados como seus familiares são impactados com as debilitações impostas pela doença e cuidados que os doentes exigem. Ainda, gastos com o tratamento e força de trabalho perdida impactam também na economia dos países. Dessa forma, a DP deve ser considerada como uma doença neurodegenerativa que implica na desestabilização de diversos aspectos da vida dos afetados e da sociedade e não como apenas um comprometimento locomotor relacionado a indivíduos de idade avançada.

### **1.6 Sinais físicos e causas da doença de Parkinson**

A Tabela 5 apresenta as principais características apresentadas pelos pacientes que são acometidos pela DP. Os sinais descritos nesta tabela interferem em diversas atividades cotidianas dos indivíduos afetados e são usados para realizar o diagnóstico da doença, que é feito clinicamente (GELB *et al.*, 1999; LEES *et al.* 2009), uma vez que não há exame bioquímico/laboratorial para estabelecer se uma pessoa sofre ou não da DP (JANKOVIC, 2008). Com isso, o exame neuropatológico pós-morte é a única maneira de confirmar se uma pessoa realmente sofria ou não da DP (GELB *et al.*, 1999; NUSSBAUM e ELLIS, 2003; SIGN, 2010). É possível que testes genéticos e exames de neuroimagem possam ser utilizados na rotina clínica para melhorar o diagnóstico de DP (JANKOVIC, 2008).

**Tabela 5.** Sinais apresentados por indivíduos acometidos pela DP.

Sinais comumente apresentados	Outros sinais apresentados em alguns casos
<b>Acinesia:</b> movimentos pausados, dificuldade em iniciar os movimentos	<b>Camptocormia:</b> flexão severa do tronco
<b>Bradicinesia:</b> realização dos movimentos de forma lenta	<b>Congelamento de marcha:</b> súbitas interrupções no ciclo da marcha
<b>Hipocinesia:</b> movimentos pausados, redução da amplitude dos movimentos	<b>Dificuldade para realizar ações simultâneas</b>
<b>Instabilidade postural:</b> recuperação prejudicada quando o equilíbrio é perturbado	<b>Disartria:</b> fala arrastada
<b>Postura curvada</b>	<b>Disfagia:</b> dificuldade de deglutição
<b>Rigidez muscular:</b> resistência aumentada ao movimento articular	<b>Distonia:</b> postura anormal de uma parte do corpo
<b>Tremor em repouso</b>	<b>Marcha embaralhada/arrastada com passos curtos</b>

Fonte: adaptado de MAZZONI *et al.* (2012).

Apesar das características da DP serem bastante conhecidas, ainda pergunta-se: quais são as causas da doença? Essa pergunta possui múltiplas respostas e que variam de acordo com o contexto no qual o paciente que sofre da DP encontra-se, levando-se em consideração fatores físicos do indivíduo e o ambiente onde ele vive. Dessa forma, acredita-se que a resposta para a pergunta é que a causa da DP é multifatorial, sendo o resultado de uma interação entre fatores genéticos e ambientais (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; CHAI e LIM, 2013; SEARLES NIELSEN *et al.*, 2013; PETERSON, 2014; PRINGSHEIM *et al.* 2014; STELMASHOOK *et al.*, 2014). Contudo, é necessário investigar cada caso de DP para entender quais foram os elementos que a acarretaram, pois esses envolvem diversos genes e múltiplos fatores do ambiente que variam de acordo com o paciente. Por isso, conhecê-los é essencial.

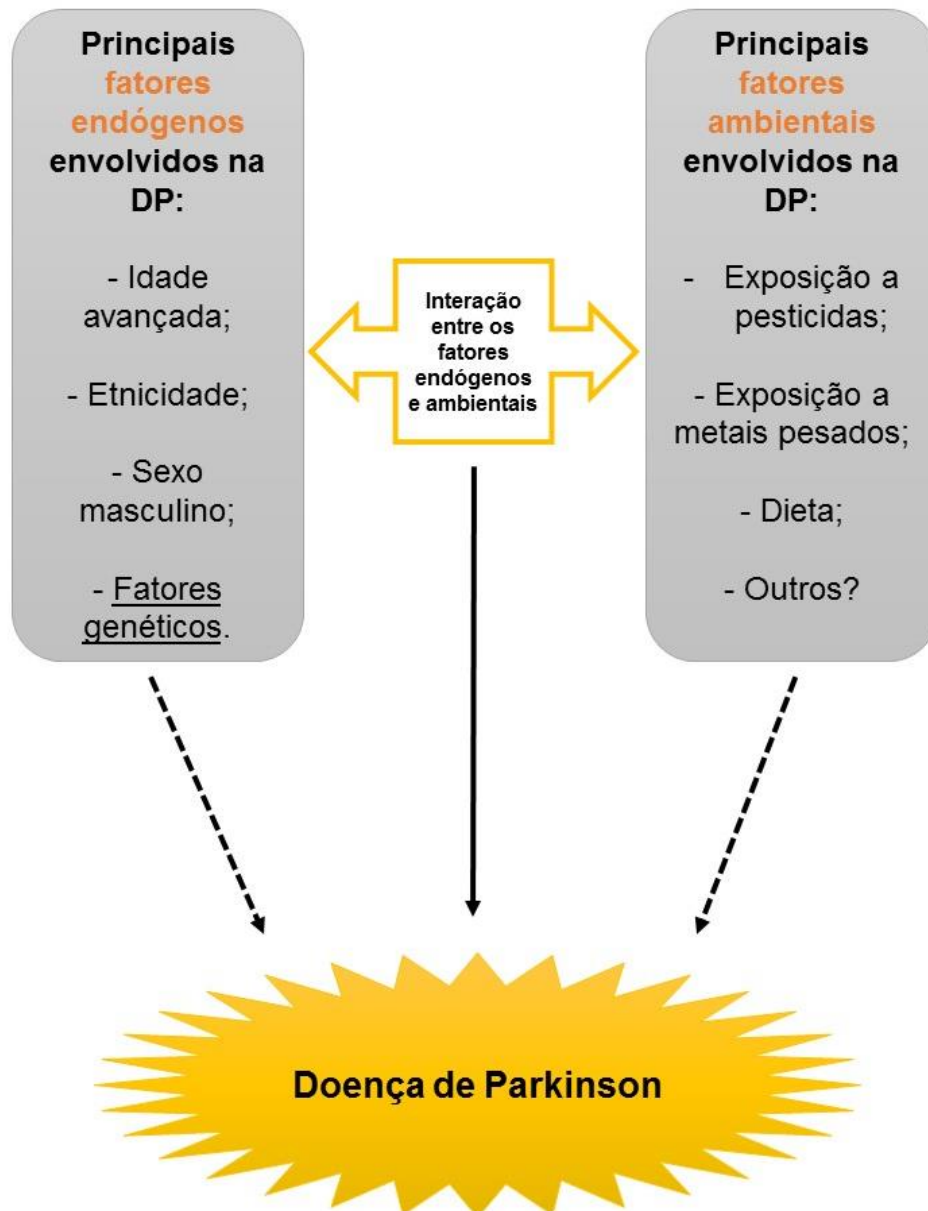
Fatores genéticos específicos podem acarretar em um maior risco para o desenvolvimento da DP. Vários são os estudos que investigaram o papel de genes específicos na doença, sendo alguns dos mais conhecidos: *DJ-1*, *SNCA*, *Parkin (Park2)*, *Pink1 (Park6)*, *Park13* e *LRRK2* (ABDULLAH *et al.*, 2014). Conforme já citado anteriormente, além das características genéticas, outros fatores endógenos como etnicidade (Van Den EEDEN *et al.*, 2003) e pertencer ao sexo masculino (Van Den EEDEN *et al.*, 2003; LUBOMSKI *et al.*, 2014) também parecem ter relação com uma maior chance para desenvolver a DP, além de



idade avançada, um clássico fator de risco para a doença (ABDULLAH *et al.*, 2014; PRINGSHEIM *et al.*, 2014).

Os fatores exógenos também devem ser considerados. Evidências indicam que a exposição a metais pesados (Di MONTE *et al.*, 2002; ABDULLAH *et al.*, 2014) e a pesticidas (ASCHERIO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011; BALTAZAR *et al.*, 2014) são importantes fatores causais da DP, sendo que alguns trabalhos também demonstram existir uma influência de fatores dietéticos no aparecimento da doença (LOGROSCINO *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2014; KAMEL *et al.*, 2014). Demais fatores ambientais que podem estar relacionados com a DP também estão sendo estudados. Neste contexto, é bastante interessante citar o estudo de ROMEO *et al.* (2013), que suporta a hipótese da relação entre exposição a elevada poluição luminosa e maior risco para o desenvolvimento da DP.

Apesar da interação entre os fatores endógenos e exógenos ser o mais provável acontecimento que acarreta na DP, é importante ressaltar que fatores endógenos ou exógenos, separadamente, e dependendo de sua intensidade, podem provocar sozinhos a doença. Na Figura 2 encontra-se um resumo dos principais fatores relacionados com o desenvolvimento da DP.



**Figura 2.** Fatores endógenos e exógenos relacionados com o desenvolvimento da DP. Acredita-se que a principal causa da DP é o resultado de uma interação entre os dois grupos de fatores, apesar de ser possível que os fatores, isoladamente, possam causar a doença. Entre os fatores endógenos, destaca-se a influência de características genéticas na patogênese da DP.

### 1.7 Fisiopatologia da doença de Parkinson

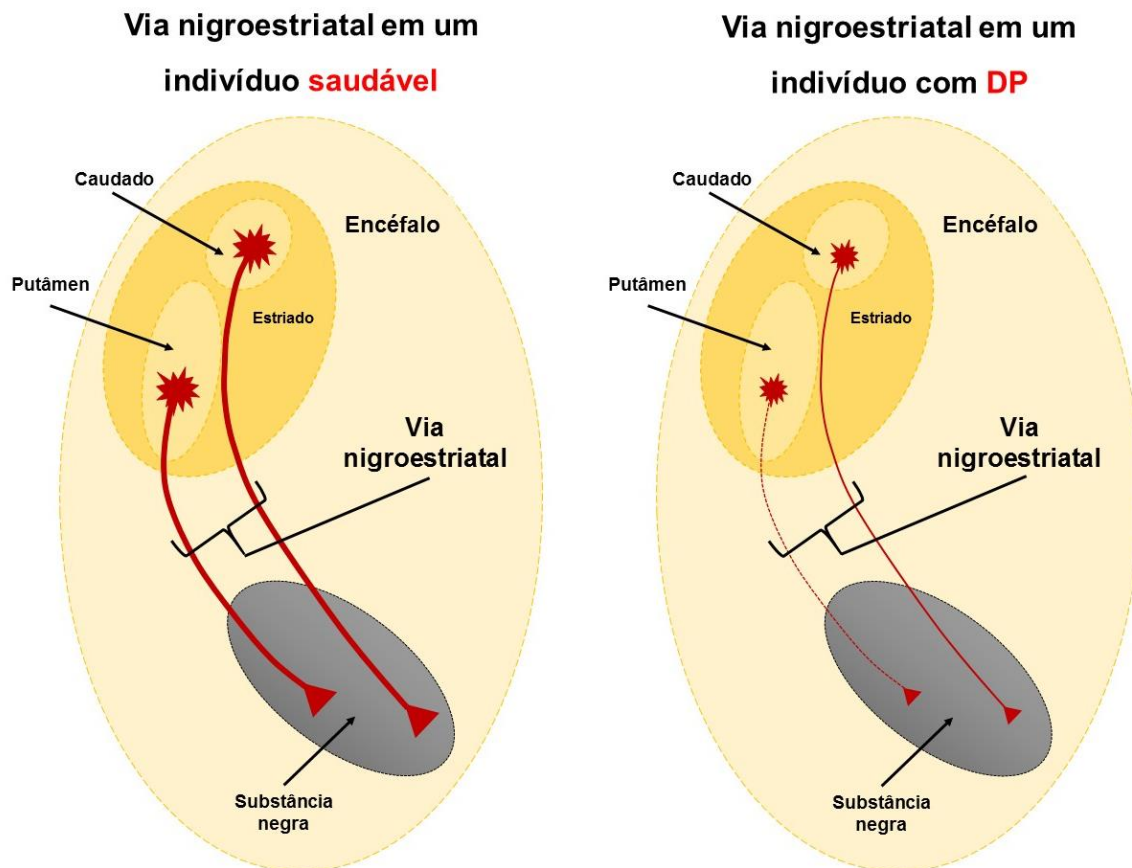
Apesar dos prováveis fatores causais da DP já serem conhecidos, conforme descritos no tópico anterior, ainda não está completamente esclarecido como esses fatores interagem na fisiopatologia da DP, ou seja, a patogênese da doença ainda não é completamente entendida (LIM e ZHANG, 2013). Entretanto,

várias evidências indicam que o estresse oxidativo é um dos principais eventos moleculares que acarretam na morte neuronal característica da DP (DIAS *et al.*, 2013; HWANG, 2013; LeWITT *et al.*, 2013; GAKI e PAPAVALASSILOU, 2014; KIRBAS *et al.*, 2014). Esse dado é bastante coerente, uma vez que sabe-se níveis aumentados de estresse oxidativo estão relacionados com idade avançada (JUNQUEIRA *et al.*, 2004; MARIANI *et al.*, 2005; SCHÖTTKER *et al.*, 2014), desbalanços dietéticos (especialmente em relação aos nutrientes antioxidantes) (FANG *et al.*, 2002; SIES *et al.*, 2005; Da COSTA *et al.*, 2012), rompimento da homeostasia corporal de metais (GAETKE e CHOW, 2003; LEONARD *et al.*, 2004; VALKO *et al.*, 2005; JOMOVA e VALKO, 2011; ŚCISKALSKA *et al.*, 2014) e exposição a pesticidas, conforme demonstrado por diferentes abordagens experimentais (ABDOLLAHI *et al.*, 2004; KOUREAS *et al.*, 2014; OJHA e SRIVASTAVA, 2014).

É provável que os fatores genéticos (e dessa forma os de etnicidade e em relação ao sexo) estejam interligados com a DP através de outros eventos moleculares que não aos altos níveis de estresse oxidativo. Por exemplo, sabe-se que as diferenças em relação aos sexos influenciam a fisiopatologia de doenças que afetam o movimento, pois os hormônios e cromossomos sexuais interferem na fisiologia dos gânglios da base e do sistema dopaminérgico (SMITH e DAHODWALA, 2014). Com isso, é pertinente ressaltar que os pesquisadores devem levar em consideração esses fatores em trabalhos futuros que avaliem a fisiopatologia da DP em humanos.

Neste trabalho a influência do estresse oxidativo na patogênese da DP será destacada. Sabe-se que a partir do aumento do estresse oxidativo ocorre a morte celular característica da DP, que acredita-se ocorrer por processos de morte celular programada (ADAMS *et al.*, 2001; VENDEROVA e PARK, 2012), apesar de indícios de morte por necrose também serem relatados (PERIER *et al.*, 2012). As células mais afetadas são os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, que correspondem aos neurônios que possuem seus corpos celulares localizados na substância negra *pars compacta* do mesencéfalo e que

projetam seus axônios aos gânglios da base caudado e putâmen, localizados no corpo estriado, sendo as células que projetam-se ao putâmen as mais afetadas (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; MOORE *et al.*, 2005; DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2006). A Figura 3 apresenta de forma esquemática a morte neuronal que ocorre na DP.



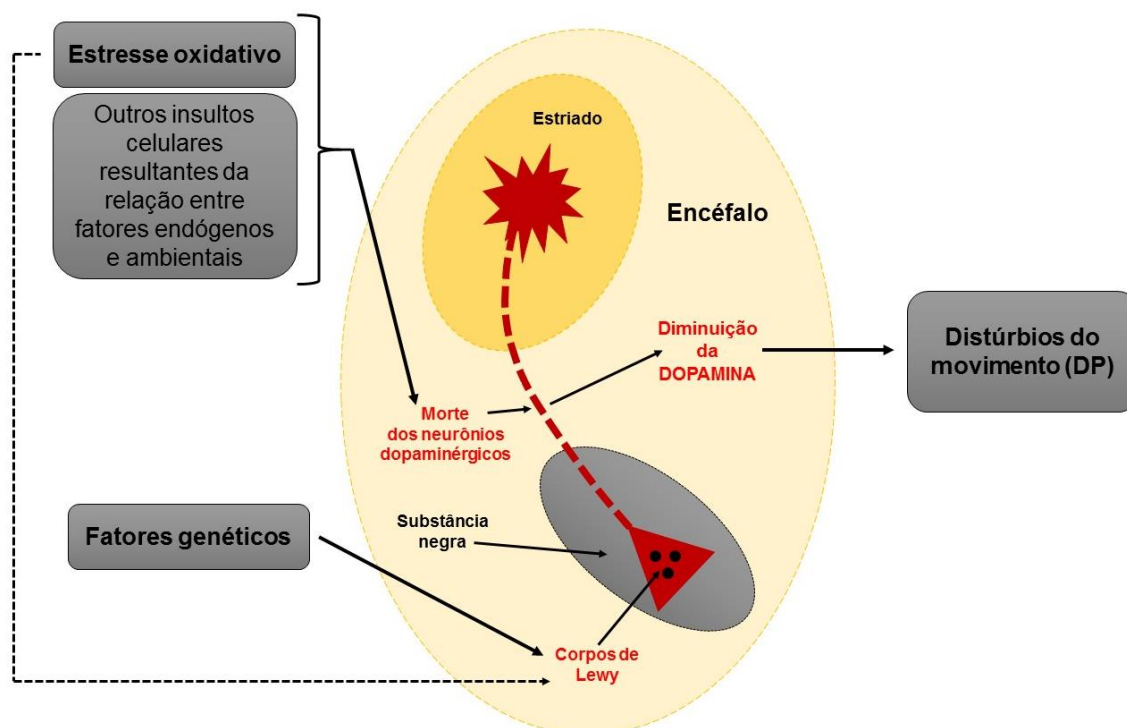
**Figura 3.** Morte neuronal característica da DP comparando-se a representação da via nigroestriatal de um indivíduo saudável com a de um afetado pela DP. Os neurônios que morrem na DP (em vermelho) estão apresentados de forma mais fina do que os apresentados na via nigroestriatal de um indivíduo saudável, sendo os que se projetam da substância negra ao putâmen os mais afetados (tracejado). Fonte: adaptado de DAUER e PRZEDBORSKI (2003). Os neurônios dopaminérgicos contêm grande quantidade de neuromelanina (BARZILAI e MELAMED, 2003), o que explica a coloração escura observada na região da substância negra.

De acordo com BARZILAI e MELAMED (2003), a DP se manifesta quanto uma quantidade aproximada de 50 a 70% dos neurônios dopaminérgicos morreram. Ainda segundo os mesmos autores, a diminuição do número de

neurônios dopaminérgicos acontece naturalmente durante a vida. Com isso, indivíduos que nascem com uma quantidade destas células inferior a normal seriam mais suscetíveis ao desenvolvimento da DP.

A presença das inclusões citoplasmáticas compostas por agregados proteicos e chamadas de Corpos de Lewy também são características clássicas na fisiopatologia da DP (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; DICKSON, 2012). Estas inclusões citoplasmáticas são compostas principalmente pela proteína  $\alpha$ -sinucleína, comumente encontrada em grandes quantidades nos terminais axonais (ANDERSEN, 2004; SHULTS, 2006; HENCHCLIFFE e BEAL, 2008; BREYDO *et al.*, 2012). Os Corpos de Lewy podem ser causados por influências genéticas (FARRER, 2006; BRANCO *et al.*, 2010). Porém, há evidências de que também podem ser formados em decorrência do estresse oxidativo (ANDERSEN, 2004; KAUR e ANDERSEN, 2004; FRIEDLICH *et al.*, 2009).

Esses eventos celulares são os principais processos observados na neurodegeneração característica da DP. Em razão da dopamina ser um neurotransmissor essencial para o adequado funcionamento da função locomotora (MONEY e STANWOOD, 2013; SHARPLES *et al.*, 2014; YIN, 2014), essa morte neuronal e consequente redução de dopamina explicam os distúrbios locomotores característicos da DP. Com isso, o tratamento dos sinais da DP é realizado através da reposição desse neurotransmissor através do uso do medicamento Levodopa, mas ainda não há cura para a doença (LEES *et al.*, 2009; DEXTER e JENNER, 2013). Na Figura 4 está representado de forma simplificada a ordem dos eventos que ocasionam os distúrbios de movimento observados na DP.



**Figura 4.** Possível sequência de eventos que acarretam nos distúrbios de movimento característicos da DP. Nesta representação, apenas um neurônio é apresentado, sendo que a estrutura básica da figura foi adaptada de DAUER e PRZEDBORSKI (2003), já as sequências de eventos descritas são o resultado das interpretações do autor a partir dos trabalhos revisados. Objetivando integrar os principais eventos neuropatológicos da DP, nesta figura também estão representados os Corpos de Lewy.

Os neurônios dopaminérgicos são naturalmente suscetíveis à geração de altos níveis de estresse oxidativo. Além do estresse oxidativo gerado no encéfalo em decorrência da sua elevada taxa metabólica (MAGISTRETTI e PELLERIN, 1996; JEPPESEN *et al.*, 2011; SYROKA *et al.*, 2013), de acordo com ADAMS *et al.* (2001), alguns dos principais mecanismos pelos quais radicais de oxigênio são formados nas células dopaminérgicas são: (I) a enzima tirosina hidroxilase, responsável pela produção de dopamina pode formar radicais de oxigênio envolvendo o cofator tetrahidrobiopterina; (II) a dopamina presente nos neurônios pode ser oxidada a monoamina oxidase e formar radicais de oxigênio, além do metabólito 3,4-diidroxifenilacetaldeído (DOPAL); (III) o DOPAL pode ser oxidado pela aldeído desidrogenase e formar radicais de oxigênio e ácido 3,4-diidroxifenilacético.

Dessa forma, enquanto todas as demais células do corpo são injuriadas pelo estresse oxidativo que causa danos a diversas biomoléculas (fosfolipídios, DNA, etc.) de uma forma esperada e relativamente fácil de ser controlada através dos mecanismos de mitigação, como por exemplo através da reparação de DNA (CHRISTMANN *et al.*, 2003; FRIEDBERG, 2003; SANCAR *et al.*, 2004), os neurônios dopaminérgicos precisam suportar as elevadas quantidades de moléculas agressoras geradas naturalmente, além disso, não conseguem remover de forma efetiva os radicais de oxigênio, morrendo com maior facilidade (ADAMS *et al.*, 2001). Por isso, essa agressão celular causa mais impactos neste tipo celular do que nos demais. Essas informações ajudam a explicar porque a DP pode se manifestar antes de demais doenças que também possuem o estresse oxidativo em suas bases patológicas.

Entender a patogênese da PD ajudará a desenvolver melhores estratégias para o tratamento da doença (DICKSON *et al.*, 2009). Porém, em razão das diversas interações existentes entre os possíveis fatores causais da DP, como o estresse oxidativo, os futuros estudos devem cada vez mais estar estruturados em abordagem abrangentes, que avaliem como os mais diferentes fatores endógenos e exógenos interferem nas vias que acarretam na morte dos neurônios dopaminérgicos e formação dos Corpos de Lewy.

### **1.8 Paraquat e doença de Parkinson**

Na década de 1980 foi descrito por LANGSTON *et al.* (1983) o caso de quatro jovens que desenvolveram sinais da DP após fazerem uso injetável de uma droga ilícita então conhecida como uma nova “heroína sintética”, adquirida no estado da Califórnia, USA. Através de análises laboratoriais posteriores de amostras da droga foi demonstrado que a substância usada continha o “1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine”, conhecido comumente como “MPTP”. A partir desses achados foi sugerido pelos autores que o MPTP causaria a destruição seletiva dos neurônios dopaminérgicos. Atualmente já está estabelecido que o MPTP possui a capacidade de ultrapassar a barreira

hematoencefálica, ser distribuído no encéfalo pelos astrócitos e causar a destruição seletiva dos neurônios dopaminérgicos (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Por possuir essa seletividade pode ser utilizado para recriar a DP experimentalmente em modelos animais (SMEYNEA e JACKSON-LEWIS, 2005).

O paraquat (PQ) é um herbicida comumente utilizado em todo mundo, e possui vários benefícios para a agricultura (BROMILOW, 2003). A estrutura química do PQ é muito similar com a estrutura do MPP+, que é descrito como o metabólito ativo do MPTP (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Assim como o MPTP, o PQ pode entrar no sistema nervoso central (DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2006) e causar a destruição seletiva dos neurônios dopaminérgicos. Com isso, dois tópicos importantes em relação ao PQ destacam-se na literatura biomédica: (I) seu uso, assim como o do MPTP, no desenvolvimento de modelos animais da DP e (II) seu potencial de causar a DP em indivíduos expostos a ele de forma acidental, ocupacional ou intencional (neste caso, geralmente em tentativas de suicídio).

O modelo da DP induzido por PQ é aceito e utilizado por diversos autores, sendo comumente desenvolvido em roedores (THIRUCHELVAM *et al.*, 2000; McCORMACK *et al.*, 2002; THIRUCHELVAM *et al.*, 2003; OSSOWSKA *et al.*, 2005; OSSOWSKA *et al.*, 2006; SOMAYAJULU-NIȚU *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2013). É possível que a seletividade do PQ pelos neurônios nigroestriatais aconteça por ele facilmente entrar nestas células através dos transportadores de dopamina (DATs), que usam o PQ como um substrato (RAPPOLD *et al.*, 2011), processo muito similar pelo qual o MPP+ entra nos neurônios dopaminérgicos, que possui alta afinidade com os DATs (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Entretanto, é importante citar que a entrada do PQ na célula auxiliada pelos DATs acontece quando o PQ é convertido de seu estado divalente nativo (PQ<sup>2+</sup>) para seu estado monovalente (PQ<sup>+</sup>) (RAPPOLD *et al.*, 2011). Dentro da célula o PQ gera radicais superóxido e espécies reativas relacionadas a dopamina, desencadeando a neurotoxicidade (RAPPOLD *et al.*, 2011). Ainda, de acordo com



QI *et al.* (2014), o PQ interfere na produção da dopamina e sua distribuição entre os compartimentos celulares.

Através deste modelo experimental da DP induzido por PQ uma série de questionamentos podem ser avaliados experimentalmente. Por exemplo, além de ser possível testar condições relacionadas especificamente com a DP, como a morte dos neurônios dopaminérgicos (BROOKS *et al.*, 1999; KUTER *et al.*, 2007), pelo PQ ser um composto utilizado na agricultura em todo mundo, os animais submetidos ao modelo também servem para o estudo toxicológico relacionado aos efeitos sistêmicos do PQ.

Em humanos, a relação entre a exposição ao PQ e a DP foi demonstrada por diversos autores (CICCHETTI *et al.*, 2005; DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2006; TANNER *et al.*, 2011; KAMEL, 2013). Porém, apesar dessas informações serem bastante relevantes, é importante considerar que através de aplicações de forma correta e utilizando aparelhos de proteção individual a aplicação de pesticidas é tradicionalmente considerada segura.

Por fim, o PQ pode ser considerado um composto bastante controverso. Na agricultura é muito útil como herbicida. Na ciência biomédica é considerado um ótimo agente para auxiliar nos estudos envolvendo a DP. Entretanto, a exposição a ele pode ser considerada um fator de risco para a DP que não deve ser negligenciado. Dessa forma, o PQ precisa ser utilizado com cautela, tanto por cientistas como por pessoas que o manipulam em seus cotidianos de trabalho.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar os efeitos do Se sobre a neurotoxicidade, genotoxicidade, função locomotora, força e alterações teciduais em ratos Wistar submetidos a um modelo experimental da DP induzido por PQ.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Discutir a respeito da influência do Se sobre a DP através de revisão da literatura;

- Avaliar parâmetros locomotores dos animais submetidos ao modelo experimental da DP com o Teste da Barra Estreita e Teste da Pata Impressa;

- Investigar possível alteração na força dos animais usando o Teste da Força de Preensão;

- Quantificar os níveis de danos no DNA de leucócitos e células do encéfalo dos animais usados no experimento através do Ensaio Cometa;

- Verificar possíveis diferenças nos níveis de Se no sangue e encéfalo entre os grupos de animais avaliados utilizando a técnica PIXE;

- Analisar possíveis alterações celulares e teciduais no pulmão, cerebelo, fígado e testículos causadas pelo PQ nos animais submetidos ao modelo experimental através de análise histopatológica;

- Mensurar a espessura da camada granular do cerebelo dos animais utilizando no experimento através de procedimentos histomorfométricos.

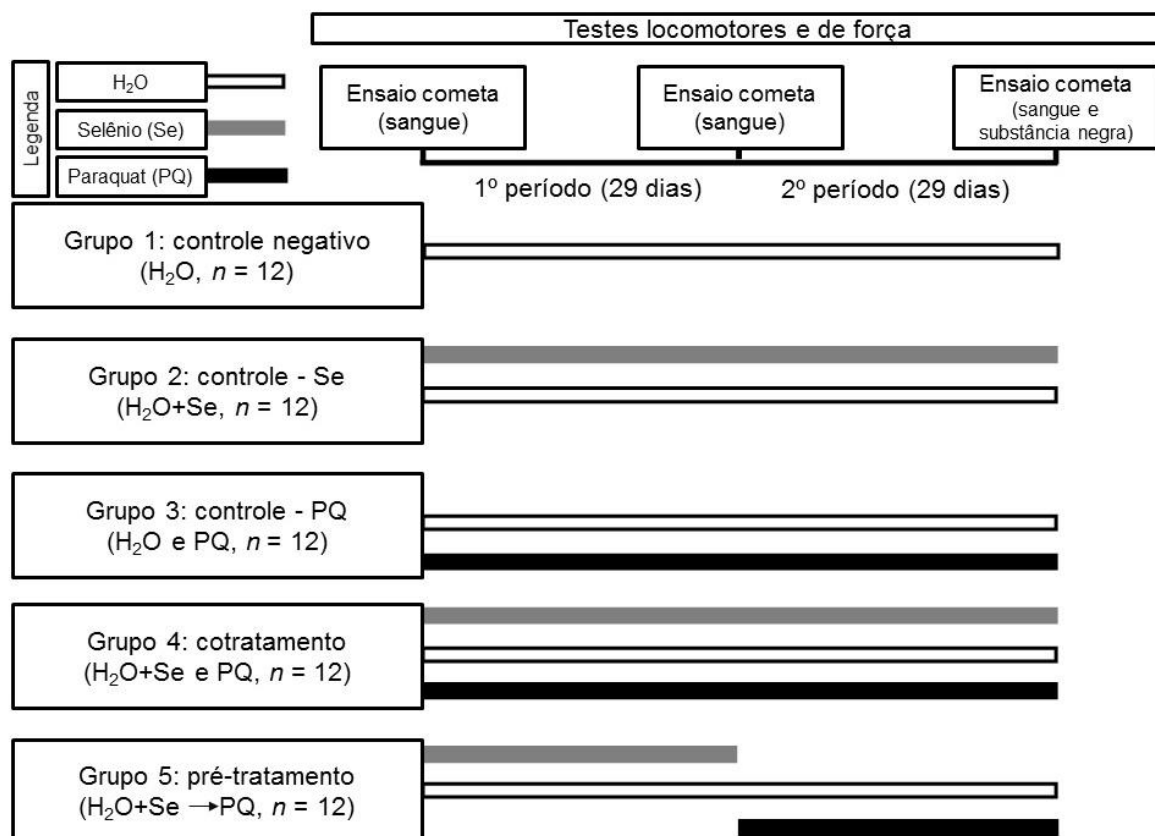
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa referente a esta dissertação foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UNISC. O número de protocolo do projeto/aprovação é “10/2012”.

#### 3.2 Desenho experimental

Na Figura 5 está representado esquematicamente o desenho experimental empregado neste trabalho. Nele constam informações sobre os grupos de animais utilizados e os principais procedimentos realizados.



**Figura 5.** Desenho experimental demonstrando os grupos e momentos de realização das principais metodologias usados no estudo.

Após apresentar o desenho experimental do trabalho é importante destacar que em decorrência de precisar de um tratamento estatístico especial, os resultados obtidos com o Grupo 5 (Pré-tratamento) não foram incluídos no artigo de dados experimentais (Capítulo II) e também serão apresentados separadamente no item “Resultados adicionais”.

### **3.3 Animais, Ensaio Cometa, Teste da Barra Estreita e administração de selênio e de paraquat**

As metodologias empregadas no Ensaio Cometa (*Single-Cell Gel Electrophoresis*) e Teste da Barra Estreita (*Narrow Beam Test*) estão descritas no artigo de dados experimentais apresentado no Capítulo II desta dissertação. Neste artigo também estão descritas informações sobre os animais utilizados na pesquisa, os procedimentos utilizados na administração do Se, aplicações do PQ e eutanásia dos animais.

### **3.4 Teste da Força de Preensão (*Grip Strength Test*)**

Este teste foi realizado para avaliar possíveis modificações na força dos animais e foi executado no início, no meio e no final do experimento. O Teste da Força de Preensão consiste em colocar o animal sobre uma grade de metal simples e invertê-la, para que o animal fique suspenso embaixo da grade. A partir de momento da inversão total da grade, é iniciada uma contagem de tempo (em segundos) até o animal não conseguir mais se segurar na grade e cair (sob uma superfície macia para evitar que ele se machuque). Caso o animal consiga se manter na grade por até 60 segundos, o teste é finalizado e esse tempo é registrado. Para a realização deste teste foram seguidas as descrições de BROOKS e DUNNET (2009), com algumas adaptações.

### 3.5 Teste da Pata Impressa (*Ink Paw Test*)

O Teste da Pata Impressa foi realizado com o objetivo de registrar possíveis alterações na marcha dos animais através da análise da disposição da impressão das patas dos ratos em um papel branco. Para obter este registro os animais tiveram a plantas de suas patas pintadas com tinta atóxica (patas dianteiras com cor distinta da tinta usada nas patas traseiras) e foram imediatamente induzidos a caminhar sobre uma folha de papel com aproximadamente um metro de comprimento.

A partir das impressões obtidas foram mensuradas: (I) a distância entre as duas patas dianteiras; (II) a distância entre as duas patas traseiras; (III) a distância entre a pata dianteira e traseira do lado direito; (IV) a distância entre a para dianteira e traseira do lado direito. Para isso foi utilizado um paquímetro digital (Digimess).

A Figura 6 exemplifica como as aferições foram realizadas utilizando uma imagem digitalizadas a partir de uma das impressões obtidas em papel. O teste foi realizado em três momentos: no início, no meio e no final do experimento. Os protocolos descritos nos trabalhos de GIRIRAJAN *et al.* (2008), BROOKS e DUNNET (2009), MITRA *et al.* (2011) e BAPTISTA *et al.* (2013) foram adaptados e usados como referências para a realização deste teste.

Imagem obtida com a digitalização de um dos registros (em papel) do teste

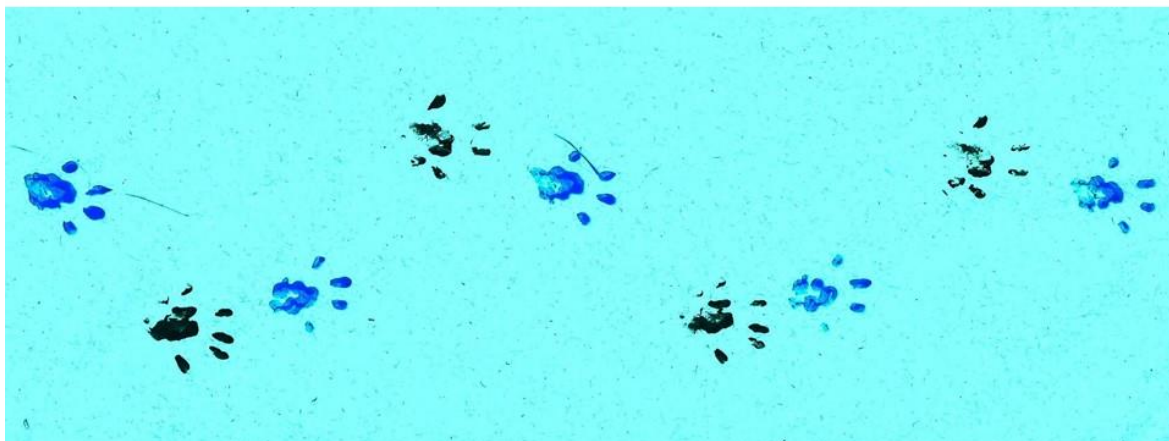
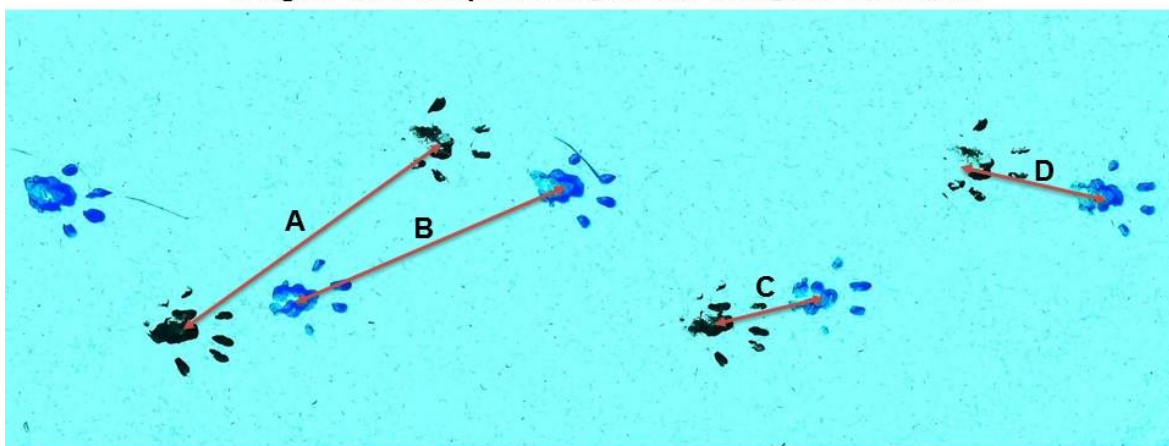


Imagem com a representação das aferições realizadas



**Figura 6.** Exemplo dos registros obtidos através do Teste da Pata Impressa e representação das aferições realizadas. **A:** distância entre as patas traseiras; **B:** distância entre as patas dianteiras; **C:** distância entre a pata traseira e dianteira do lado direito; **D:** distância entre a pata traseira e dianteira do lado esquerdo.

### 3.6 Técnica PIXE

O PIXE foi realizado no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da UFRGS e objetivou mensurar os níveis de Se no sangue e encéfalo dos animais ao final do experimento. A análise foi realizada com um homogenato de sangue e um homogenato de encéfalo dos animais por grupo experimental (grupos 1 a 4). O teste foi executado de acordo com as descrições de MOLZ *et al.* (2014).

### 3.7 Processamento histológico

Objetivando investigar possíveis alterações histopatológicas decorrentes dos tratamentos empregados neste experimento, foi realizado o processamento histológico de amostras do pulmão, fígado, testículos e cerebelo dos animais. O processamento histológico foi realizado de forma padrão e os cortes resultantes foram corados com a técnica de coloração Hematoxilina & Eosina (H&E). A Figura 7 apresenta de forma esquemática a sequência básica do processamento histológica empregado no trabalho.



**Figura 7.** Sequência das etapas do processamento histológico.

### 3.8 Análise histopatológica

Na Tabela 6 encontram-se as lesões que foram investigadas em cada um dos tecidos analisados. Para ser possível a realização de análise estatística dos resultados encontrados foi utilizado um índice para quantificar o grau de injúria no tecido, no qual foram atribuídos pontos a cada grau de lesão observada: “0” – ausência de lesão; “1” – presença leve de lesão; “2” – presença moderada de lesão; “3” – presença severa de lesão, de forma similar ao realizado por GROSETH *et al.* (2012) e CHOI *et al.* (2013). Imagens representativas das lesões foram capturadas e tiveram aspectos de contraste, brilho e cor editados com o *software* Microsoft Office Picture Manager 2010.

**Tabela 6.** Alterações histopatológicas pesquisadas em cada órgão analisado.

Órgão	Alteração histopatológica
Pulmão	Hemorragia
	Inflamação
	Espessamento alveolar
	Edema
Fígado	Vacúolos (micro e macro)
	Necrose (focos)
	Inflamação
	Atividade regenerativa (mitoses)
Testículo	Vacúolos
	Necrose (focos)
	Inflamação
	Edema
Cerebelo	Espongiose
	Inflamação

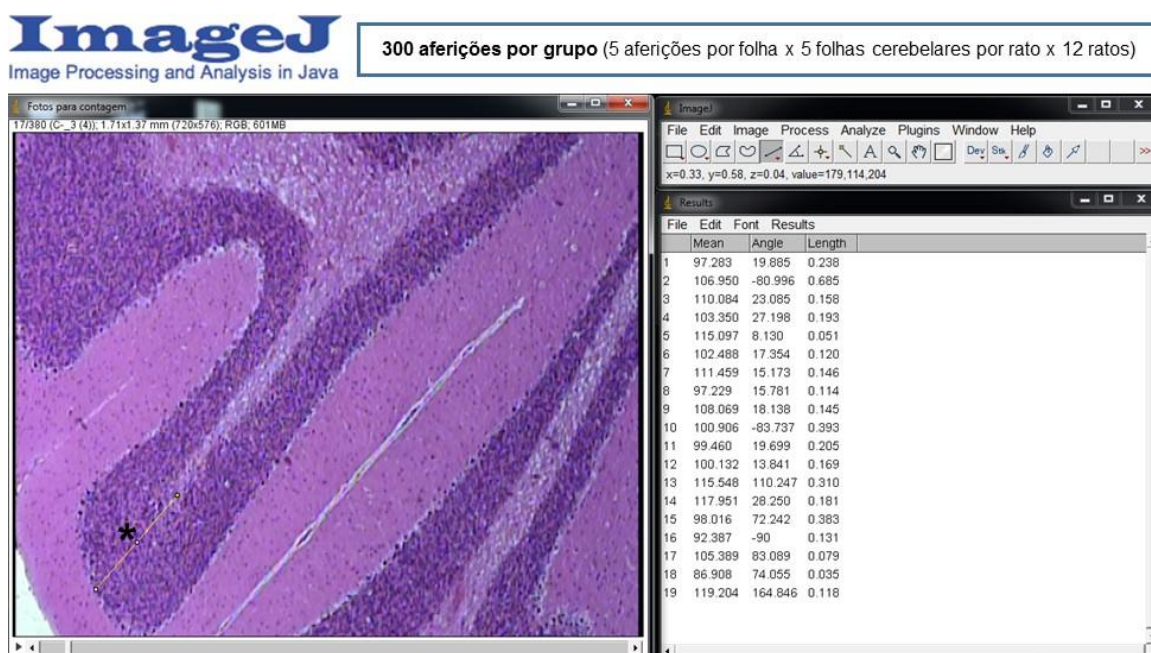
### 3.9 Análise histomorfométrica

Em razão de alguns distúrbios do movimento serem associados com a perda de células e camadas cerebelares (SØRENSEN *et al.*, 2000; BOLDUC e LIMPEROPOULOS, 2009; JHA *et al.*, 2012; BASSON e WINFGATE, 2013) e haver evidências de que o cerebelo poder estar envolvido na fisiopatologia da DP (YU *et al.*, 2007; WU e HALLETT, 2013), foi mensurado a espessura da camada granular dos cerebelos dos animais objetivando verificar se o modelo experimental desenvolvido resultou em uma redução no número de células



cerebelares e, por consequência, em uma alteração na espessura da camada granular. Para isso, sob um aumento de 40X, fotomicrografias dos cortes histológicos de cerebello foram capturadas utilizando uma câmera (KODO, CCD Color Camera) acoplada a um microscópio óptico (Nikon, Eclipse E200) interfaceados pelo *software* ENLTV-FM3 (Encore Electronics).

Das fotomicrografias obtidas foram selecionadas cinco folhas cerebelares por animal e em cada uma destas foram realizadas cinco aferições de regiões diferentes da camada cerebelar, conforme exemplificado na Figura 8. Para realizar as aferições foi utilizado o *software* para processamento de imagem ImageJ (RASBAND, 1997-2014).



**Figura 8.** Representação do método utilizado para realizar a análise morfométrica do cerebello. \*Uma das aferições realizadas em um dos cinco locais da folha cerebelar demonstrada.

### 3.10 Análise estatística dos resultados

Com exceção dos resultados apresentados no artigo de dados experimentais (Capítulo II), os demais resultados dos grupos H<sub>2</sub>O, Se, PQ e Se+PQ foram comparados estatisticamente através do *Kruskal-Wallis Test*

seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*. O *Mann-Whitney Test* foi aplicado para analisar os resultados do Ensaio Cometa na situação em que apenas o grupo controle (H<sub>2</sub>O) foi comparado com o grupo PQ. O nível de significância considerado em todos os testes foi de  $p \leq 0,05$ . As análises, assim como a plotagem dos gráficos, foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0.

#### **4 CAPÍTULO I – Artigo de Revisão**

Neste capítulo encontra-se o artigo intitulado “*Selenium and Parkinson’s disease*”. Este é um trabalho de revisão e será submetido para publicação em uma revista científica indexada internacionalmente.

## **Selenium and Parkinson's disease**

**Joel H. Ellwanger<sup>1</sup>, Silvia I. R. Franke<sup>2</sup>, Diana L. Bordin<sup>1</sup>, Daniel Prá<sup>2,3</sup>, and  
João A. P. Henriques<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Campus do Vale - Prédio 43421, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970 – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Bloco 42, sala 4206, Av. Independência, 2293, Bairro Universitário, CEP 96815-900, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Bloco 12, sala 12 06, Av. Independência, 2293, Bairro Universitário, CEP 96815-900, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>4</sup>Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

Corresponding author: Dr. João A. P. Henriques. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Campus do Vale - Prédio 43421, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970 – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.  
Phone: +55-51-3308-6074; Fax: +55-51-3308-7309; E-mail: henriques@cbiot.ufrgs.br; pegas.henriques@gmail.com

## ABSTRACT

Parkinson's disease is characterized by the death of dopaminergic neurons, mainly in the substantia nigra, and causes serious locomotor dysfunctions. It is likely that the oxidative damage to cellular biomolecules is among the leading causes of neurodegeneration that occurs in the disease. Selenium is an essential mineral for proper functioning of the brain, and mainly due to its antioxidant activity, it is possible to exert a special role in the prevention and possibly in the nutritional management of Parkinson's disease. Currently, few researchers have investigated the effects of selenium on Parkinson's disease. However, it is known that very high or very low body levels of selenium can contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease, because this process results in increased levels of oxidative stress. Therefore, the aim of this work is to review and discuss studies that have addressed these topics and to finally associate the information obtained from them so that these data serve as input to new research.

**Key words:** neurodegeneration, nutrition, micronutrient, Parkinson's disease, selenium.

## INTRODUCTION

The influence of diet on the prevention, etiology and treatment of various diseases is well established, as exemplified by several recent studies.<sup>1-5</sup> Among the nutrients obtained from the diet, it is known that selenium (Se) is important for healthy human metabolism and that it is involved in the pathophysiology of many diseases, such as cancer, type-2 diabetes, viral diseases, cardiovascular disease, muscle disorders, male infertility, and neurological disorders, among others.<sup>6-8</sup> Little is known about the role of Se in pathologies that affect the central nervous system. However, Se has important antioxidant functions<sup>9-11</sup> and neuroprotective actions.<sup>12-15</sup> Therefore, Se could be significantly involved in the pathophysiology of neurodegenerative diseases.

One of the most common neurodegenerative disorders in the population worldwide is Parkinson's disease (PD), which primarily affects the elderly.<sup>16</sup> The factors that contribute to a delay or acceleration of the progression of PD are not completely established. Evidence has shown that cellular oxidative damage is one of the major possible causes of PD.<sup>17-21</sup>

Considering that Se has antioxidant activity and oxidative damages are most likely involved in the pathogenesis of PD, studying the role of the mineral on this disease is a promising direction, especially because an association between Se and PD has been poorly investigated. Therefore, the aim of this work is to investigate and discuss the possible effects of Se on PD based on theoretical and experimental studies. In the first part of this review, we present the roles of Se in the maintenance of human health and in nervous system homeostasis, as well as a discussion regarding the appropriate levels of Se that should be consumed to maintain human health. The second part describes the pathophysiology and biomarkers of PD, their relationships with oxidative stress, and the roles of diet and specific micronutrients in the disease. Finally, in the third part of this review, the influence of Se on PD is discussed, with an emphasis on the role of Se in the locomotor system and brain dysfunction.

## **SELENIUM**

In 1817, Se was discovered by Swedish chemist Jöns Jacob Berzelius,<sup>22</sup> and currently, it is known that Se is a trace element that is indispensable for the maintenance of human health and affects body metabolism in normal and pathological situations.<sup>6</sup> However, many aspects of Se still need to be clarified, including the optimal levels of Se that should be consumed to achieve its beneficial effects and avoid the detrimental effects, as well as the role of this nutrient in the treatment and prevention of neurodegenerative diseases such as PD. These topics will be covered in the following section.

## Dietary sources and nutritional recommendations

Se is an essential nutrient, and the human diet is a natural source for obtaining it in relevant amounts. The dietary sources of Se are quite diverse, including meat, milk, eggs and vegetables.<sup>23</sup> The amount of Se present in most vegetables depends on the amount of the mineral present in the soil in which the plant was cultivated. Therefore, plants grown in soils rich in Se have high mineral levels, whereas the opposite is also true.<sup>24,25</sup> It was recently demonstrated that in monsoonal China, precipitation has an important effect on the distribution of Se in soil.<sup>26</sup> This fact demonstrates that populations living in specific regions of the world are susceptible to high or low consumption of Se, and the amounts vary according to environmental conditions that modify the mineral content of the soil where they live. This influence is greatest where the importation of food from various locations is lower, because it makes the consumption of local foods greater, to the detriment of food from various geographical and environmental origins.

Among the foods considered as sources of Se, the Brazil nut is rich in this nutrient. According to Cominetti et al.<sup>27</sup>, a single Brazil nut may have up to 290 µg of Se (about 5-fold the daily dietary requirement). Therefore, this food can be used to increase levels of this mineral in the blood.<sup>28</sup> This information is clinically important because it demonstrates that the inclusion of controlled amounts of Brazil nuts in the diet can be a way to supplement the mineral in patients with specific needs of Se. Thus, the use of non-food supplements of this mineral is not required. However, it is important to mention that in Brazil, the Brazil nut is not widespread in the food culture of all regions of the country. Additionally, the Brazil nut is an expensive product, which becomes an obstacle for people wishing to acquire it.

The recommendations for daily Se intake are relatively easy to be achieved through a balanced diet according to the gender and age of each individual. For adult men and women, 55 µg of Se/day is considered the ideal amount to be consumed. This recommendation remains unchanged for the elderly people and is lower for children. Quantities greater than 400 µg of Se/day (recommendation for adults) are not indicated by threatening intoxication.<sup>29</sup> Cases of Se poisoning are

not common but can cause signs such as hair and body hair alterations, nails and skin abnormalities, garlic breath,<sup>28</sup> lethargy, and amyotrophic lateral sclerosis.<sup>30</sup>

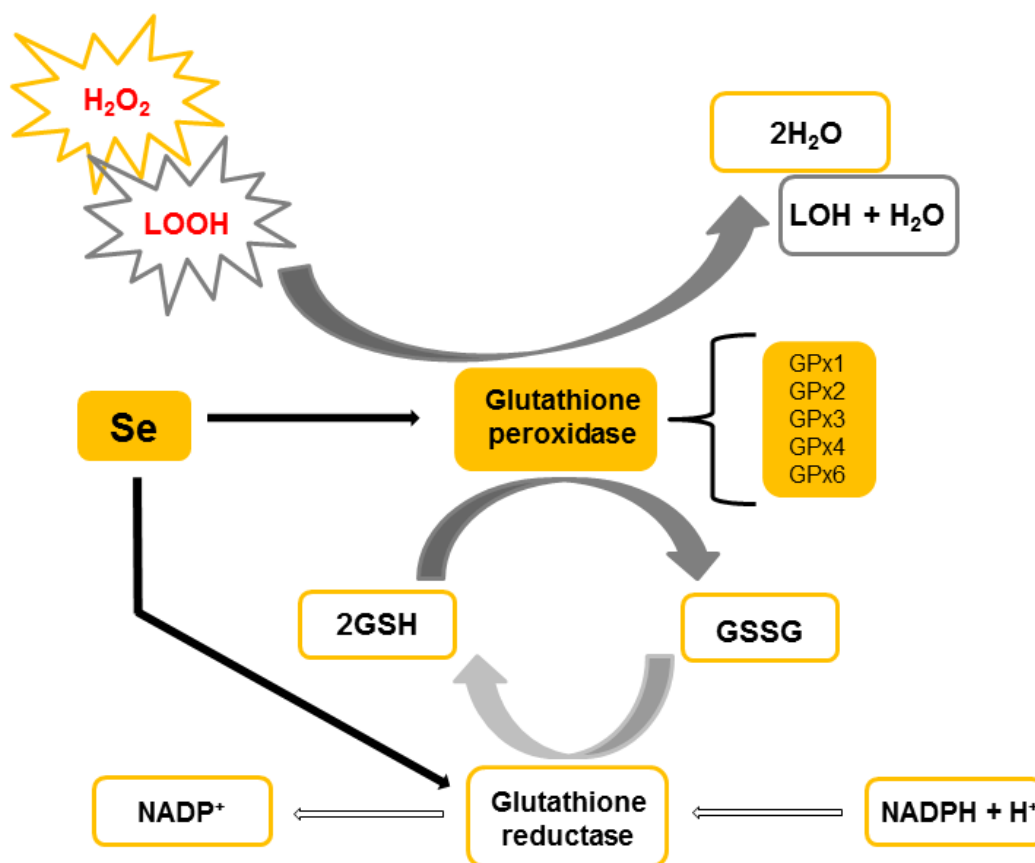
In addition to food sources of Se to increase body levels of the mineral, other factors must be considered, such as the bioavailability of the nutrient. The bioavailability of Se will depend on various factors, such as the mineral absorption rate that varies according to the type of food consumed and the interaction with other nutrients.<sup>31-33</sup> The organic forms of Se are more bioavailable than inorganic Se.<sup>34,35</sup> Therefore, in individuals requiring the supplementation of the mineral, using Se supplementation in organic form (for example: wheat Se, selenomethionine or high-Se-yeast) seems to be more advantageous than using supplements containing Se in inorganic form (selenite or selenite).<sup>35</sup> Furthermore, there is evidence that Se consumed through food is better absorbed than Se from mineral supplements. Approximately 80% of dietary Se can be absorbed, which varies according to the type of food source of the mineral.<sup>31</sup> An *in vitro* study using three types of supplements of Se (Se-enriched yeast, selenate-based food supplement and selenite-based food supplement) showed that 14% (from selenate supplement) was the highest rate of bioavailability achieved.<sup>33</sup> Notwithstanding, the bioavailability of Se either via food or via supplements deserves further studies.

### **Biological roles of selenium**

Se deficiency has been associated with some diseases such as Keshan disease (a cardiomyopathy that affects people living in regions with soil poor in Se).<sup>36</sup> Se deficiencies are also related to genomic instability.<sup>37</sup> Additionally, Se is able to perform epigenetic changes through DNA methylation and histone modifications.<sup>38</sup> Complex pathological situations such as human immunodeficiency virus<sup>39,40</sup> and cancer<sup>41</sup> also appear to be influenced by body levels of Se. In this context, the antioxidant function of Se<sup>9-11,37</sup> involves protecting from and slowing the development of diseases that involve oxidative damage to cellular components.



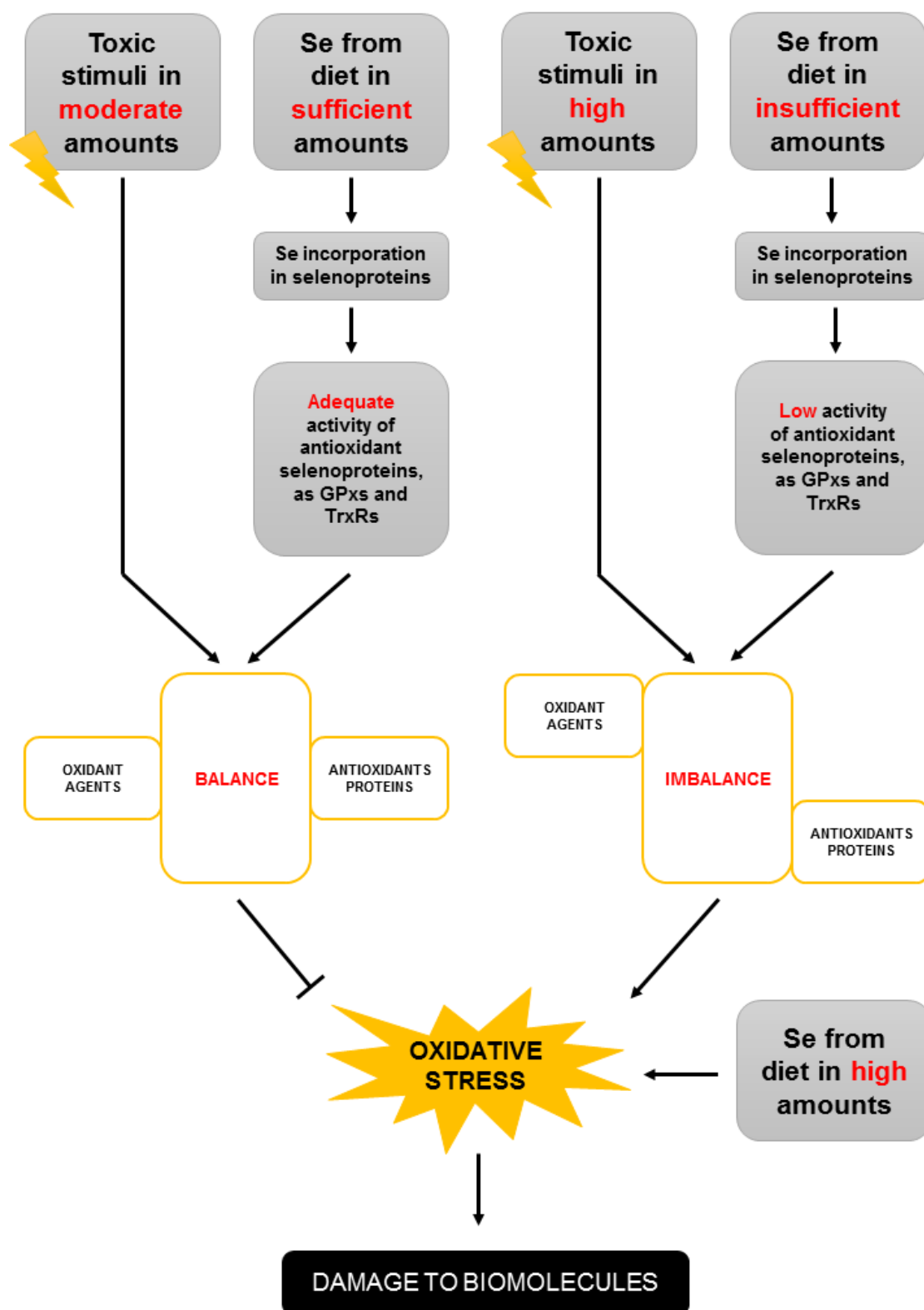
The biological activity attributed to Se is exercised through selenoproteins, which are proteins that have a selenocysteine residue in the active site.<sup>7</sup> The selenoproteins play varied and important activities in the body, such as selenium transport,<sup>42</sup> endoplasmic reticulum homeostasis,<sup>43</sup> immunomodulation, regulation of apoptosis,<sup>8</sup> and control of the cellular redox state.<sup>37</sup> There are currently twenty-five selenoproteins identified in humans, which include Selenoprotein P (SelP), Selenoprotein W (SelW), Selenoprotein H (SelH), Selenoprotein M (SelM), Selenoprotein R (SelR), Selenoprotein N (SelN), Selenoprotein S (SelS) and the selenoproteins from the families of Iodothyronine deiodinase (DIOs), Thioredoxin reductase (TrxRs) and Glutathione peroxidase (GPxs). All are involved in metabolic functions to prevent and/or combat diseases.<sup>8</sup> Although all these selenoproteins have an important role in cellular homeostasis, the families of antioxidant enzymes should be highlighted. The family of GPxs should be particularly focused because the inappropriate activity of GPxs has been reported as a factor that strongly correlates with the nutritional deficiency of Se, which contributes to oxidative stress and therefore the emergence of diseases, including neuronal disorders.<sup>25,44</sup> Among the eight enzymes described in this family, five (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 and GPx6) are selenoproteins, and they are involved in the detoxification of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides, among other types of reactive species. In these reactions, the tripeptide GSH is used as a reducing agent.<sup>45-47</sup> It is important to mention that in the GPxs family, GPx5, GPx7 and GPx8 are non-Se congeners.<sup>46</sup> A brief demonstration of the activity of Se-dependent glutathione peroxidase is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Detoxification of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and lipid peroxides (LOOH) by Se-dependent glutathione peroxidase. Glutathione peroxidase activity requires two molecules of the tripeptide GSH, which is restored by the enzyme glutathione reductase.

The action of selenoproteins is related to diet. Se ingested through food is incorporated into selenoproteins, and the activity of these proteins depends on the levels of Se ingested.<sup>48,49</sup> This information suggests that quantities of Se ingested through food can influence the activity of glutathione peroxidase, in addition to blood levels of the mineral.<sup>27,50</sup> If the level of Se in the body is low, the cells cannot synthesize selenoproteins properly.<sup>51</sup> If the activity level of selenoproteins with antioxidant action is sufficient to combat the level of oxidizing agents generated by the body or by the environment, the oxidative stress is avoided. However, if there is an imbalance between the activity of antioxidant enzymes and the levels of oxidizing agents, oxidative stress will occur, which will result in damage to cellular

biomolecules.<sup>41,52-55</sup> These events are schematically summarized in Figure 2. Therefore, it is important to mention that individuals who are exposed to environmental stimuli or have lifestyles that exacerbate oxidative stress should be aware of Se dietary recommendations, and this information must be a prominent topic in dietary planning for these individuals.<sup>56</sup> To date, there is no specific dietary requirement defined for individuals with high oxidative stress levels, and future studies are need to set such levels.



**Figure 2.** Main events that influence the antioxidant activity of Se. The Se antioxidant activity occurs through selenoproteins, which are influenced by Se levels obtained through diet. Symbols: ↑ - lead to; T - blocks.

### **Potential noxious effects of selenium overload**

It is important to mention that despite Se influence on the metabolism of various human diseases by its antioxidant action, the role of this mineral cannot always be protective or combat injury inherent to a pathological condition. Se may not often act protectively or even beneficially, as demonstrated by Maraldi et al.<sup>57</sup> in a test performed *in vitro* using human neuron cells and by Estevez et al.<sup>58</sup>, who showed that a high dose of Se can induce oxidative stress in cholinergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. Recent results indicated that the supplementation of 200 µg of Se/day (from L-selenomethionine) is not recommended for preventing prostate cancer.<sup>59</sup> This information calls attention to the importance of not considering the mineral only as a protective agent when introduced into a research protocol. Depending on the quantities used, type of Se chosen and experimental conditions, Se could have detrimental effects, similar to those mentioned above.

### **Adequate selenium levels for preventing diseases**

Studies that investigated the effect of Se on various parameters related to health or disease in humans have used various approaches. These studies used food questionnaires,<sup>60,61</sup> measured mineral levels in plasma<sup>62</sup> and breast-milk,<sup>63</sup> and incorporated supplements.<sup>40,59</sup> Regarding the use of Se supplements in research with adult humans, additional doses up to 200 µg of Se/day may be appropriate. This value represents an amount of mineral approximately 4 times higher than the recommended value (can be used to evaluate the effects of high doses of the mineral) but much less than the amount that could pose a risk to health.<sup>29,39,41</sup> Clinically, Se supplementation may be important for individuals from populations that live in geographical areas where the mineral is not easily consumed through diet or have genetic variations that alter the metabolism of the mineral.<sup>64</sup> Methodological approaches using various animal models<sup>12,65</sup> or cell cultures<sup>57,66</sup> are useful for answering questions related to the effects of Se on health/disease but cannot be investigated by testing in humans due to ethical and methodological reasons.

## **Selenium and the nervous system**

Se is also essential for proper brain function.<sup>67</sup> Several studies have demonstrated that this mineral influences various pathologies affecting the central nervous system. In elderly patients, low levels of Se in plasma are related to a reduction in neurological activity, such as coordination.<sup>68</sup> Se may also influence behavioral development<sup>69</sup> and psychological aspects, such as mood<sup>70</sup> and cognition.<sup>71</sup> Se in the form of organic compounds could act as an antipsychotic.<sup>72</sup>

In addition to influencing the functioning of the brain and various diseases of the central nervous system, Se has neuroprotective effects demonstrated by several experimental approaches.<sup>12-15</sup> This information supports the concept that Se has a key role in the development and/or progression of neurodegenerative diseases, acting as a neuroprotective agent. However, considering the complexity of these diseases and the various influences that Se can play, the mechanisms by which this mineral acts in these diseases still need to be investigated. More studies are also needed to understand the specific roles of selenoproteins and the effects of Se intake on neurodegenerative diseases.<sup>71</sup> Therefore, a better understanding of the role of Se in the pathogenic mechanisms of PD is important.

## **PARKINSON'S DISEASE**

PD was first described by James Parkinson in 1817 (for historical aspects of the disease, see the review published by Goetz<sup>73</sup>). Currently, PD is the second most common neurodegenerative disease in the world, and Alzheimer's disease is the most frequent.<sup>74</sup> PD primarily affects the elderly, occurring in approximately 1% of the population over 60 years<sup>74,75</sup> but can also occur less frequently in younger individuals.<sup>76,77</sup>

Geographically, the distribution of the disease in the world slightly varies. A recent study reported that among individuals aged between 70 and 79 years, PD is more prevalent in Australia and countries of Europe and North America compared with individuals from Asia.<sup>16</sup> Differences among sexes were also observed. The prevalence and health impact of PD is higher in men.<sup>78</sup> In addition

to physical and psychological harm caused to patients, PD has a great economic impact due to the high medical costs of preventing and combating the disease and loss of workforce. Approximately 14 billion dollars were spent combating it in the United States of America alone in 2010.<sup>79</sup>

PD neuropathology is characterized by the degeneration of dopaminergic neurons that communicate to the substantia nigra *pars compacta* of the midbrain to the striatum and affect neurons of the nigrostriatal pathway. The cells linking the substantia nigra to the putamen are the most affected. The presence of cytoplasmic inclusions known as Lewy Bodies are also part of PD neuropathology.<sup>76,80,81</sup> Other brain structures may also be affected in the disease. For example, evidence obtained by neuroimaging exams indicate that the cerebellum of patients suffering from PD is hyperactive,<sup>82</sup> but the role of the cerebellum and other structures in this disease is still poorly understood and should be further studied.

### **Diagnosis and biological markers of Parkinson's disease**

There is no specific biochemical test to indicate the presence of PD. The diagnosis is made primarily from signs and clinical features presented by the patient<sup>75,76</sup> and can only be confirmed at postmortem examination.<sup>75</sup> Some of the clinical signs used to establish the diagnosis of PD are tremor at rest, postural instability, muscular rigidity, and difficulty in initiating movements (akinesia) or continuing them (bradykinesia), among others that affect movement.<sup>76,83</sup>

Because there are no specific laboratory tests to diagnose the disease, the search for biomarkers for the presence of PD is extremely important, and several markers related to oxidative stress have been suggested to be diagnostic of PD. LeWitt et al.<sup>20</sup> reported that the 3-Hydroxykynurenine from cerebrospinal fluid might be useful for this purpose. The oxidized DJ-1 protein has also been suggested as a potential biomarker for PD.<sup>84</sup> Additionally, in a recent study, Ide et al.<sup>85</sup> noted that the levels of vitamin C in lymphocytes could be used to monitor the progression of PD. Kouti et al.<sup>86</sup> demonstrated the potential for the use of nitric oxide and peroxynitrite levels as biomarkers to monitor the progression of the

disease. In seeking biomarkers, it is important to remember that determining the susceptibility genes for PD will help discover which molecules serve as potential biomarkers for disease.<sup>87</sup>

The involvement of genetic factors in the onset of PD is quite relevant. In a recent meta-analysis conducted by Nalls et al.,<sup>88</sup> six new risk loci for PD were described: *SIPA1L2*, *INPP5F*, *MIR4697*, *GCH1*, *VPS13C* and *DDRGK1*. In meta-analysis studies, Dai et al.<sup>89</sup> reported that *TNF*-1031 polymorphism is a possible risk factor for PD, and Wang et al.<sup>90</sup> concluded that the null genotype of *GSTT1* is also related to increased risk of the development of PD, at least in Caucasians. The roles of the genes *parkin*, *DJ-1* and *PINK-1* in the susceptibility to PD<sup>91</sup> should be discussed, as well as the *LRRK2* gene.<sup>92</sup> Genetic mutations affecting the PINK1 and LRRK2 proteins are related to mitochondrial dysfunction and the formation of reactive oxygen species,<sup>93</sup> which are events involved in PD pathophysiology.

### **Oxidative stress and other molecular dysfunctions in Parkinson's disease**

Although genetic factors are very important in the pathogenesis of PD, it is believed that the interaction between genetic and environmental factors determines whether the disease develops.<sup>16,47,94,95</sup> It is known, for example, that occupational and environmental exposure to pesticides (such as paraquat and rotenone) can trigger PD.<sup>96-100</sup> This factor exemplifies how environmental factors associated with oxidative stress should not be overlooked in investigating the causes of PD and should be considered together with the genetic characteristics of each individual. However, the interactions between these two factors are not well established.

Oxidative stress seems to be crucial for PD development.<sup>18-21,101</sup> Additionally, DNA damage,<sup>102</sup> deficiency in the repair of these damages,<sup>103,104</sup> lipid peroxidation<sup>105</sup> and mitochondrial dysfunction<sup>106</sup> are other important events in the physiopathology of PD. Neuroinflammation also appears to have an involvement in the etiology<sup>107</sup> and progression of this disease.<sup>108</sup>



Biomarkers indicated that oxidative damage is increased in patients suffering from PD, reinforcing the relationship between this injury and the disease.<sup>17</sup> A treatment against the oxidative stress in PD is still not established, but to be effective, this molecular insult should be a target of treatment in the early stages of the disease.<sup>109</sup> However, it is interesting to note there is doubt whether oxidative stress is a cause or a consequence of the loss of dopaminergic neurons in PD,<sup>105</sup> so further studies on this aspect should be conducted. As cited by Tsang and Chung,<sup>110</sup> a detailed understanding of how oxidative stress influences the pathophysiology of PD will help develop better strategies to treat the disease.

Mitochondrial dysfunction is another important molecular event associated with PD.<sup>106</sup> More specifically, oxidative stress related to the impairment of complex I of the mitochondrial respiratory chain and mitochondrial DNA mutations are mentioned as causal factors of the disease.<sup>111</sup> Müller et al.<sup>112</sup> demonstrated a relationship between the presence of Lewy bodies and mitochondrial DNA damage. In this context, the results of the study conducted by Sanders et al.<sup>113</sup> support the use of mitochondrial DNA damage as a biomarker for the vulnerability of dopaminergic neurons in PD. However, this aspect should be better characterized, and further studies investigating the role of mitochondria in PD are needed.

New insights into the pathophysiology of the PD have been described. Recently, Janda et al.<sup>114</sup> and Zhang et al.<sup>115</sup> have discussed the association between defects in the process of autophagy and PD. Wen et al.<sup>116</sup> reported the involvement of proteins that induce cell cycle reentry (CDK5/RKIP/ERK pathway) causing neuronal death in PD. Brenner<sup>117</sup> hypothesized that the deterioration of melanin in the cells of the substantia nigra may be possible involved in the development and progression of PD. The relationship between PD and nucleolar stress has also been discussed.<sup>118</sup> The suggestions of the involvement of all these molecular processes in PD leads to further discussion on the causes and factors that are involved in disease progression, and therefore, possible new therapeutic targets are hitherto unimagined. However, more experimental investigations using robust methodology are needed to support these new findings.

The dopamine replacement by using Levodopa has been widely used for three decades in the treatment of PD,<sup>119</sup> Levodopa reduces lymphocyte DNA damage in these individuals.<sup>120</sup> However, it is important to highlight that despite the existence of treatment, currently there is still no cure for the disease.<sup>119</sup>

Although dopamine can act as an antioxidant,<sup>121</sup> there is evidence that this neurotransmitter contributes to the generation of neuronal toxicity. In dopaminergic cells, normal dopamine metabolism involving the tyrosine hydroxylase enzyme is responsible for producing oxygen radicals that damage biomolecule cells.<sup>122</sup> This fact helps to explain the high oxidative stress generated in the dopaminergic neurons.

### **Diet, micronutrients and the prevention of Parkinson's disease**

In elderly patients, the relationship between oxidative stress and nutritional status has been well established,<sup>123</sup> but the influence of nutrition, specifically in PD, has been poorly explored. It is likely that an imbalance in the consumption of macronutrients seems to be a predisposing factor for the disease, and it has been reported in a meta-analysis conducted by Chen et al.<sup>124</sup> that overweight is a possible risk factor of PD. In this context, it was suggested that in men, the consumption of milk and cheese could increase the risk for development of PD, although these data still need to be confirmed by future studies using strong methodologies (Jiang et al. 2014).<sup>125</sup> Kamel et al.<sup>126</sup> showed that high consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) associated with low consumption of saturated fats could help reduce the risk for developing PD. The authors described that a diet poor in PUFAs or with high amounts of saturated fat might increase the susceptibility to neurotoxic agents associated with the pathogenesis of PD. However, Dong et al.<sup>127</sup> reported a positive association between n-6 PUFAs intake and the risk for developing PD, but this is a weak association that needs to be confirmed in future studies. The same authors cited that n-3 PUFAs have anti-inflammatory effects and n-6 PUFAs have pro-inflammatory effects. This information could justify the results from these two

studies, but the relationship between PUFAs and PD cannot be fully understood and deserves to be studied in detail.

The intake of micronutrients is also a factor influencing the pathophysiology of the disease. Recently, Stelmashook et al.<sup>128</sup> described that the imbalance of copper and zinc can influence the mechanisms of pathogenesis of PD. High intake of non-heme iron associated with low vitamin C intake may represent a higher risk for PD.<sup>129</sup> Some authors report a beneficial use of the micronutrients in PD. The administration of folates and vitamins B6 and B12 could be used in a supplemental way and associated with the conventional treatment to delay the progression of the disease and/or improve the quality of life of the patients with PD.<sup>130</sup> The use of these nutrients could contribute to healthy nutritional status of patients and would help in combating the molecular events that lead to disease, but these supplementation strategies using various nutrients should be clinically investigated and elaborated very carefully. Additionally, vitamin D could have a neuroprotective effect, influencing the symptoms and possibly the development and progression of the disease.<sup>131</sup> The influence of food and specific micronutrients in PD is still unclear. These results reinforce the idea that the relationship between nutrition and PD is complex and requires more studies in people to clarify these aspects. However, the food and nutrition management in patients suffering from PD is very important so that they can achieve or maintain a healthy nutritional status. This goal will ensure adequate intake of micronutrients (especially those antioxidants as Se), preserving other aspects of health that will allow people to lead a healthy, normal life.

## **THE INFLUENCE OF SELENIUM ON PARKINSON'S DISEASE**

Recently, our research group experimentally investigated the role of Se in an experimental model of PD in rats and induced by the herbicide paraquat.<sup>132</sup> This work has helped to test the hypothesis that Se could aid in preventing PD if used previously to the emergence of disease or perhaps on patients suffering from early stages of PD. This hypothesis was initially presented in a work published by Cadet in the 1980s,<sup>133</sup> who proposed the use of Se associated with vitamin E. To

the best of our knowledge, this type of supplementation had not been investigated (Se alone or Se plus vitamin E in paraquat-induced models). Our findings indicated that Se protected against bradykinesia (locomotor damage) and DNA damage in lymphocytes of rats in the tested animal model of PD induced by paraquat. A study performed by Khan<sup>134</sup> in an animal model of PD in mice demonstrated that Se also reversed, at least partially, the toxic effects (dopamine depletion) caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), that has the 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) as active metabolite, a molecule very similar to paraquat.<sup>80</sup> This protective effect of Se on dopamine in animal models of PD is further strengthened by the results of the work conducted by Zafar et al.<sup>135</sup> who used the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to induce the model in rats. Additionally, a report of a test using embryonic stem cell transplantation in brains of rats submitted to a model of 6-OHDA-induced PD described that Se can also protect against inflammation generated in this therapy.<sup>136</sup> Although the results of these studies are quite relevant, it is important to note that these authors investigated the effects of the mineral in experimental models of the disease, which differ in several aspects from PD that occurs naturally. Therefore, further studies are needed to extrapolate the results to humans. In all experimental studies cited above, the Se used in the tests was sodium selenite, an inorganic form of Se. However, the Se used in other experimental strategies varies in terms of chemical structure, which further complicates the extrapolation of results to humans. In this context, it is important to mention that the type of Se used in future pharmacological therapies should be considered, and the potential therapeutic use of organoselenium compounds should be further explored.<sup>137</sup> For example, Ebselen, an organic form of Se, has a known strong antioxidant function<sup>138</sup> and therefore has the potential to combat oxidative stress that occurs in PD. Thereby, studies investigating the antioxidant potential of ebselen are encouraged.

### **Selenium and the locomotor system**

Because locomotor damage is a main feature of PD, it is interesting to analyze the results obtained from studies that evaluated the influence of Se on

various aspects of the locomotor system. High levels of Se in the human organism protect the motor function in individuals exposed to mercury,<sup>60</sup> whereas the serum levels of Se appear to also be associated with the walking speed in elderly ( $\geq 65$  years) women in a positive way.<sup>139</sup> In the treatment of Restless Leg Syndrome, a human disorder based on the dopamine system that causes limb movements and could be associated with PD,<sup>140,141</sup> a daily dose of 50  $\mu\text{g}$  of Se improved symptoms.<sup>141</sup> In animal models, Yeo et al.<sup>142</sup> reported that Se (sodium selenite) protects the locomotor system of rats submitted to damage to the spinal cord. This protection of locomotion was also obtained by Zafar et al.<sup>135</sup> and by our research group,<sup>132</sup> both using other animal models (PD models) and evaluating various aspects of locomotion, as previously mentioned. The administration of physiological doses of sodium selenite may contribute to the physical performance of rats, as assessed by levels of glycogen in liver after a swimming test.<sup>143</sup> However, a recent study by Marcondes Sari et al.<sup>144</sup> did not find changes in locomotor function evaluated by open-field test in mice that received p-chloro-selenosteroid. It is difficult to compare the studies that evaluated the effects of Se on locomotion, because there are few experimental approaches and they differ. Therefore, it is not possible to obtain consistent conclusions or extrapolate them to the locomotor effects observed in patients with PD.

### **Selenium imbalance and brain dysfunction**

Selenoproteins are also essential to brain function,<sup>145</sup> and the depletion of these proteins seems to be related to the pathophysiology of PD.<sup>146</sup> This mechanism suggests that analyzing the results of studies that investigated the interaction between Se and selenoproteins and its relation with the brain and PD is also relevant. In this context, the roles of glutathione peroxidase and selenoprotein P are briefly discussed in this review.

Rats deficient in Se have lower glutathione peroxidase (a Se-dependent enzyme) activity in the brain.<sup>147</sup> Additionally, the reduction of the antioxidant defenses in the brain caused by Se deficiency is attributed to the decrease of glutathione peroxidase activity.<sup>148</sup> Kim et al.<sup>149</sup> observed that dietary Se (sodium

selenite) attenuated the neurotoxicity in mice treated with methamphetamine evaluated by dopamine depletion in the striatum and substantia nigra. The authors also attributed this neurotoxicity prevention principally to the activity of glutathione peroxidase. These data were supported by evidence that neurotoxicity (high oxidative stress) induced by methamphetamine can be mitigated by maintaining glutathione peroxidase activity through the use of Se.<sup>150,151</sup> These results demonstrate that glutathione peroxidase plays a key role in protecting against the degeneration of dopaminergic neurons, and therefore could be involved in the physiopathology of PD.<sup>47</sup>

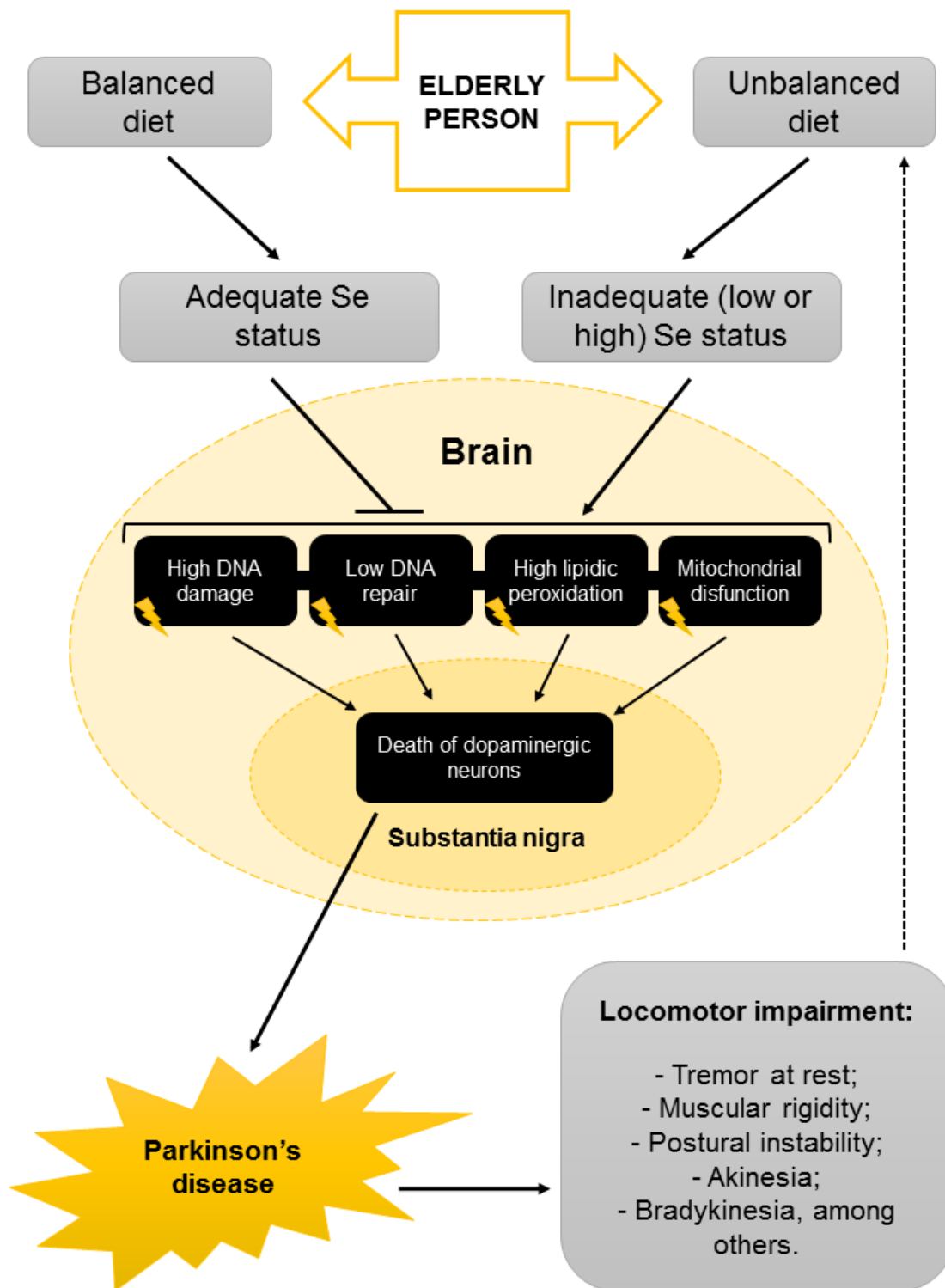
Selenoprotein P is also critical to neuronal functioning<sup>152</sup> and the normal level of Se in the brain.<sup>153</sup> The deletion of this protein causes inadequate uptake of Se by the brain, as demonstrated by Hill et al.<sup>154</sup> in a study using mice. More recently, other studies using animals showed that the deletion of selenoprotein P causes the degeneration of the brain cells.<sup>155,156</sup> By examining post mortem brain tissue from PD patients, Bellinger et al.<sup>157</sup> demonstrated that selenoprotein P expression decreased in the substantia nigra of these individuals compared with controls. However, the authors also described that the protein was increased relative to the total number of cells. All this evidence indicates that Se may influence neurodegeneration by altering the activity of selenoproteins, such as glutathione peroxidase and selenoprotein P. In other words, the concept that Se has an indirect action in the protection process in addition to its non-selenoprotein antioxidant function is reinforced.<sup>150,158</sup>

Se deficiencies can modify the functioning of dopaminergic neurons,<sup>159</sup> which are the main cells that are affected in PD. Paradoxically, Se deficiency may increase the activity of tyrosine hydroxylase and dopamine production.<sup>160</sup> These data suggest that the deficiency of the mineral can trigger compensatory activity by dopamine production in response to a situation in which its depletion (due to Se deficiency) is previously established. In a study conducted in the 1990s by Aguilar et al.<sup>161</sup>, no differences in cerebrospinal fluid levels of Se were observed between PD patients and control subjects. Qureshi et al.<sup>162</sup> reported an increased cerebrospinal Se level in PD patients compared to controls. Zhao et al.<sup>62</sup> also reported higher Se levels in PD patients compared with control individuals, but the

study evaluated plasma levels of the mineral. Additionally, reduced Se was not found in people with PD if the nutrient was measured in lymphocytes<sup>163</sup> or by serum levels.<sup>161,164</sup> However, low serum levels of Se in individuals with PD compared with controls were reported by Nikam et al.<sup>165</sup> Ultimately, according to the results obtained by the cited studies, it is not possible to make a direct relationship between Se status and PD after the disease has already been established. This finding highlights that the use of the mineral for preventing disease could be a promising strategy.

Paradoxically, increased deaths due to PD have been reported in men who lived in an area where the drinking water was rich in inorganic Se.<sup>166</sup> These data were reinforced by the findings of a study in which PD patients consumed Se-rich foods with higher frequency than control subjects.<sup>167</sup> These data highlight that Se in high amounts is prooxidant.<sup>168,169</sup> Currently, cultural habits that favor the consumption of some specific Se-rich food or their easy availability may be responsible for excessive consumption of the mineral. The results of these studies also demonstrate the augmented complexity of investigating the effects of Se from food consumption, in which synergism and antagonism between nutrients occur, compared with seeking correlations between disease and levels of the mineral or studying controlled intake of the mineral through supplements. More studies evaluating the relationship between PD and the consumption of Se through food are needed, especially to provide technical and scientific information for the elaboration of better diets for the elderly population.

Finally, from the information presented and discussed here, the probable relationship between the nutritional status of Se and PD is summarized in a schematic model presented in Figure 3. The events shown in this model, as well as the relationship between them, represent the evidence most strongly established in the literature. As described in this review, new events and interactions have also been suggested and discussed by several authors but were not included in the model because more research is needed to confirm and further characterize their roles in the pathophysiology of PD.



**Figure 3.** Probable relationship between nutritional status of Se and events that culminate in PD. Elderly individuals are susceptible to dietary imbalances that may cause inadequate nutritional Se. Inadequate levels of Se (high or low) in the brain cause co-interacted events that culminate in the death of dopaminergic neurons in



the substantia nigra; however, adequate levels of Se protect against these events. The neuronal death of dopaminergic neurons leads to PD, which affects the locomotor system. This locomotor impairment can cause damage to the lives of individuals affected by disease as well as inadequate diet. Symbols: ↑ - lead to; T - blocks.

## **CONCLUSION**

Despite being a mineral required in low amounts for the human body, an adequate level of Se might improve several aspects of human health. Se deficiencies are rarely reported, making it appear that it is a situation of little importance. However, subclinical deficiencies may impact cellular metabolism and cause changes that can lead to various diseases, including neurodegenerative conditions, if accumulated and associated with other environmental and genetic factors. Moreover, Se in excess is also associated with pathological situations. Therefore, we stress the importance of maintaining Se consumption in the recommended doses by IOM (55 - 400 µg/day for adults),<sup>29</sup> either through food or through supplements (if they are needed). This information is especially important for nutritionists and other health professionals who work with the nutritional management of subjects who are healthy as well as subjects with pathological conditions. People who live in geographical regions where the soil is rich or poor in mineral levels should receive more attention in regard to the quantities of Se ingested.

Among neurodegenerative diseases that are physiologically affected by Se levels, PD is prominent. Evidence has shown that PD is most likely the result of an association between environmental and genetic factors. People who have genetic characteristics associated with high disease risk should avoid environmental/occupational exposure to pesticides and should maintain a diet with adequate levels of antioxidants (including Se) and attitudes that can slow and prevent the onset of disease. Although the death of dopaminergic neurons as a main cause of PD has not been described until currently, new studies have shown that several other molecular events may be involved in the pathogenesis of the

disease. This fact demonstrates that the causal events of PD are still unclear and should be further studied.

Studies in humans and in experimental models support that Se is involved in the pathophysiology of PD and that the mineral, if used in appropriate doses, can protect against this disease. This effect is mainly due to the antioxidant characteristics of Se and its ability to fight the molecular events that culminate in neuronal death. However, the results of some studies have not supported these findings. These findings underscore the importance of conducting studies that aim to explore and establish the role of Se in PD in more detail. Accordingly, it will be possible to confirm the beneficial effects of using Se for the prevention or in the dietary treatment of PD. However, in the elderly, it is clear that a proper diet for age and proper Se intake according to recommendations is essential not only for the prevention of PD but for several other diseases, whether neurodegenerative or not. Lastly, based on the evaluation and discussion of the studies presented in this review, it can be concluded that continued investigations into the influence of Se on PD are important.

## REFERENCES

1. Barnard ND, Bush AI, Ceccarelli A, et al. Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014;35 Suppl 2:S74-S78.
2. Chiva-Blanch G, Badimon L, Estruch R. Latest evidence of the effects of the Mediterranean diet in prevention of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16(10):446.
3. Elenberg Y, Shaoul R. The role of infant nutrition in the prevention of future disease. *Front Pediatr*. 2014;2:73.
4. Kondo K, Ishikado A, Morino K, et al. A high-fiber, low-fat diet improves periodontal disease markers in high-risk subjects: a pilot study. *Nutr Res*. 2014;34(6):491-498.
5. Squitti R, Siotto M, Polimanti R. Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014;35 Suppl 2:S40-50.
6. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*. 2012;379(9822):1256-1268.
7. Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(3):112-120.
8. Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. 2014;6(1):25-54.

9. Maldonado PD, Perez-De La Cruz V, Torres-Ramos M, et al. Selenium-induced antioxidant protection recruits modulation of thioredoxin reductase during excitotoxic/pro-oxidant events in the rat striatum. *Neurochem Int.* 2012;61(2):195-206.
10. Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, et al. Selenium attenuates high glucose-induced ROS/TLR-4 involved apoptosis of rat cardiomyocyte. *Biol Trace Elem Res.* 2013;156(1-3):262-270.
11. Li X, Yin D, Yin J, Chen Q, Wang R. Dietary selenium protect against redox-mediated immune suppression induced by methylmercury exposure. *Food Chem Toxicol.* 2014;72:169-177.
12. Lu Z, Marks E, Chen J, et al. Altered selenium status in Huntington's disease: neuroprotection by selenite in the N171-82Q mouse model. *Neurobiol Dis.* 2014;71:34-42.
13. Naziroğlu M, Şenol N, Ghazizadeh V, Yürüker V. Neuroprotection induced by *N*-acetylcysteine and selenium against traumatic brain injury-induced apoptosis and calcium entry in hippocampus of rat. *Cell Mol Neurobiol.* 2014;34(6):895-903.
14. Yang X, Bao Y, Fu H, et al. Selenium protects neonates against neurotoxicity from prenatal exposure to manganese. *PLoS One.* 2014;9(1):e86611.
15. Şenol N, Naziroğlu M, Yürüker V. *N*-acetylcysteine and selenium modulate oxidative stress, antioxidant vitamin and cytokine values in traumatic brain injury-induced rats. *Neurochem Res.* 2014;39(4):685-692.
16. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014;29(13):1583-1590.
17. Seet RCS, Lee CYJ, Lim ECH, et al. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(4):560-566.
18. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(4):461-491.
19. Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 2013;22(1):11-17.
20. LeWitt PA, Li J, Lu M, et al. 3-hydroxykynurenine and other Parkinson's disease biomarkers discovered by metabolomic analysis. *Mov Disord.* 2013;28(12):1653-1660.
21. Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med.* 2014;16(2):217-230.
22. Boyd R. Selenium stories. *Nat Chem.* 2011;3(7):570.
23. Lemire M, Fillion M, Barbosa F, Jr, Guimarães JRD, Mergler D. Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. *Sci Total Environ.* 2010;408(19):4076-4084.
24. Combs GF, Jr. Selenium in global food systems. *Br J Nutr.* 2001;85(5):517-547.
25. Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules.* 2013;18(3):3292-3311.

26. Blazina T, Sun Y, Voegelin A, et al. Terrestrial selenium distribution in China is potentially linked to monsoonal climate. *Nat Commun.* 2014;5:4717.
27. Cominetti C, De Bortoli MC, Garrido AB, Jr, Cozzolino SMF. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutr Res.* 2012;32(6):403-407.
28. Stockler-Pinto MB, Mafra D, Farage NE, Boaventura GT, Cozzolino SMF. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. *Nutrition.* 2010;26(11-12):1065-1069.
29. IOM - Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Food and Nutrition Board. Washington, DC: National Academies Press; 2000.
30. Vinceti M, Mandrioli J, Borella P, et al. Selenium neurotoxicity in humans: bridging laboratory and epidemiologic studies. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):295-303.
31. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ.* 2008;400(1-3):115-141.
32. Gad MA, Abd El-Twab SM. Selenium toxicosis assessment (in vivo and in vitro) and the protective role of vitamin B12 in male quail (*Coturnix Coturnix*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;27(1):7-16.
33. Thiry C, Schneider YJ, Pussemier L, De Temmerman L, Ruttens A. Selenium bioaccessibility and bioavailability in Se-enriched food supplements. *Biol Trace Elem Res.* 2013;152(1):152-160.
34. Daniels LA. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 1996;54(3):185-199.
35. Rayman MP, Infante HG, Sargent M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br J Nutr.* 2008;100(2):238-253.
36. Loscalzo J. Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. *N Engl J Med.* 2014;370(18):1756-1760.
37. Arigony ALV, De Oliveira IM, Machado M, et al. The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. *Biomed Res Int.* 2013;2013:597282.
38. Speckmann B, Grune T. Epigenetic effects of selenium and their implications for health. *Epigenetics.* 2015:0.
39. Ellwanger JH, Prá D, Rieger A, Franke SIR. Influence of selenium nutritional status on the progression of HIV infection. *Nutrire.* 2011;36(2):109-122.
40. Sudfeld CR, Aboud S, Kupka R, Mugusi FM, Fawzi WW. Effect of selenium supplementation on HIV-1 RNA detection in breast milk of Tanzanian women. *Nutrition.* 2014;30(9):1081-1084.
41. Yakubov E, Buchfelder M, Eyüpoglu IY, Savaskan NE. Selenium action in neuro-oncology. *Biol Trace Elem Res.* 2014;161(3):246-254.
42. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(11):1441-1447.

43. Shchedrina VA, Everley RA, Zhang Y, et al. Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem*. 2011;286(50):42937-42948.
44. Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life*. 2014;66(4):229-239.
45. Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:41-61.
46. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3289-3303.
47. Smeyne M, Smeyne RJ. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. 2013;62:13-25.
48. Weeks BS, Hanna MS, Cooperstein D. Dietary selenium and selenoprotein function. *Med Sci Monit*. 2012;18(8):RA127-132.
49. Zhang Q, Chen L, Guo K, et al. Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and antioxidative capacity in mice. *Biol Trace Elem Res*. 2013;154(2):255-261.
50. Giacosa A, Faliva MA, Perna S, et al. Selenium fortification of an Italian rice cultivar via foliar fertilization with sodium selenate and its effects on human serum selenium levels and on erythrocyte glutathione peroxidase activity. *Nutrients*. 2014;6(3):1251-1261.
51. Ferguson LR, Karunasinghe N, Zhu S, Wang AH. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res*. 2012;733(1-2):100-110.
52. Othman AI, El Missiry MA. Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 1998;12(6):345-349.
53. Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med*. 2005;26(4-5):256-267.
54. Rahmanto AS, Davies MJ. Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants. *IUBMB Life*. 2012;64(11):863-871.
55. Song E, Su C, Fu J, et al. Selenium supplementation shows protective effects against patulin-induced brain damage in mice via increases in GSH-related enzyme activity and expression. *Life Sci*. 2014;109(1):37-43.
56. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58(3):391-402.
57. Maraldi T, Riccio M, Zambonin L, et al. Low levels of selenium compounds are selectively toxic for a human neuron cell line through ROS/RNS increase and apoptotic process activation. *Neurotoxicology*. 2011;32(2):180-187.
58. Estevez AO, Mueller CL, Morgan KL, et al. Selenium induces cholinergic motor neuron degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology*. 2012;33(5):1021-1032.
59. Kristal AR, Darke AK, Morris JS, et al. Baseline selenium status and effects of selenium and vitamin e supplementation on prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(3):djt456.
60. Lemire M, Fillion M, Frenette B, et al. Selenium from dietary sources and motor functions in the Brazilian Amazon. *Neurotoxicology*. 2011;32(6):944-953.

61. Vieira Rocha A, Cardoso BR, Cominetti C, et al. Selenium status and hair mercury levels in riverine children from Rondonia, Amazonia. *Nutrition*. 2014;30(11-12):1318-1323.
62. Zhao HW, Lin J, Wang XB, et al. Assessing plasma levels of selenium, copper, iron and zinc in patients of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2013;8(12):e83060.
63. Flax VL, Bentley ME, Combs GF, Jr, et al. Plasma and breast-milk selenium in HIV-infected Malawian mothers are positively associated with infant selenium status but are not associated with maternal supplementation: results of the Breastfeeding, Antiretrovirals, and Nutrition study. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(4):950-956.
64. Pitts MW, Byrns CN, Ogawa-Wong AN, Kremer P, Berry MJ. Selenoproteins in nervous system development and function. *Biol Trace Elem Res* 2014;161(3):231-245.
65. Li WH, Shi YC, Tseng IL, Liao VHC. Protective efficacy of selenite against lead-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2013;8(4):e62387.
66. Lamarche F, Signorini-Allibe N, Gonthier B, Barret L. Influence of vitamin E, sodium selenite, and astrocyte-conditioned medium on neuronal survival after chronic exposure to ethanol. *Alcohol*. 2004;33(2):127-138.
67. Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004;45(3):164-178.
68. Shahar A, Patel KV, Semba RD, et al. Plasma selenium is positively related to performance in neurological tasks assessing coordination and motor speed. *Mov Disord*. 2010;25(12):1909-1915.
69. Watanabe C, Satoh H. Brain selenium status and behavioral development in selenium-deficient preweanling mice. *Physiol Behav*. 1994;56(5):927-932.
70. Benton D. Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. *Nutr Neurosci*. 2002;5(6):363-374.
71. Steinbrenner H, Sies H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. *Arch Biochem Biophys*. 2013;536(2):152-157.
72. Machado MS, Rosa RM, Dantas AS, et al. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neurosci Lett*. 2006;410(3):198-202.
73. Goetz CG. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a008862.
74. De Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006;5(6):525-535.
75. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1356-1364.
76. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet*. 2009;373(9680):2055-2066.

77. Mehanna R, Moore S, Hou JG, Sarwar AI, Lai EC. Comparing clinical features of young onset, middle onset and late onset Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014;20(5):530-534.
78. Lubomski M, Louise Rushworth R, Lee W, Bertram KL, Williams DR. Sex differences in Parkinson's disease. *J Clin Neurosci.* 2014;21(9):1503-1506.
79. Kowal SL, Dall TM, Chakrabarti R, Storm MV, Jain A. The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. *Mov Disord.* 2013;28(3):311-318.
80. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39(6):889-909.
81. Dickson DW. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(8).
82. Yu H, Sternad D, Corcos DM, Vaillancourt DE. Role of hyperactive cerebellum and motor cortex in Parkinson's disease. *Neuroimage.* 2007;35(1):222-233.
83. Mazzoni P, Shabbott B, Cortés JC. Motor control abnormalities in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(6):a009282.
84. Saito Y. Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *J Clin Biochem Nutr.* 2014;54(3):138-144.
85. Ide K, Yamada H, Umegaki K, et al. Lymphocyte vitamin C levels as potential biomarker for progression of Parkinson's disease. *Nutrition.* 2015;31(2):406-408.
86. Kouti L, Noroozian M, Akhondzadeh S, et al. Nitric oxide and peroxynitrite serum levels in Parkinson's disease: correlation of oxidative stress and the severity of the disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(7):964-970.
87. Labbé C, Ross OA. Association studies of sporadic Parkinson's disease in the genomic era. *Curr Genomics.* 2014;15(1):2-10.
88. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2014;46(9):989-993.
89. Dai D, Lin P, Wang Y, et al. Association of and polymorphisms with Parkinson's disease: A meta-analysis of 15 genetic association studies. *Biomed Rep.* 2014;2(5):713-718.
90. Wang D, Zhai JX, Zhang LM, Liu DW. Null genotype of GSTT1 contributes to increased Parkinson's disease risk in Caucasians: evidence from a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2014;41(11):7423-7430.
91. Hauser DN, Hastings TG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 2013;51:35-42.
92. Martin I, Kim JW, Dawson VL, Dawson TM. LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2014;131(5):554-565.
93. Zuo L, Motherwell MS. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene.* 2013;532(1):18-23.
94. Chai C, Lim KL. Genetic insights into sporadic Parkinson's disease pathogenesis. *Curr Genomics.* 2013;14(8):486-501.
95. Searles Nielsen S, Bammler TK, Gallagher LG, et al. Genotype and age at Parkinson disease diagnosis. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2013;4(1):61-69.

96. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* 2002;10(2):119-127.
97. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 2011;119(6):866-872.
98. Wang A, Costello S, Cockburn M, et al. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol.* 2011;26(7):547-555.
99. Kamel F. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science.* 2013;341(6147):722-723.
100. Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, De Lourdes Bastos M, et al. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):85-103.
101. Kirbas A, Kirbas S, Cure MC, Tufekci A. Paraoxonase and arylesterase activity and total oxidative/anti-oxidative status in patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Clin Neurosci.* 2014;21(3):451-455.
102. Giovannelli L, Decorosi F, Dolara P, Pulvirenti L. Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain Res.* 2003;969(1-2):244-247.
103. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 2011;94(2):166-200.
104. Canugovi C, Misiak M, Ferrarelli LK, Croteau DL, Bohr VA. The role of DNA repair in brain related disease pathology. *DNA Repair (Amst).* 2013;12(8):578-587.
105. Sanders LH, Greenamyre JT. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic Biol Med.* 2013;62:111-120.
106. Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med.* 2013;62:90-101.
107. Niranjana R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol Neurobiol.* 2014;49(1):28-38.
108. Taylor JM, Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2013;62(5):803-819.
109. Celardo I, Martins LM, Gandhi S. Unravelling mitochondrial pathways to Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.* 2014;171(8):1943-1957.
110. Tsang AHK, Chung KKK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(7):643-650.
111. Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2013;106-107:17-32.
112. Müller SK, Bender A, Laub C, et al. Lewy body pathology is associated with mitochondrial DNA damage in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2013;34(9):2231-2233.



113. Sanders LH, McCoy J, Hu X, et al. Mitochondrial DNA damage: molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2014;70:214-223.
114. Janda E, Isidoro C, Carresi C, Mollace V. Defective autophagy in Parkinson's disease: role of oxidative stress. *Mol Neurobiol.* 2012;46(3):639-661.
115. Zhang H, Duan C, Yang H. Defective autophagy in Parkinson's disease: lessons from genetics. *Mol Neurobiol.* 2015;51(1):89-104.
116. Wen Z, Shu Y, Gao C, et al. CDK5-mediated phosphorylation and autophagy of RKIP regulate neuronal death in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2014;35(12):2870-2880.
117. Brenner S. Parkinson's disease may be due to failure of melanin in the Substantia Nigra to produce molecular hydrogen from dissociation of water, to protect the brain from oxidative stress. *Med Hypotheses.* 2014;82(4):503.
118. Parlato R, Liss B. How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(6):791-797.
119. Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2013;62:132-144.
120. Cornetta T, Palma S, Aprile I, et al. Levodopa therapy reduces DNA damage in peripheral blood cells of patients with Parkinson's disease. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(4):321-330.
121. Yen GC, Hsieh CL. Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997;61(10):1646-1649.
122. Adams JD, Jr, Chang ML, Klaidman L. Parkinson's disease--redox mechanisms. *Curr Med Chem.* 2001;8(7):809-814.
123. Moreira PL, Villas Boas PJF, Ferreira ALA. Association between oxidative stress and nutritional status in the elderly. *Rev Assoc Med Bras.* 2014;60(1):75-83.
124. Chen J, Guan Z, Wang L, et al. Meta-analysis: overweight, obesity, and Parkinson's disease. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:203930.
125. Jiang W, Ju C, Jiang H, Zhang D. Dairy foods intake and risk of Parkinson's disease: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Epidemiol.* 2014;29(9):613-619.
126. Kamel F, Goldman SM, Umbach DM, et al. Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014;20(1):82-87.
127. Dong J, Beard JD, Umbach DM, et al. Dietary fat intake and risk for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014;29(13):1623-1630.
128. Stelmashook EV, Isaev NK, Genrikhs EE, et al. Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochemistry (Mosc).* 2014;79(5):391-396.
129. Logroscino G, Gao X, Chen H, Wing A, Ascherio A. Dietary iron intake and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 2008;168(12):1381-1388.
130. Dorszewska J, Prendecki M, Lianeri M, Kozubski W. Molecular Effects of L-dopa Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Genomics.* 2014;15(1):11-17.
131. Peterson AL. A review of vitamin D and Parkinson's disease. *Maturitas.* 2014;78(1):40-44.

132. Ellwanger JH, Molz P, Dallemole DR, et al. Selenium reduces bradykinesia and DNA damage in a rat model of Parkinson's disease. *Nutrition*. 2015;31(2):359-365.
133. Cadet JL. The potential use of vitamin E and selenium in parkinsonism. *Med Hypotheses*. 1986;20(1):87-94.
134. Khan HA. Selenium partially reverses the depletion of striatal dopamine and its metabolites in MPTP-treated C57BL mice. *Neurochem Int*. 2010;57(5):489-491.
135. Zafar KS, Siddiqui A, Sayeed I, et al. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J Neurochem*. 2003;84(3):438-446.
136. Tian L, Zhang S, Xu L, et al. Selenite benefits embryonic stem cells therapy in the animal models of Parkinson's disease through inhibiting inflammation. *Mol Neurodegener*. 2012;7(Suppl 1):L25.
137. Nogueira CW, Rocha JBT. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol*. 2011;85(11):1313-1359.
138. Miorelli ST, Rosa RM, Moura DJ, et al. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis*. 2008;23(2):93-99.
139. Alipanah N, Varadhan R, Sun K, et al. Low serum carotenoids are associated with a decline in walking speed in older women. *J Nutr Health Aging*. 2009;13(3):170-175.
140. Gao X, Schwarzschild MA, O'Reilly EJ, Wang H, Ascherio A. Restless legs syndrome and Parkinson's disease in men. *Mov Disord*. 2010;25(15):2654-2657.
141. Rahimdel AG, Ayatollahi P, Zeinali A, Mehrabian N, Mellat-Ardekani A. The effect of selenium administration on restless leg syndrome treatment. *Iran Red Crescent Med J*. 2012;14(1):14-19.
142. Yeo JE, Kim JH, Kang SK. Selenium attenuates ROS-mediated apoptotic cell death of injured spinal cord through prevention of mitochondria dysfunction; in vitro and in vivo study. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21(1-3):225-238.
143. Akil M, Bicer M, Kilic M, et al. Effect of intraperitoneal selenium administration on liver glycogen levels in rats subjected to acute forced swimming. *Biol Trace Elem Res*. 2011;139(3):341-346.
144. Marcondes Sari MH, Guerra Souza AC, Gonçalves Rosa S, et al. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of *p*-chloro-selenosteroid. *Eur J Pharmacol*. 2014;725:79-86.
145. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem*. 2003;86(1):1-12.
146. Zhang S, Rocourt C, Cheng WH. Selenoproteins and the aging brain. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(4):253-260.
147. Sanchez V, Camarero J, O'Shea E, Green AR, Colado MI. Differential effect of dietary selenium on the long-term neurotoxicity induced by MDMA in mice and rats. *Neuropharmacology*. 2003;44(4):449-461.

148. Castaño A, Ayala A, Rodríguez-Gómez JA, et al. Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. *Neurochem Int.* 1997;30(6):549-555.
149. Kim HC, Jhoo WK, Choi DY, et al. Protection of methamphetamine nigrostriatal toxicity by dietary selenium. *Brain Res.* 1999;851(1-2):76-86.
150. Imam SZ, Ali SF. Selenium, an antioxidant, attenuates methamphetamine-induced dopaminergic toxicity and peroxynitrite generation. *Brain Res.* 2000;855(1):186-191.
151. Barayuga SM, Pang X, Andres MA, Panee J, Bellinger FP. Methamphetamine decreases levels of glutathione peroxidases 1 and 4 in SH-SY5Y neuronal cells: protective effects of selenium. *Neurotoxicology.* 2013;37:240-246.
152. Peters MM, Hill KE, Burk RF, Weeber EJ. Altered hippocampus synaptic function in selenoprotein P deficient mice. *Mol Neurodegener.* 2006;1:12.
153. Burk RF, Hill KE, Motley AK, et al. Selenoprotein P and apolipoprotein E receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. *FASEB J.* 2014;28(8):3579-3588.
154. Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, et al. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem.* 2003;278(16):13640-13646.
155. Caito SW, Milatovic D, Hill KE, et al. Progression of neurodegeneration and morphologic changes in the brains of juvenile mice with selenoprotein P deleted. *Brain Res.* 2011;1398:1-12.
156. Byrns CN, Pitts MW, Gilman CA, Hashimoto AC, Berry MJ. Mice lacking selenoprotein P and selenocysteine lyase exhibit severe neurological dysfunction, neurodegeneration, and audiogenic seizures. *J Biol Chem.* 2014;289(14):9662-9674.
157. Bellinger FP, Raman AV, Rueli RH, et al. Changes in selenoprotein P in substantia nigra and putamen in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2012;2(2):115-126.
158. Hart WE, Marczak SP, Kneller AR, French RA, Morris DL, Jr. The abilities of selenium dioxide and selenite ion to coordinate DNA-bound metal ions and decrease oxidative DNA damage. *J Inorg Biochem.* 2013;125:1-8.
159. Watanabe C, Kasanuma Y, Satoh H. Deficiency of selenium enhances the K<sup>+</sup>-induced release of dopamine in the striatum of mice. *Neurosci Lett.* 1997;236(1):49-52.
160. Romero-Ramos M, Venero JL, Cano J, Machado A. Low selenium diet induces tyrosine hydroxylase enzyme in nigrostriatal system of the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;84(1-2):7-16.
161. Aguilar MV, Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, et al. Cerebrospinal fluid selenium and chromium levels in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 1998;105(10-12):1245-1251.
162. Qureshi GA, Qureshi AA, Memon SA, Parvez SH. Impact of selenium, iron, copper and zinc in on/off Parkinson's patients on L-dopa therapy. *J Neural Transm Suppl.* 2006(71):229-236.
163. Mischley LK, Allen J, Bradley R. Coenzyme Q10 deficiency in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2012;318(1-2):72-75.

164. Younes-Mhenni S, Aissi M, Mokni N, et al. Serum copper, zinc and selenium levels in Tunisian patients with Parkinson's disease. *Tunis Med.* 2013;91(6):402-405.
165. Nikam S, Nikam P, Ahaley SK, Sontakke AV. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Indian J Clin Biochem.* 2009;24(1):98-101.
166. Vinceti M, Nacci G, Rocchi E, et al. Mortality in a population with long-term exposure to inorganic selenium via drinking water. *J Clin Epidemiol.* 2000;53(10):1062-1068.
167. Ayuso-Peralta L, Jiménez-Jiménez FJ, Cabrera-Valdivia F, et al. Premorbid dietetic habits and risk for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 1997;3(1):55-61.
168. Letavayová L, Vičková V, Brozmanová J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology.* 2006;227(1-2):1-14.
169. Brozmanová J, Mániková D, Vičková V, Chovanec M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol.* 2010;84(12):919-938.

## 5 CAPÍTULO II – Artigo de Dados Experimentais

Nas páginas seguintes encontra-se o artigo publicado no periódico *Nutrition* (ISSN: 0899-9007, Fator de Impacto - JCR 2013: 3.046) que é intitulado “*Selenium reduces bradykinesia and DNA damage in a rat model of Parkinson’s disease*”. Neste artigo estão apresentados os principais resultados obtidos durante a parte experimental realizada pelo autor durante o mestrado.



## Basic nutritional investigation

## Selenium reduces bradykinesia and DNA damage in a rat model of Parkinson's disease



Joel Henrique Ellwanger B.Nutr. <sup>a,b,c,\*</sup>, Patrícia Molz B.Nutr. <sup>c,d</sup>,  
 Danieli Rosane Dallemole <sup>b</sup>, Ariana Pereira dos Santos <sup>b</sup>, Talise Ellwanger Müller <sup>b</sup>,  
 Lucas Cappelletti <sup>b</sup>, Manoela Gonçalves da Silva <sup>b</sup>, Silvia Isabel Rech Franke Ph.D. <sup>c,d</sup>,  
 Daniel Prá Ph.D. <sup>c,d</sup>, João Antonio Pêgas Henriques Ph.D. <sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Histology and Pathology, University of Santa Cruz do Sul-UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Experimental Nutrition, University of Santa Cruz do Sul-UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil

<sup>d</sup> Graduate Program in Health Promotion, University of Santa Cruz do Sul-UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil

<sup>e</sup> Institute of Education Research, Development and Technological Innovation-ROYAL, Laboratory of Genotoxicity-GENOTOX, Porto Alegre, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 March 2014

Accepted 14 July 2014

## Keywords:

Parkinson's disease

Selenium

Paraquat

DNA damage

Locomotor activity

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to explore the effects of selenium (Se) on locomotor activity and DNA damage in a rat model of Parkinson's disease (PD) induced by paraquat (PQ).

**Methods:** Forty-eight male Wistar rats were divided into four groups: control group (n = 12), Se group (n = 12), PQ group (n = 12), and Se + PQ group (n = 12). PQ was administered intraperitoneally (10 mg/kg). Se was offered in the drinking water at a concentration of 11.18 µg/L. Locomotor activity was evaluated weekly using the narrow beam test. The comet assay was performed to assess the level of DNA damage in leukocytes and in brain cells.

**Results:** As expected, increased DNA damage was found in the PQ group compared with the control and Se groups (P < 0.001). Interestingly, coadministration of Se and PQ effectively prevented the harmful effects of the toxin in locomotor activity and at the molecular level, reducing bradykinesia (P < 0.01) and DNA damage in leukocytes compared with the PQ-only group (P < 0.001), whereas the levels of DNA damage were comparable to those found in the control and Se groups (P > 0.05). Using the comet assay to analyze brain cells, no differences were found between the groups with regard to damage index (P = 0.774), damage frequency (P = 0.817), or non-detectable cell nuclei (P = 0.481). **Conclusion:** In this experimental model of PQ-induced PD, the use of Se could contribute to the maintenance of locomotor activity and the integrity of leukocytes DNA. No changes in the levels of DNA damage in brain cells were observed between the experimental groups.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Parkinson's disease (PD) is currently the most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, with an

Financial support for this study was provided by the Laboratory of Experimental Nutrition (UNISC). JHE, SRF, DP, and JAPH conceived and designed the experiment. JHE, PM, DRD, APS, TEM, LC, and MGS performed the in vivo experiments and laboratory tests. JHE and DP analyzed the data, wrote and provided intellectual input on the paper. SRF, DP, and JAPH supervised all experiments and the manuscript preparation. All authors revised the final version of the article. The authors have no conflicts of interest to declare.

\* Corresponding author. Tel.: +55 513 717 7643; fax: +55 513 717 1855.

E-mail addresses: [Joellwanger@unisc.br](mailto:Joellwanger@unisc.br), [joel.ellwanger@gmail.com](mailto:joel.ellwanger@gmail.com) (J. H. Ellwanger).

estimated prevalence of 0.3% among the general population in industrialized countries and about 1% among people >60 y of age [1,2]. According to one study [3], the most common signs of PD are akinesia (delayed movement initiation; paucity of movements), bradykinesia (movement slowness), hypokinesia (reduced movement amplitude), postural instability, rigidity, stooped posture, and tremor at rest. The main cause of the disease is the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta [4], and DNA damage and oxidative stress may be involved in the pathophysiology of this neuronal degeneration [5–7]. In this context, the comet assay is considered a good method to measure the level of DNA damage in brain cells [8], and is widely used to measure such cellular damage in leukocytes [9].

Occupational exposure to the pesticide paraquat (PQ) is associated with increased risk for developing PD [10]. Experimentally, the use of this toxin to induce an experimental model of the disease in rats is quite effective because it causes the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra, triggering signals and morphologic changes that are very similar to those observed in patients with PD [4,11–13]. The use of locomotor tests such as the narrow beam test is considered suitable for evaluating locomotor dysfunctions in animal models of PD [14].

When used at appropriate levels, the mineral selenium (Se) is an important antioxidant agent and is therefore involved in combating oxidative stress [15,16] and may have a neuro-protective role [17–19]. Although the use of Se in the treatment of early PD was suggested in the 1980s [20], its application in the diet therapy of patients with PD has been little exploited. Thus, the present study aimed to investigate the effects of Se on locomotor activity using the narrow beam test and DNA damage in leukocytes and brain cells using the comet assay in a model of PQ-induced PD.

## Material and methods

### Animals and ethical aspects

Forty-eight male Wistar rats ages 28 to 29 d, weighing  $82.9 \pm 14.36$  g on average at the beginning of the experiment, were used in the study. The animals were kept in a laboratory environment with a controlled 12-h light/dark cycle, temperature ( $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ ) and humidity (60%). The animals received Nuvilab<sup>®</sup> rat chow (Quimitia, Colombo, Brazil) containing a minimum of 50  $\mu\text{g}$  of Se/kg of chow and water ad libitum. The animals were weighed weekly. At the end of the experiment, the animals were sacrificed using a guillotine for rodents (Insight, Ribeirão Preto, Brazil). This study was approved by the Ethics Committee for Animal Use of the University of Santa Cruz do Sul (UNISC, Brazil) under protocol 10/2012.

### Experimental design

The experiment lasted about 2 mo (58 d) and was divided into two periods of 29 d each. The work was structured so that we could assess the effects of Se (Se group: vehicle control Se,  $n = 12$ ), of PQ (PQ group: vehicle control PQ,  $n = 12$ ), and associated administration of both (Se + PQ group: cotreatment,  $n = 12$ ) on locomotor activity and DNA damage and compare them with results from a control group (water group: negative control,  $n = 12$ ) using a total of 48 animals. The DNA damage was assessed on three occasions: at the beginning (first occasion, in leukocytes), halfway (second occasion, in leukocytes), and at the end of the experiment (third occasion, in leukocytes and brain cells). The locomotor test was performed weekly and the results of all observations were pooled for analysis.

### Se administration

In this study, sodium selenite (inorganic form of Se,  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a supplementary source of the mineral. The Se was provided to the animals in the drinking water at a concentration of 11.18  $\mu\text{g}/\text{L}$  offered daily in individual drinking bottles. Based on the average water intake of Wistar rats [21], the concentration of Se was added to the drinking water to achieve the targeted dose (ranging from the recommended values and the maximum tolerated dose compared with humans, while also taking into consideration the median lethal dose ( $\text{LD}_{50}$ ) for Se [oral consumption by rats]). Then, the amount of water ingested by each animal was measured daily to verify the exact amount of Se ingested by the animals. Although it is suggested that Se in aqueous solutions is stable for up to 4 d at animal room conditions [22], we prepared and changed the solution daily. The amount of Se present in the water used to prepare the solution was negligible (data not shown). As we knew that the Se was stable in solution and we were able to perform reliable measurements of the average amount of water ingested by the animals and because this was an extensive study predicting daily administration of Se, we chose not to offer the mineral by gavage so as to minimize the stress to the animals.

### PQ administration

To perform this study we chose to use PQ as the inducing agent of the experimental model of PD because we considered it to be the most suitable and best described model [4,12,23,24] in the literature to test the hypothesis that we proposed to investigate, both in relation to the effects of PQ on locomotor

parameters and in relation to DNA damage, while also considering their possible interactions with Se. Based on previous studies [12,23,24], 10 mg/kg of PQ (methyl viologen dichloride hydrate,  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich) was administered to each animal in the PQ and Se + PQ groups once a week. Administration was intraperitoneal, and the PQ was diluted with an average volume of 0.3 mL of saline solution per animal.

### Collection and preparation of samples (leukocytes and brain cells)

To analyze the DNA damage in leukocytes, peripheral blood samples were collected from the animals' tails, except at the end of treatment when blood was collected from jugular vein. At each collection, 15  $\mu\text{L}$  of blood were mixed with 4  $\mu\text{L}$  of heparin and used to prepare the comet assay slides. To analyze possible damage in the brain cells, tissue was collected from the substantia nigra region. For this, once the animals were sacrificed, their brains were immediately removed, transferred to a Petri dish on ice, and sliced using a rat brain slicer matrix (Bonther, Ribeirão Preto, Brazil) to differentiate the areas of the encephalon. The area of interest was identified using previously described coordinates [25]. The tissue samples were placed in microtubes containing phosphate-buffered saline with 10% of dimethyl sulfoxide, where the tissue was dissociated and 60  $\mu\text{L}$  were separated for use in the comet assay. All procedures were conducted under dim yellow light to prevent DNA damage induced by ultraviolet radiation.

### The comet assay

The alkaline version of the comet assay was conducted following previously described guidelines [26]. First, microscope slides were precoated 1 d in advance with agarose. On the day of the experiment, 5  $\mu\text{L}$  of blood were added to 95  $\mu\text{L}$  of low-melting point agarose (0.75%) or 20  $\mu\text{L}$  of the brain cell suspension was mixed with 80  $\mu\text{L}$  of agarose. The cell-agarose mixture was dropped onto the slides, and coverslips were gently placed over their content. Once the agarose solidified, the coverslips were removed and the slides were placed in a freshly prepared lysis solution containing high concentrations of salt and detergent (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.2 with 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide) for 1 to 2 d under refrigeration to lyse the cells, removing the nuclear membrane and cytoplasmic contents. After this period, the slides were immersed in a pH buffer alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) for DNA unwinding and to express the alkali-labile sites as single-strand breaks. Immediately afterward, the slides were submitted to an electric current (electrophoresis), to induce the migration of the DNA fragments in the direction of the current. Then, the slides were washed with neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) and fixed. Silver nitrate [27] was used in the staining process.

For each sample, two slides were prepared and 100 cells were randomly selected and analyzed (50 per slide, 2 slides per animal) under a conventional optical microscope (magnification 400X). Based on the DNA migration, the damage was classified into five classes: From class 0 (no DNA migration) to class 4 (maximal migration) according to tail size and intensity (Fig. 1). Encouraged by the descriptions previously provided [9,28] in the slides containing brain samples, we also counted the number of non-detectable cell nuclei (possibly remnants of apoptotic cells, called "ghost comets") observed during the count (Fig. 1). The sum of this class of damage was counted separately from the 100 nucleoids with damage 0 to 4. The damage index (DI) was obtained from the sum of the individual cells sorted, ranging from 0 (no harm:  $100 \times 0$  cells) to 400 (maximum damage:  $100 \times 4$  cells). The damage frequency (DF) is presented as a percentage (%) and was calculated by the ratio of the number of cells with damage among the 100 cells analyzed [29].

### Narrow beam test

The narrow beam test was used to evaluate latency/akinesia and bradykinesia in the animals according to the a previously adapted method [14]. The beam, 100 cm long, 4 cm wide, and 2 cm thick was placed at a height of 100 cm above ground. At the opposite side from which the animal was placed at the beginning of the test, there was an entrance to a dark hiding place, which served as a stimulus for the animal to cross the bar. The time the animal took to cross the first 20 cm of the bar (used to assess latency/akinesia) and the total time the animal took to cross the entire bar (used to assess bradykinesia) were measured. The test was performed weekly. Each animal was submitted to the test three times, but if the animal failed to begin to cross the bar within 2 min it was removed from the apparatus and that test was excluded from the analysis.

### Statistical analysis

Data were analyzed and graphs were plotted using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, Inc.; San Diego, CA, USA). Data obtained from the narrow beam test were submitted to the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test and the data from the comet

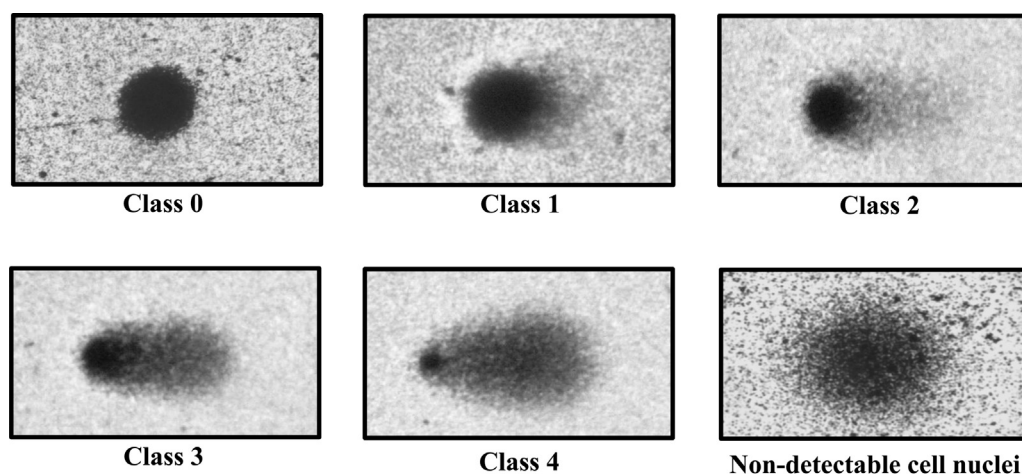


Fig. 1. Classes of DNA damage according to the DNA migration and ghost comet appearance (non-detectable cell nuclei).

assay were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. The significance level was set at  $P < 0.05$ . To show the distribution (in percentage) of the classes of DNA damage, graphs were plotted in Excel 2007 software (Microsoft Office) using the mean values of each class of damage.

## Results

### Animals, PQ effects, and Se intake

Only one rat, belonging to the PQ group, died during the experiment. Tremors and apparent impaired respiratory activity were observed in animals that received PQ. The average weight of the animals, based on the measurements taken during the course of the experiment, was 225.2 g. The average amount of water consumed daily by each animal was 42.93 mL. Thus, according to our estimate of the amount of Se present in the water, we can assume that each rat from those groups that received Se supplementation ingested 0.48  $\mu\text{g}/\text{d}$  of Se through the drinking water. Considering a daily feed intake of 6 g of chow per 100 g of body weight [21], the average intake (per animal) was 13.51 g/d, equivalent to 0.68  $\mu\text{g}$  of Se. Table 1 shows the level of Se intake by the animals in each group, the comparison with the water group

Table 1

Se Intake by animals in each group and its relation to the water group, LD<sub>50</sub> and human dietary recommendations

	Water	Se	PQ	Se + PQ
Source of Se				
Water ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw)	0	2.13	0	2.13
Diet ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw)	3.02	3.02	3.02	3.02
Total Se intake ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw)	3.02	5.15	3.02	5.15
Se intake vs water group (fold)	Reference value	1.71	1.00	1.71
Se intake vs LD <sub>50</sub> (fold)*	0.001	0.0017	0.001	0.0017
Se intake vs human RDA for Se (fold)	3.82	6.52	3.82	6.52
Se intake vs human UL for Se (fold) <sup>†</sup>	0.53	0.90	0.53	0.90

bw, body weight; LD<sub>50</sub>, lethal dose; PQ, paraquat; RDA, Recommended Dietary Allowance; Se, selenium; UL, tolerable upper intake level

\* Using the minimum value (3000  $\mu\text{g}$ ) as reference for the oral LD<sub>50</sub> of sodium selenite in rats (value range between 3,000 and 12,000  $\mu\text{g}$  Se/kg bw) [22].

<sup>†</sup> The human RDA is 55  $\mu\text{g}$  Se/d, which corresponds to 0.79  $\mu\text{g}$  Se/kg based on a 70-kg adult [30].

<sup>‡</sup> The human tolerable upper intake level (UL) is of 400  $\mu\text{g}$  Se/d that corresponds to 5.71  $\mu\text{g}$  Se/kg based on a 70-kg adult [30].

and its relationship to the LD<sub>50</sub> of Se for rats [22], human Recommended Dietary Allowance (RDA) (55  $\mu\text{g}/\text{d}$ , considered adequate intake) and the tolerable upper intake level (UL; 400  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) for the mineral [30]. In these latter two cases, comparisons were made considering an adult human with a body weight of 70 kg as reference.

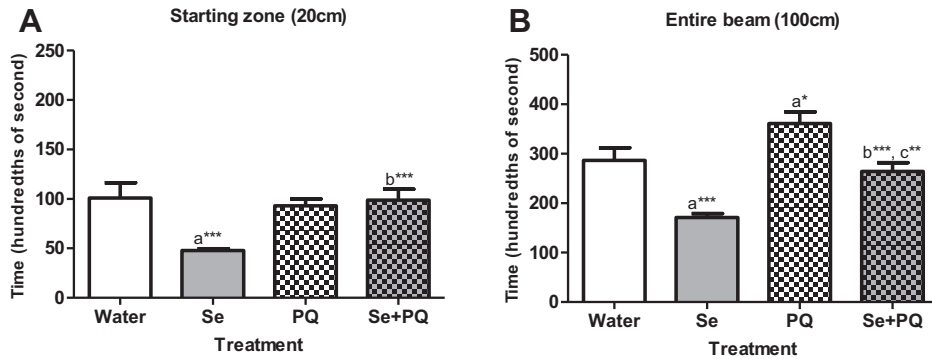
### Locomotor activity

The results obtained with the narrow beam test are shown in Figure 2. Graph A (starting zone) shows a notable reduction in the average time to initiate movements (latency/akinesia) in animals from the Se group compared with the control group (water). This finding was repeated in the mean time that the animals took to cross the entire beam (bradykinesia), as shown in graph B. Although there was no difference ( $P > 0.05$ ) in the average time spent by the animals from the PQ group to initiate the movement on the beam compared with the other groups (Fig. 2A), there was an increase in the time taken by those animals to cross the entire beam in relation to the control group (Fig. 2B). Animals from the Se + PQ group took longer to initiate and cross the beam compared with those from the Se group (Fig. 2). However, it is important to note that there was a reduction in the time taken by these animals to cross the entire beam compared with the animals that received PQ (Fig. 2B), and there was no difference ( $P > 0.05$ ) between the time spent by the Se + PQ group to initiate movement or to cross the entire bar when compared with the water group.

### DNA damage

When the comet assay was performed on the first occasion, no significant differences were observed between groups in relation to DI ( $P = 0.3981$ ) or DF ( $P = 0.4845$ ). Figure 3 shows the results of the comet assays performed on the second (A = DI and B = DF) and third (C = DI and D = DF) occasions, when the test was carried out using leukocytes. No differences ( $P > 0.05$ ) were observed between animals that received Se compared with the control group (water) in relation to DI or DF at any of the occasions (Fig. 3). There was an increase in DI and DF in animals from the PQ group compared with the Se group on both occasions (Fig. 3). This result is repeated when this comparison is made with the control group (Fig. 3B–D), with the exception of the DI



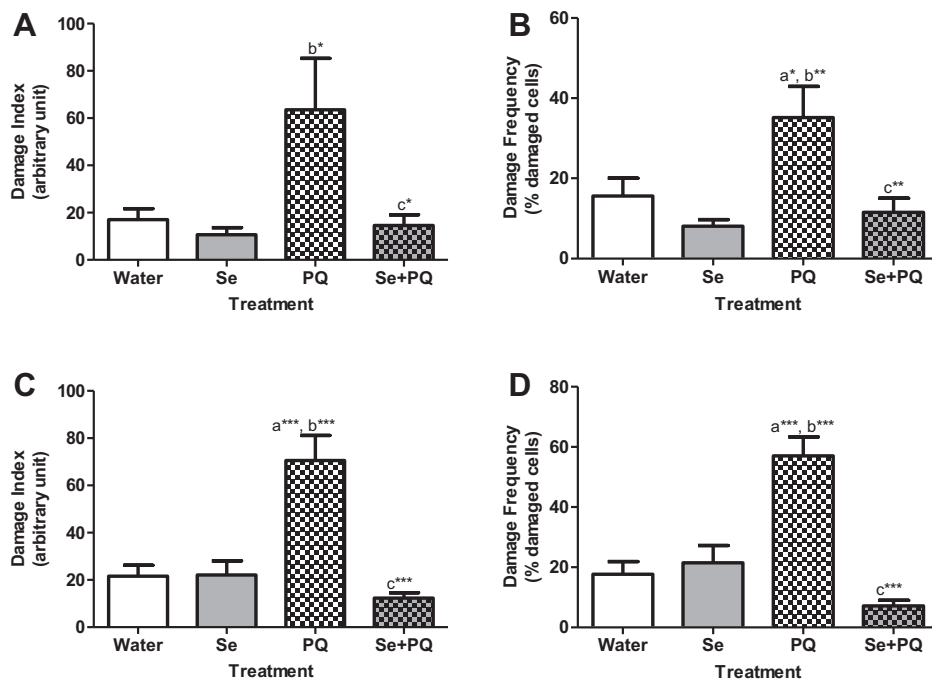


**Fig. 2.** Results (mean and SD) from the narrow beam test. (A) Time spent in the starting zone. (B) Time spent on the entire beam. Graphs plotted from the amount of data obtained with the tests performed weekly, throughout the experiment. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, being a: in relation to control; b: in relation to Se; and c: in relation to PQ at \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  or \*\*\* $P < 0.001$ . ANOVA, analysis of variance; PQ, paraquat; Se, selenium.

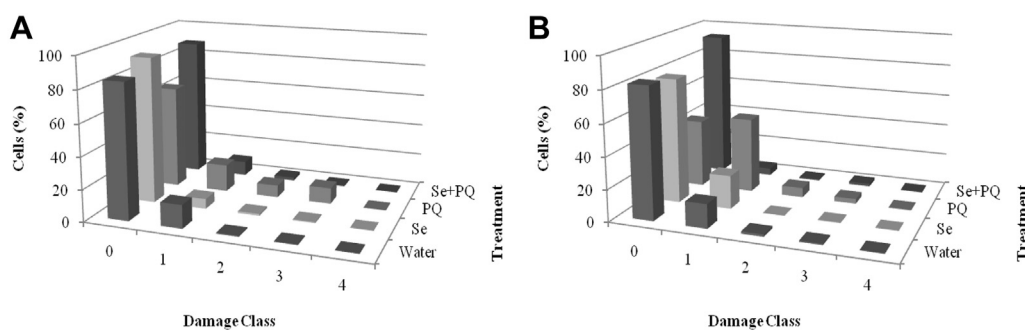
on the second occasion ( $P > 0.05$ , Fig. 3A). In the Se + PQ group, there was a reduction in both DI and DF when we compared the results from the PQ group on both occasions. Moreover, the results from the Se + PQ group did not differ significantly ( $P > 0.05$ ) from the groups that received only water or Se (Fig. 3). The distribution of damage classes (in percentages) is shown in Figure 4, where graph A refers to the second occasion and graph B refers to the third. These graphs are intended to complement the data presented in Figure 3 and also enable the visualization of the distribution of classes of damage among the experimental groups. No differences were found between the results obtained with the comet assay using brain cells in relation to DI ( $P = 0.774$ ), DF ( $P = 0.817$ ) or non-detectable cell nuclei ( $P = 0.481$ ).

## Discussion

The doses of Se ingested by the animals were well below the lowest value described for LD<sub>50</sub> of sodium selenite in rats [22], indicating there was no risk to the rats. Comparing the Se intake of the rats with the dietary recommendations for human adults, it can be observed that the amount of supplemented Se was high, 6.5 times higher than the RDA for adults, but lower than the UL, because the animals received ~90% of the tolerable limit [30]. The supplemented Se represented a 1.7-fold increase over the Se intake by controls. These data are important because they can be used as reference values for the development of future interventions and research in humans, ensuring an intervention, which despite testing an amount of Se above that recommended,



**Fig. 3.** Results (mean and SEM) from the comet assays. Graphs A: damage index and B: damage frequency refer to the second occasion the test was performed (halfway through the experiment). Graphs C: damage index and D: damage frequency refer to the third occasion the test was performed (at end of the experiment). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, being a: in relation to control; b: in relation to Se; and c: in relation to PQ at \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  or \*\*\* $P < 0.001$ . ANOVA, analysis of variance; PQ, paraquat; Se, selenium.



**Fig. 4.** Distribution of classes of DNA damage (in leukocytes) from groups on the second (A) and third (B) occasions when the comet assay was performed. Percentages calculated and graphs plotted using the mean values obtained from the damage classes from each group. PQ, paraquat; Se, selenium.

does not exceed the limit above which the use of the mineral could present a risk to human health in terms of toxicity. Information on this aspect is very useful because it is not currently known what level of Se is adequate for use in the prevention of degenerative diseases. There is evidence to suggest that intakes of 200  $\mu\text{g}$  Se/d can prevent cancer [31].

In our experiment, use of the narrow beam test showed that the animals that received PQ were slower to cross the bar (Fig. 2B), indicating that the administration of the toxin was effectively impaired locomotor function, as reported in other studies using PQ [23,32], although the animals did not take longer to start the movement compared with the control group (the animals started the movement immediately after being placed on the bar, Fig. 2A). The effects of PQ were also shown in the form of discrete (but continuous) trembling in the animals and the apparent impaired respiratory activity. The toxic effects of PQ on the lung tissue were expected, as they have been previously described [33].

The results obtained with the locomotor test also demonstrated that Se enhanced the locomotor function, as the animals were more apt to start and accomplish the locomotor tasks that were challenged compared with the animals from the water group (Fig. 2). This finding is reinforced in association with the normalization (no difference in relation to the control group) of motor activity in rats that received the combination of Se and PQ (Fig. 2), because it demonstrates a protective activity of Se against the effects caused by PQ in relation to the locomotion parameters tested in this study. It is a particularly relevant finding because it suggests Se can potentiate locomotor activity in healthy situations and also can protect against the toxic effects of PQ. Although these results were obtained with only one locomotor test and, therefore, difficult to draw further conclusions, they should encourage investigations into the use of Se in diet therapy for patients suffering with locomotor disorders such as PD. There are few descriptions of the effects of Se on locomotor function. A 1995 study [34] reported evidence that Se deficiency could cause reduced locomotor activity in rats submitted to the Open Field Test and greater latency when tested in the Morris Water Maze. However, our study appears to be the first to use the narrow beam test and show that Se contributes to the maintenance of locomotor function.

In our study, Se did not increase the amount of DNA damage in leukocytes when compared with the control group (Fig. 3). This finding is interesting because it has been reported that high doses of inorganic Se compounds may act as pro-oxidants, thus increasing the DNA damage [35]. This result, obtained with an animal model, is also clinically relevant because it suggests there is a need to conduct further epidemiologic studies and new

investigations with humans into the safe levels of the mineral to be used in clinical practice and particularly diet therapies. The increased DNA damage in the PQ group was expected (Fig. 3), as it has been previously reported in studies performed with human lymphocytes [36], algae [37], and *Drosophila melanogaster* [38] using the comet assay. Another interesting result, revealed by examining the graphs in Figure 4, is that the increased levels of damage are caused (mainly) by the accumulation of minor damage (e.g., class 1 damage) and not by the presence of severe or higher classes of damage. This indicates a homogeneous cellular injury affecting all the cells rather than strong aggression directed at only a few cells.

Studies conducted in earlier decades reported that dietary Se can act as a shield against the toxic effects of PQ [39], as well as increased pulmonary toxicity caused by PQ in rats with Se deficiency [40]. In our study, the reduction of DNA damage in the Se + PQ group (Fig. 3) is an interesting and important result because it reinforces the mineral's ability to protect the integrity of DNA, as shown in recent studies [16,41]. We believe there are two possible explanations for this result. In the first, Se may have acted as a shield and/or repaired the DNA damage caused by PQ, but the specific pathways by which this may occur are not yet known. In the second, the association of the mineral and the toxin may have potentiated the cellular damage, thus aggression triggering superactivation of the DNA repair response. The activity of Se as part of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase [42] may have induced resistance to the PQ toxicity [43,44], and one can speculate that both the cited pathways may involve the activity of this enzyme, but more studies dedicated to specifically investigate the interactions between Se and PQ need to be conducted to shed light on the biochemical interactions existing between them, and then suggest a consistent explanation for the effects observed in our research.

Although it has been reported that the comet assay constitutes a good methodologic tool for assessing the levels of aggression on DNA in brain cells [45], in our experiment the test was not effective for that purpose. The absence of any difference in the levels of DNA damage between the different groups indicates that Se, PQ, nor the combination of both was effective at increasing or decreasing the DNA damage sufficiently for it to be identified by using that technique. The fact that no differences were observed in the number of non-detectable cell nuclei (ghost comets) found in the microscope slides reinforces this suggestion. If any of the treatments had induced apoptosis at levels that could influence the findings related to the classes of damage, this difference should have been noted in the number of ghost comets. Perhaps the use of other substances caused differences that were detectable by this technique [46]. Thus, we do

not discourage the use of the comet assay when evaluating the effect of different Se compounds on DNA damage in samples from central nervous system tissue. The influence and possible protective effect of Se on the activity of brain cells in PD require further investigation with the use of animal models.

Although the results obtained from the comet assay with the brain cells cannot be fully explained, the test met our expectations regarding the assessment of the level of damage in the DNA, mainly referring to the analysis performed with leukocytes. The amount of blood collected (5  $\mu$ L/slide) in our study proved to be sufficient for the analysis because the amount of nucleoids present in the slides was adequate. However, it is important to mention that the comet assay has some limitations, such as possible variations in the method used to measure the damage, inappropriate selection of the nucleoids for evaluation, as well as problems with the standardization of the test, leukocytes storage (when appropriate), detection of apoptotic cells and assay saturation, among others [9, 47]. Still, other methods of measuring the level of DNA damage can be used, such as those previously described [48]: polymerase chain reaction, Halo assay, high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, flow cytometry, fluorescence in situ hybridization, Annexin V labeling, enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, and gas chromatography-mass spectrometry. Thus, the limitations of the comet assay and the possibility of using some of these other techniques should be considered in future studies by our and other research groups when evaluating DNA damage.

Pesticides other than PQ are also related to the development of PD, among them rotenone [10]. Se has been shown to act as a shield against the effects (oxidative stress) caused by rotenone [49], suggesting that this property of Se is not unique when tested against the deleterious effects caused by PQ. However, the association between PD, DNA damage, and other pesticides is not as well established as that already described for PQ. Therefore, further studies investigating the interaction between other pesticides related to PD, DNA damage, and Se should be performed, thus enabling a greater understanding of the pathways of interaction between Se and different pesticides that can induce PD, in experimental models or through occupational exposure.

An association of the results obtained in the locomotor test with those from the comet assay, suggests a possible complementary role for Se in the dietary treatment of patients suffering from PD and those who may not be consuming the minimum recommended dietary intake of the mineral in their food. Nevertheless, recommendation of larger amounts of the mineral than those tested in this study has yet to be investigated by other studies that should also evaluate the effects of such doses at the cellular and tissue levels as well as investigating the quantities of Se in various organs through the application of accurate techniques for metabolomics analysis such as Particle-induced X-ray emission [50], an approach that is currently being used by our research group. It is also very important to note that the conditions of PD evaluated in this study are experimental, and differ with regard to various parameters from those found in PD as it occurs in humans.

## Conclusion

This study has helped to test the hypothesis suggested in the 1980s [20] regarding the use of Se for the treatment of PD. In this sense, our results suggest that in an experimental model of PQ-induced PD, the use of Se may contribute to the maintenance of the locomotor skills tested in this study and the integrity of leukocytes DNA. No evidence of changes in the levels of DNA

damage to brain cells caused by Se, PQ, or their combination was observed using the comet assay to assess this molecular aggression.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Helen T. R. Silva, Thais E. Karnopp, and Augusto F. Weber for their help in preparing the solutions and collection of samples.

## References

- [1] Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003;348:1356–64.
- [2] De Lau LM, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006;5:525–35.
- [3] Mazzoni P, Shabbott B, Cortés JC. Motor control abnormalities in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a009282.
- [4] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889–909.
- [5] Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, et al. Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 2009;47:1049–56.
- [6] Pickrell AM, Pinto M, Hida A, Moraes CT. Striatal dysfunctions associated with mitochondrial DNA damage in dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2011;31:17649–58.
- [7] Sanders LH, Greenamyre JT. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic Biol Med* 2013;62:111–20.
- [8] Giovannelli L, Decorosi F, Dolara P, Pulvirenti L. Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain Res* 2003;969:244–7.
- [9] Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008;23:143–51.
- [10] Kamel F. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science* 2013;341:722–3.
- [11] Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res* 1999;823:1–10.
- [12] McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 2002;10:119–27.
- [13] Ossowska K, Smiałowska M, Kuter K, Wierońska J, Zieba B, Wardas J, et al. Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: implications for Parkinson's disease. *Neuroscience* 2006;141:2155–65.
- [14] Allbutt HN, Henderson JM. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 2007;159:195–202.
- [15] Ferguson LR, Karunasinghe N, Zhu S, Wang AH. Selenium and its role in the maintenance of genomic stability. *Mut Res* 2012;733:100–10.
- [16] Hart WE, Marczak SP, Kneller AR, French RA, Morris DL Jr. The abilities of selenium dioxide and selenite ion to coordinate DNA-bound metal ions and decrease oxidative DNA damage. *J Inorg Biochem* 2013;125:1–8.
- [17] Santamaría A, Salvatierra-Sánchez R, Vázquez-Román B, Santiago-López D, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, et al. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: In vitro and in vivo studies. *J Neurochem* 2003;86:479–88.
- [18] Machado MS, Rosa RM, Dantas AS, Reolon GK, Appelt HR, Braga AL, et al. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neurosci Lett* 2006;410:198–202.
- [19] Glaser V, Nazari EM, Müller YM, Feksa L, Wannmacher CM, Rocha JB, et al. Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci* 2010;28:631–7.
- [20] Cadet JL. The potential use of vitamin E and selenium in parkinsonism. *Med Hypotheses* 1986;20:87–94.
- [21] UWM-University of Wisconsin-Milwaukee. Animal specific training: rats. Available at: <[http://www4.uwm.edu/usa/acp/training/manual/manual\\_rats.cfm](http://www4.uwm.edu/usa/acp/training/manual/manual_rats.cfm)>. Accessed March 16, 2014.
- [22] Abdo KM. NTP technical report on toxicity studies of sodium selenate and sodium selenite-National Toxicology Program, Toxicity Report Series, No. 38. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 1994.
- [23] Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res* 2000;873:225–34.
- [24] Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, et al. Age-related irreversible progressive nigrostriatal

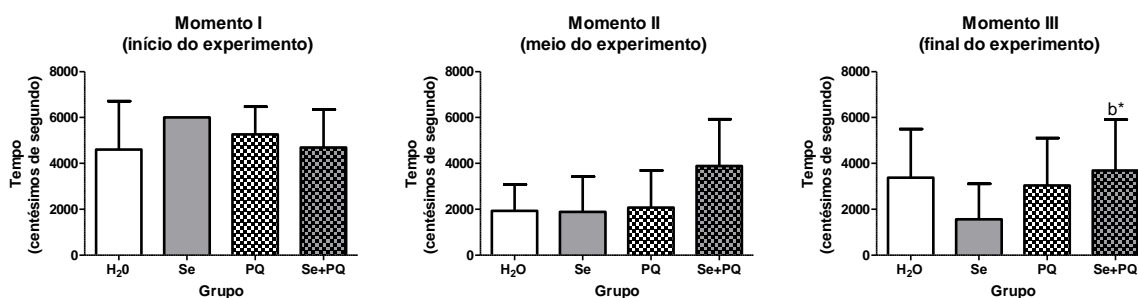
- dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci* 2003;18:589–600.
- [25] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier; 2005.
- [26] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206–21.
- [27] Prá D, Bortoluzzi A, Müller LL, Hermes L, Horta JA, Maluf SW, et al. Iron intake, red cell indicators of iron status, and DNA damage in young subjects. *Nutrition* 2001;27:293–7.
- [28] Morley N, Rapp A, Dittmar H, Salter L, Gould D, Greulich KO, et al. UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis* 2006;21:105–14.
- [29] Franke SIR, Prá D, Giulian R, Dias JF, Yoneama ML, da Silva J, et al. Influence of orange juice in the levels and in the genotoxicity of iron and copper. *Food Chem Toxicol* 2006;44:425–35.
- [30] IOM-Institute of Medicine. DRI: dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington, DC: National Academies Press; 2000.
- [31] Duffield-Lillico AJ, Dalkin BL, Reid ME, Turnbull BW, Slate EH, Jacobs ET, et al. Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *BJU Int* 2003;91:608–12.
- [32] Bagatini PB, Saur L, Rodrigues MF, Bernardino GC, Paim MF, Coelho GP, et al. The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis. *Invert Neurosci* 2011;11:43–51.
- [33] Jian X, Li M, Zhang Y, Ruan Y, Guo G, Sui H, et al. Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model. *Hum Exp Toxicol* 2010;30:460–9.
- [34] Watanabe C, Satoh H. Effects of prolonged selenium deficiency on open field behavior and Morris water maze performance in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;51:747–52.
- [35] Brozmanová J, Mániková D, Vičková V, Chovanec M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol* 2010;84:919–38.
- [36] Ribas G, Frenzilli G, Barale R, Marcos R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat Res* 1995;344:41–54.
- [37] Prado R, García R, Rioboo C, Herrero C, Abalde J, Cid A. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ Int* 2009;35:240–7.
- [38] Mehdi SH, Qamar A. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Sci* 2013;134:355–65.
- [39] Combs GF Jr, Peterson FJ. Protection against acute paraquat toxicity by dietary selenium in the chick. *J Nutr* 1983;113:538–45.
- [40] Omaye ST, Reddy KA, Cross CE. Enhanced lung toxicity of paraquat in selenium-deficient rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978;43:237–47.
- [41] Shokrzadeh M, Ahangar N, Abdollahi M, Shadboorestan A, Omid M, Payam SS. Potential chemoprotective effects of selenium on diazinon-induced DNA damage in rat peripheral blood lymphocyte. *Hum Exp Toxicol* 2013;32:759–65.
- [42] Bera S, De Rosa V, Rachidi W, Diamond AM. Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? *Mutagenesis* 2013;28:127–34.
- [43] Kelner MJ, Bagnell RD, Ugluk SF, Montoya MA, Mullenbach GT. Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase affords cellular resistance to paraquat. *Arch Biochem Biophys* 1995;323:40–6.
- [44] Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* 1998;128:1070–6.
- [45] Swain U, Subba Rao K. Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mech Ageing Dev* 2011;132:374–81.
- [46] De Prá SD, Ferreira GK, Carvalho-Silva M, Vieira JS, Scaini G, Leffa DD, et al. L-tyrosine induces DNA damage in brain and blood of rats. *Neurochem Res* 2013;39:202–7.
- [47] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26:249–61.
- [48] Kumari S, Rastogi RP, Singh KL, Singh SP, Sinha RP. DNA damage: detection strategies. *EXCLI J* 2008;7:44–62.
- [49] Khera A, Vanderlelie JJ, Perkins AV. Selenium supplementation protects trophoblast cells from mitochondrial oxidative stress. *Placenta* 2013;34:594–8.
- [50] Molz P, Ellwanger JH, Dos Santos CEI, Dias JF, De Campos D, Corbellini VA, et al. A metabolomics approach to evaluate the effects of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) treatment in undernourished young rats. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 2013;318:194–7.

## 6 RESULTADOS ADICIONAIS

Neste tópico encontram-se os resultados obtidos com os testes não citados no artigo de dados experimentais apresentado Capítulo II.

### 6.1 Teste da Força de Preensão (*Grip Strength Test*)

Na Figura 9 estão apresentados os resultados registrados durante a realização do Teste da Força de Preensão. A análise destes dados indicou diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo cotratamento (Se+PQ) e o grupo dos animais que recebeu apenas Se. Essa diferença ocorreu apenas ao final do experimento.



**Figura 9.** Resultados do Teste da Força de Preensão. *Kruskal-Wallis Test* seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*, b: em comparação ao grupo "Se", \* $p \leq 0,005$ . Resultados apresentados em média e desvio padrão.

### 6.2 Teste da Pata Impressa (*Ink Paw Test*)

Os resultados obtidos através do Teste da Pata Impressa nos três momentos nos quais o teste foi realizado foram compilados e apresentados na Figura 10.



**Tabela 7.** Resultados obtidos através da técnica PIXE.

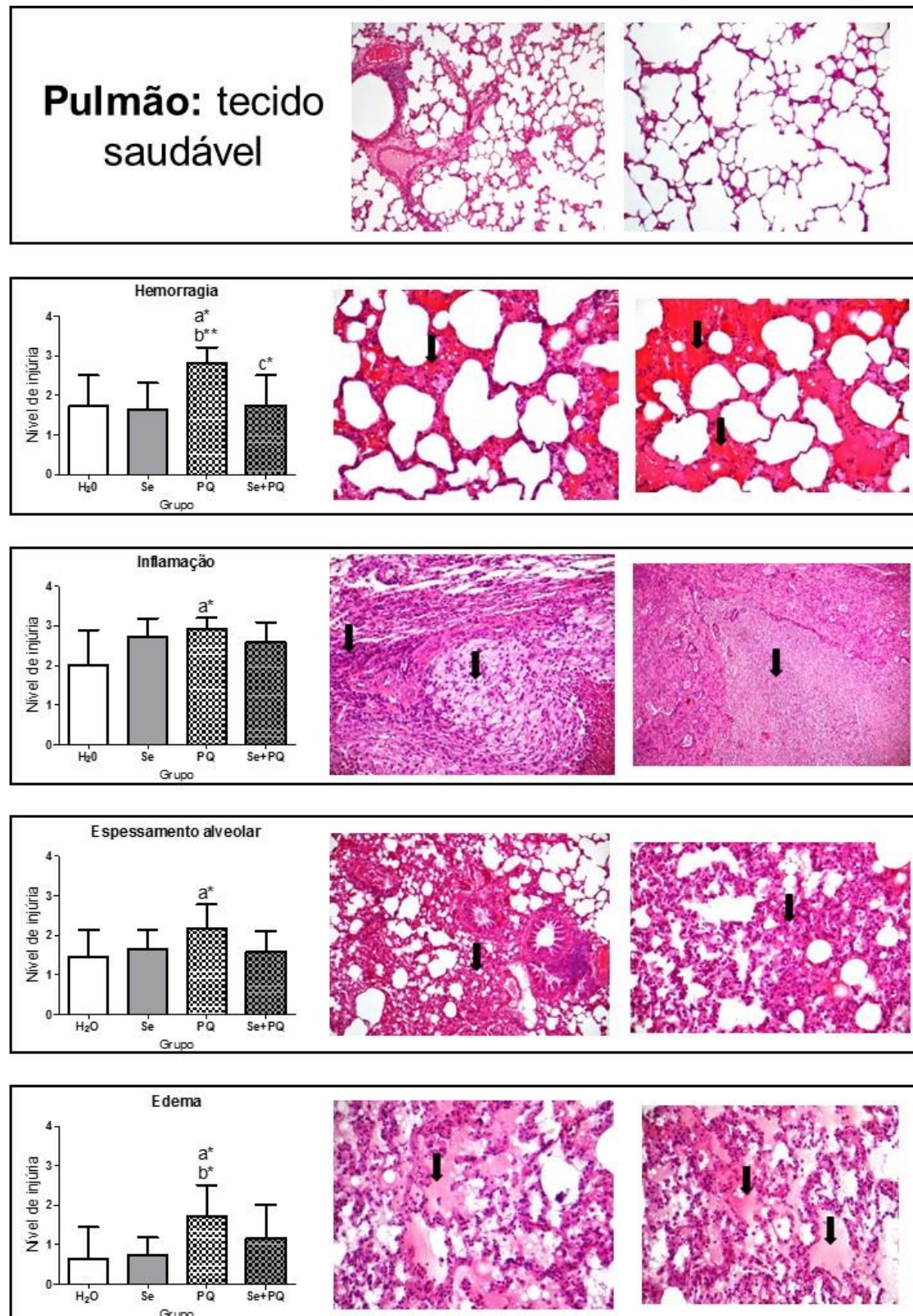
Tecido analisado	Grupo	Quantidade de Se (ppm)	% de Se em relação ao grupo controle (H <sub>2</sub> O)
Sangue	Controle negativo (H <sub>2</sub> O)	2,50	100%
	Controle – Se	4,45	178% <sup>a</sup>
	Controle – PQ	2,56	102% <sup>a</sup>
	Cotratamento (Se+PQ)	3,97	159% <sup>a</sup>
Encéfalo	Controle negativo (H <sub>2</sub> O)	2,18	100%
	Controle – Se	2,61	120% <sup>b</sup>
	Controle – PQ	1,84	84% <sup>b</sup>
	Cotratamento (Se+PQ)	2,33	107% <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Em relação ao grupo controle (H<sub>2</sub>O) na análise de sangue; <sup>b</sup>Em relação ao grupo controle (H<sub>2</sub>O) na análise de encéfalo. Em vermelho estão destacados os valores de Se (em %) que excedem aquele observado no grupo controle (H<sub>2</sub>O).

De forma resumida, os animais dos grupos que receberam Se (grupo Se e grupo Se+PQ) apresentaram em média **68,5%** a mais de Se no sangue do que o grupo controle (H<sub>2</sub>O). Já quando esta análise é realizada com os dados obtidos pelo teste realizado com o tecido encefálico, os animais que receberam Se durante o estudo apresentaram apenas **13,5%** a mais de Se neste tecido do que os animais do grupo controle.

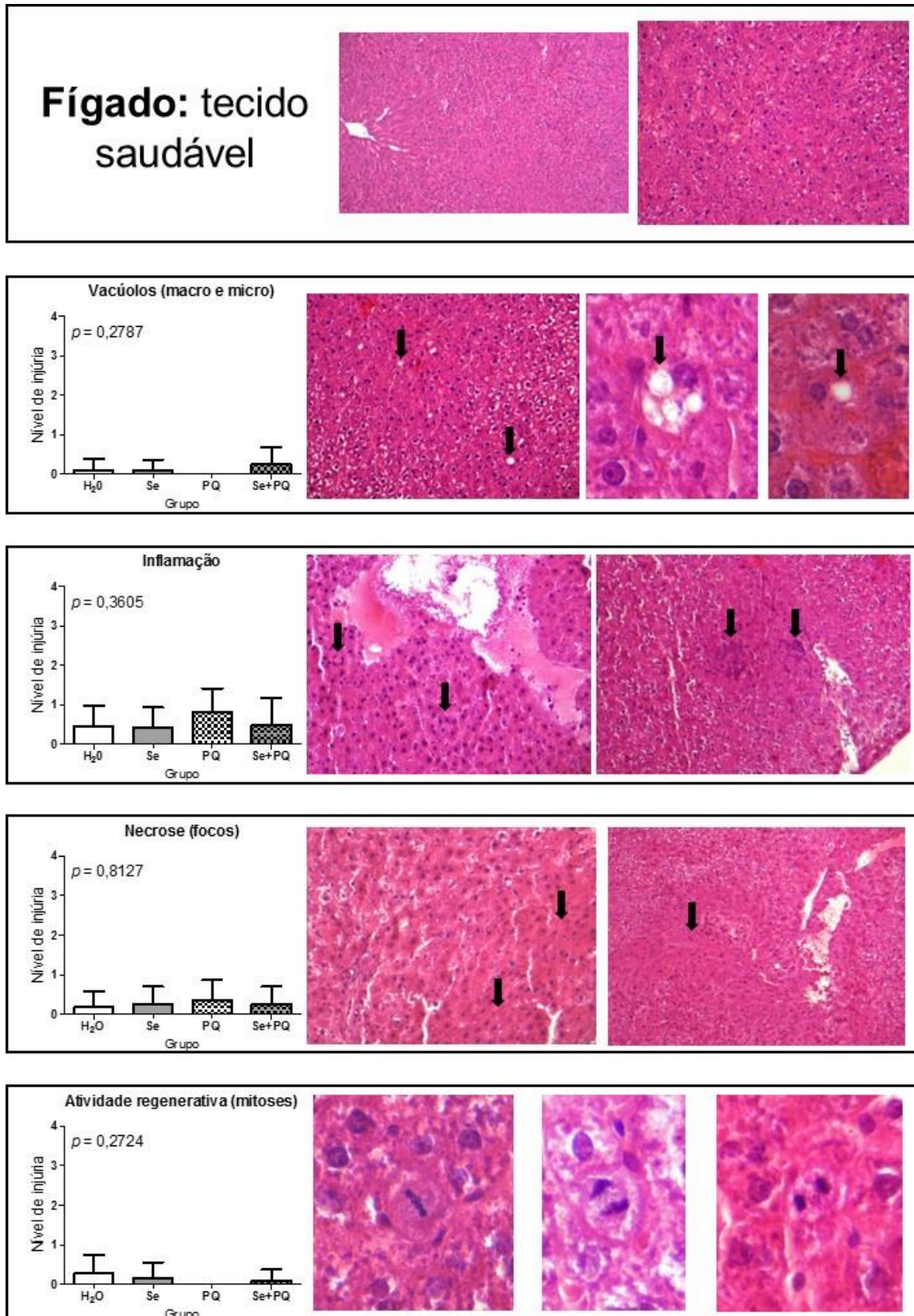
#### 6.4 Análise histopatológica

Os resultados quantitativos das análises histopatológicas estão apresentados junto com figuras que exemplificam cada uma das lesões investigadas em cada um dos órgãos, sempre acompanhadas de imagens demonstrando cortes histológicos de um tecido saudável obtido dos animais do grupo controle. As figuras referem-se aos seguintes órgãos: Figura 11 (pulmão), Figura 12 (fígado), Figura 13 (testículo) e Figura 14 (cerebelo).

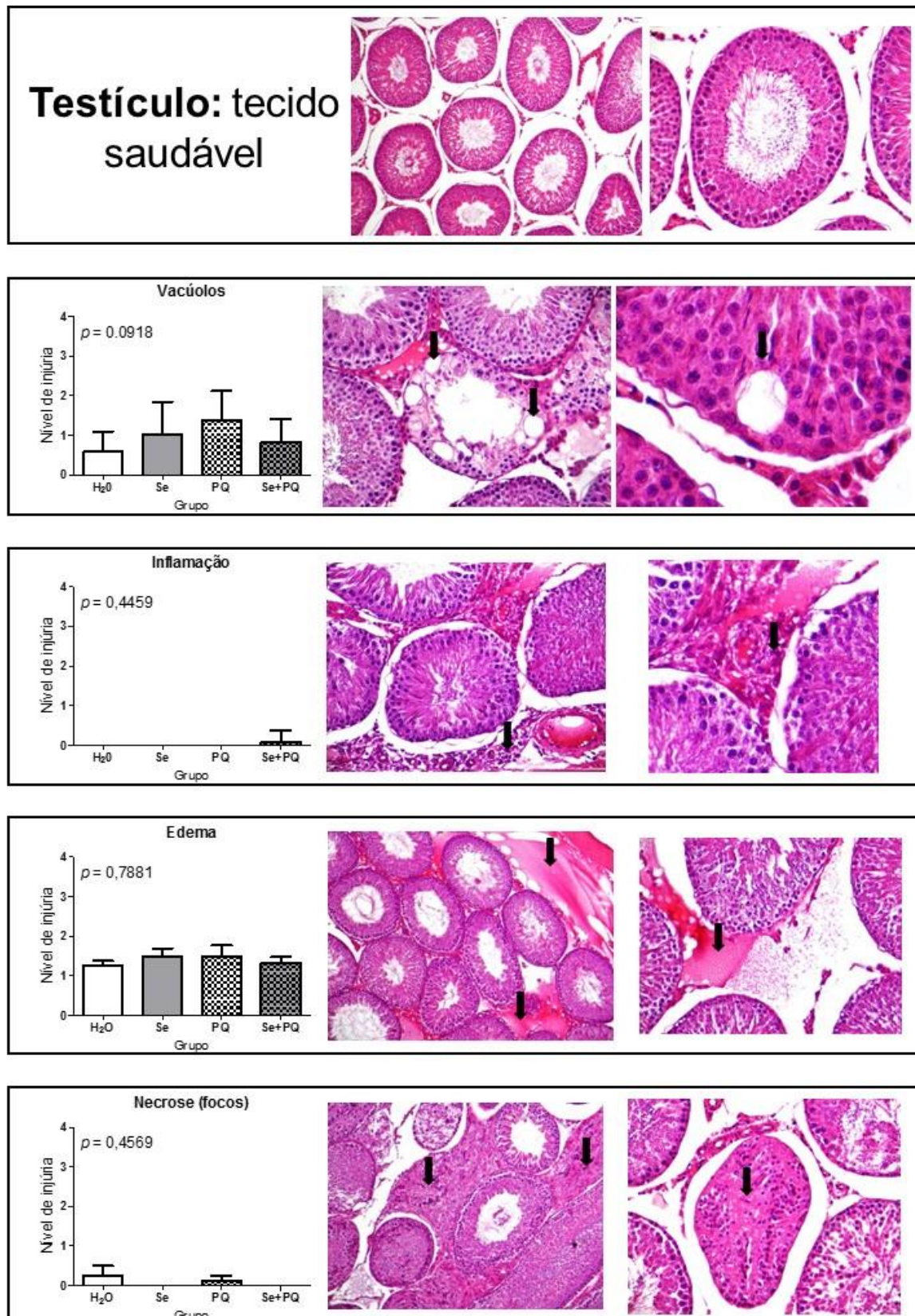


**Figura 11.** Análise histopatológica do pulmão. *Kruskal-Wallis Test* seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*. a: em comparação ao grupo "H<sub>2</sub>O"; b: em comparação ao grupo "Se"; c: em comparação ao grupo "PQ". \* $p \leq 0,005$ ; \*\* $p \leq 0,001$ . Resultados apresentados em média e desvio padrão. As setas indicam as áreas lesionadas.

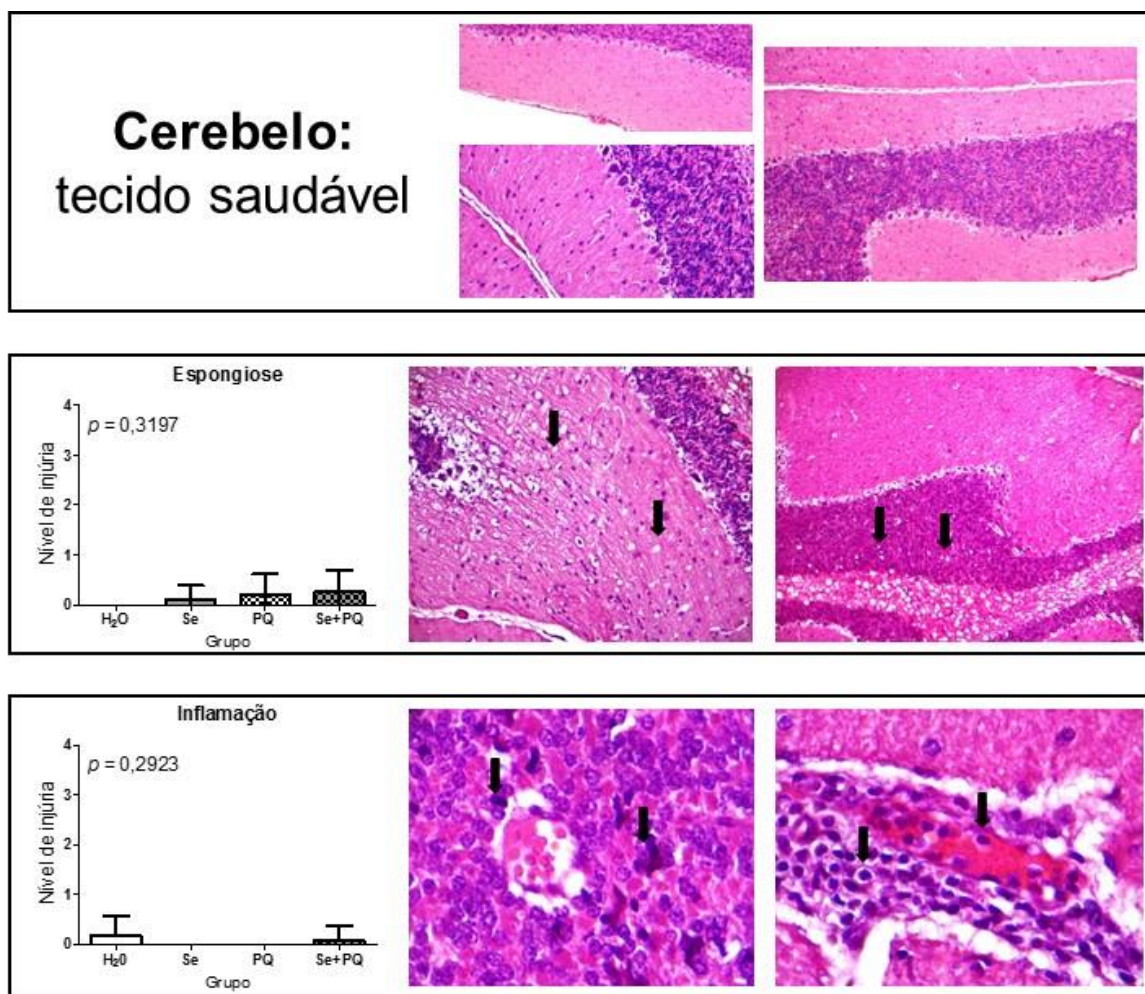




**Figura 12.** Análise histopatológica do fígado. *Kruskal-Wallis Test* seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Resultados apresentados em média e desvio padrão. As setas indicam as áreas lesionadas.



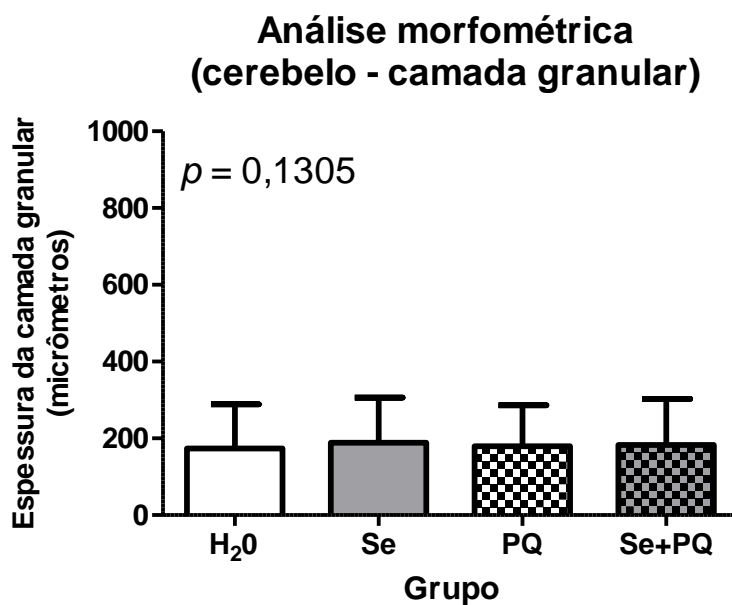
**Figura 13.** Análise histopatológica dos testículos. *Kruskal-Wallis Test* seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Resultados apresentados em média e desvio padrão. As setas indicam as áreas lesionadas.



**Figura 14.** Análise histopatológica do cerebelo. *Kruskal-Wallis Test* seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Resultados apresentados em média e desvio padrão. As setas indicam as áreas lesionadas.

## 6.5 Análise histomorfométrica

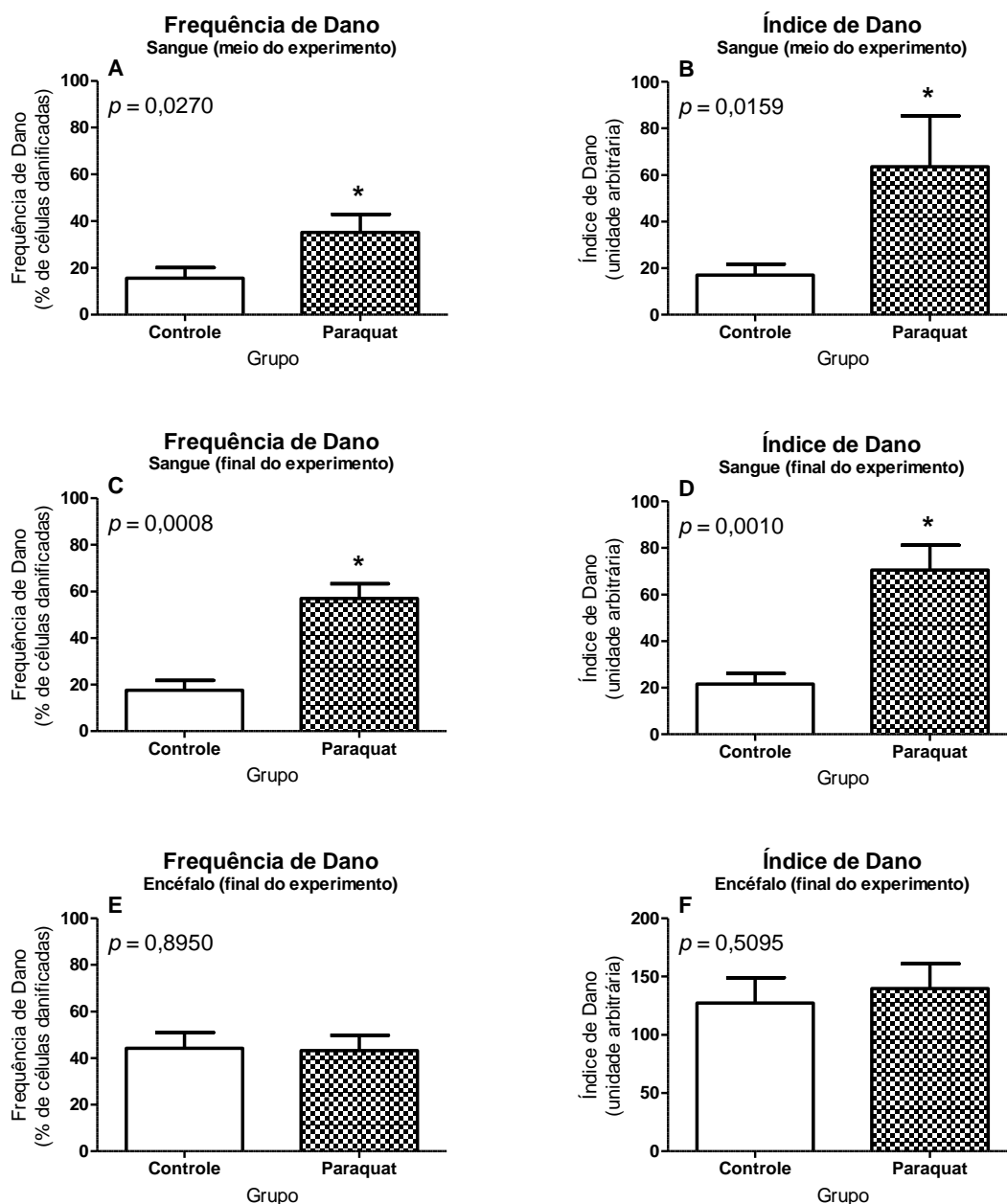
Os resultados obtidos através da análise morfométrica da camada granular do cerebelo dos animais estão apresentados na Figura 15. É interessante observar nos resultados que além da ausência de diferença estatística dos resultados é pouca a variação entre as aferições realizadas entre os grupos.



**Figura 15.** Resultados obtidos através da análise histomorfométrica da camada granular. *Kruskal-Wallis Test* seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Resultados apresentados em média e desvio padrão.

### 6.6 Ensaio Cometa com leucócitos e células do encéfalo: análise adicional

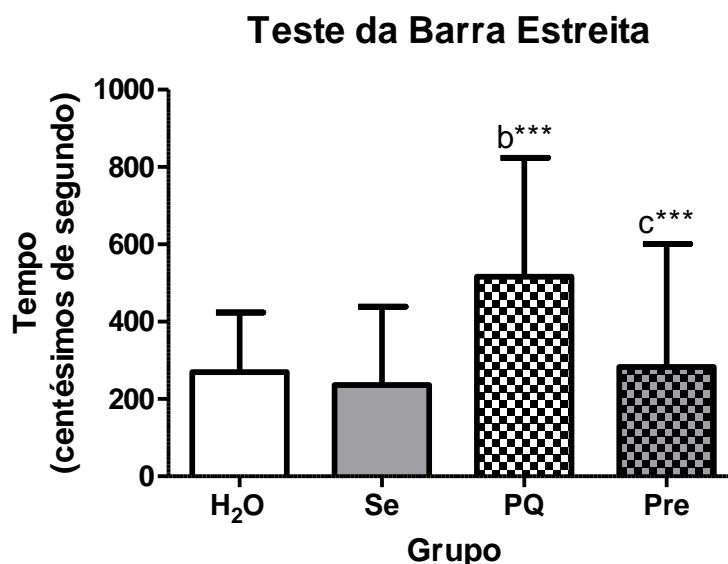
Com o objetivo de demonstrar de forma destacada os efeitos do PQ sobre os danos no DNA dos leucócitos e células do encéfalo dos animais sem considerar a influência do Se, foram comparados os dados apenas do grupo controle (H<sub>2</sub>O) com aqueles obtidos do grupo PQ (Figura 16).



**Figura 16.** Resultados do Ensaio Cometa realizado com leucócitos e células do encéfalo comparando-se apenas o grupo controle (H<sub>2</sub>O) e PQ. Os gráficos A e B apresentam os resultados do teste realizado na metade do experimento, já o gráficos C e D refere-se ao teste realizado ao final do experimento (com leucócitos em ambos os momentos). Os gráficos E e F apresentam os resultados do teste realizado ao final do experimento com células do encéfalo. Para esta abordagem de análise foi empregado o *Mann-Whitney Test*. \*Significância  $\leq 0,05$ .

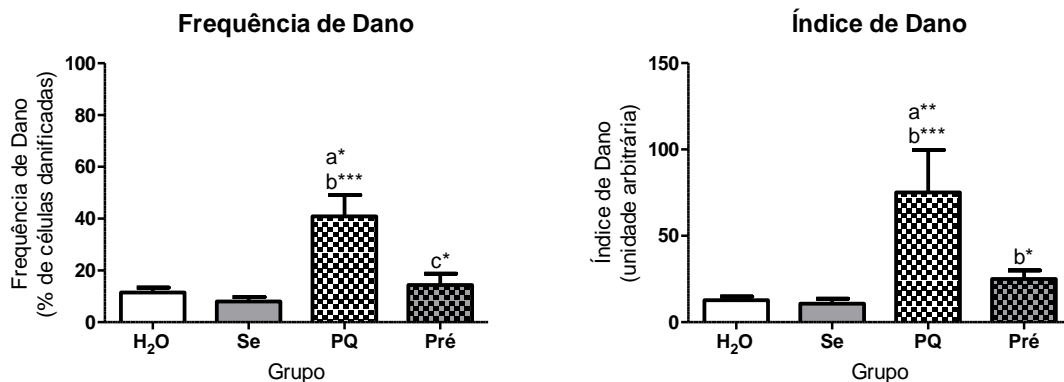
## 6.7 Resultados do Grupo 5 (Pré-tratamento)

Devido a variação experimental realizada neste grupo durante os quase dois meses de experimento (29 dias de administração de Se seguido de 29 dias de administração de PQ, ou seja, aproximadamente um mês de cada tratamento), foram comparados os resultados obtidos no grupo Pré-tratamento ao final do experimento (58º dia) com os obtidos pelos grupos 1, 2 e 3 no primeiro período de experimento (29º dia). Esta estratégia foi considerada a mais adequada para avaliar os dados deste grupo e permitiu analisar estatisticamente os resultados do Teste da Barra Estreita (Figura 17) e Ensaio Cometa com leucócitos (Figura 18).



**Figura 17.** Resultados obtidos do Teste da Barra Estreita (análise do grupo Pré-tratamento). Estão apresentados e analisados os resultados do tempo gasto pelos animais para percorrer a barra inteira. *Kruskal-Wallis Test* seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*. b: em comparação ao grupo "Se"; c: em comparação ao grupo "PQ". \*\*\* $p \leq 0,0001$ . Resultados apresentados em média e desvio padrão. Grupos H<sub>2</sub>O, Se e PQ: resultados de um teste realizado ao 29º dia de experimento. Grupo Pré-tratamento (Pré): resultados de um teste realizado ao 58º dia de experimento.

## Ensaio Cometa com Leucócitos



**Figura 18.** Resultados do Ensaio Cometa realizado com leucócitos (análise do grupo Pré-tratamento). *Kruskal-Wallis Test* seguido de *Dunn's Multiple Comparison Test*. a: em comparação ao grupo "H<sub>2</sub>O"; b: em comparação ao grupo "Se"; c: em comparação ao grupo "PQ". \* $p \leq 0,005$ ; \*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\* $p \leq 0,0001$ . Resultados apresentados em média e desvio padrão. Grupos H<sub>2</sub>O, Se e PQ: resultados do teste realizado ao 29<sup>o</sup> dia de experimento. Grupo Pré-tratamento (Pré): resultados do teste realizado ao 58<sup>o</sup> dia de experimento.

## 7 DISCUSSÃO GERAL

De acordo com os dados obtidos através da revisão de literatura apresentada nesta dissertação (Capítulo I), constata-se que a DP é uma doença bastante complexa de ser estudada, uma vez que é causada pela interação de uma série de estímulos endógenos e exógenos. Dessa forma, torna-se difícil atribuir a causa da DP a poucos fatores, pois cada um deles pode possuir uma importância diferente na fisiopatologia da doença em diferentes situações ou indivíduos. Porém, entre os fatores endógenos, os genéticos destacam-se em ordem de importância como causa da DP. Já entre os fatores exógenos, o estresse oxidativo parece ser um dos principais responsáveis pelas características fisiopatológicas da doença.

A partir do conhecimento da importância dos fatores endógenos e exógenos citados, é promissor direcionar as pesquisas para a investigação do papel desempenhado por genes específicos e seus polimorfismos nos mecanismos que ocasionam a morte dos neurônios dopaminérgicos. Já os trabalhos que investiguem formas de mitigar o estresse oxidativo com a intenção de combater o processo patológico da DP também são de grande importância. Com isso, estudos nas áreas da nutrigenética e nutrigenômica são promissores de serem empregados para conhecer as relações entre genes e nutrientes (MÜLLER e KERSTEN, 2003; MUTCH *et al.*, 2005; FENECH *et al.*, 2011; VIRMANI *et al.*, 2013), uma vez que essas abordagens permitirão investigar interações entre as características genéticas relacionadas com a DP e os nutrientes que poderão ser usados como antioxidantes em estratégias de mitigação do estresse oxidativo. Neste contexto, os estudos revisados neste trabalho suportam a hipótese de que o Se possa ser usado com este objetivo. Porém, é importante lembrar que, conforme citado anteriormente, a influência do Se na DP foi até o momento pouco explorada, pois poucos foram os trabalhos que realizaram algum tipo de associação entre a DP e o mineral. Esse fato reforça a importância da investigação teórica e experimental que foi apresentada nesta dissertação.



O modelo animal da DP empregado neste trabalho (Capítulo II) foi efetivo para estudar os objetivos propostos. O modelo se mostrou relativamente simples de ser executado e permitiu avaliar não apenas os efeitos do Se sobre características da DP, mas possibilitou ainda a análise do potencial do Se sobre os efeitos tóxicos do PQ, isoladamente e sobre diferentes critérios. Esse fato é bastante relevante, uma vez que intoxicações por PQ acidentais ou intencionais são registradas na literatura médica desde a década de 1960 (BULLIVANT, 1966; SITTIPUNT, 2005; CHOI *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2010; NEVES, 2010; WU *et al.*, 2012; GIL *et al.*, 2014). Por isso, investigar possíveis formas de tratamento para esta intoxicação mostra-se muito importante. Ainda não há um tratamento estabelecido para a intoxicação por PQ (BLANCO-AYALA *et al.*, 2014). Porém, devido ao fato do estresse oxidativo parecer ser a principal forma pela qual o PQ exerce sua toxicidade (GAWARAMMANA e BUCKLEY, 2011; BLANCO-AYALA *et al.*, 2014), o uso de nutrientes antioxidantes merece destaque entre os agentes com potencial para neutralizar os efeitos tóxicos do PQ (HONG *et al.*, 2002; SUNTRES, 2002; GAWARAMMANA e BUCKLEY, 2011; BLANCO-AYALA *et al.*, 2014). Essas informações dão ênfase à importância da investigação realizada e ajudam a explicar muitos dos resultados apresentados nesta dissertação.

Entre os parâmetros locomotores testados nos animais, a bradicinesia, aferida através do tempo que os animais levaram para atravessar a barra usada no Teste da Barra Estreita, foi maior entre os animais que receberam PQ do que aqueles do grupo controle, o que demonstrou os efeitos tóxicos do PQ ao sistema locomotor. Esse efeito foi evitado através do uso do Se, sendo que este mineral também potencializou a ação locomotora dos animais, uma vez que foi observado um menor tempo usado pelos animais para iniciar os movimentos na barra (acinesia) entre aqueles que receberam Se em comparação aos do grupo controle (Figura 2, Capítulo II). Os achados deste teste foram reforçados pelos resultados demonstrados na análise do grupo Pré-tratamento, que mostraram que o Se administrado anteriormente a administração do PQ também conferiu proteção ao sistema locomotor quando se avaliou o tempo total gasto pelos animais para cruzar a barra (bradicinesia) (Figura 17).

Apesar de ser um tema ainda pouco investigado, alguns pesquisadores já relataram que o Se é importante para o adequado funcionamento e proteção da função locomotora, podendo até mesmo potencializá-la (WATANABE e SATOH, 1994; WATANABE e SATOH, 1995; ALIPANAH *et al.*, 2009; LEMIRE *et al.*, 2011). Ainda, também já foi descrita uma correlação entre Se e performance neuromotora (SHAHAR *et al.*, 2010). Os motivos desses efeitos não são conhecidos, porém foi descrito por VALENTINE *et al.* (2005) que a ausência da SelP em camundongos nocaute acarreta a degeneração axonal. Esse dado torna possível inferir que o Se, através da ação da selenoproteína citada, exerça um papel importante na função axonal. Com isso, pode-se formular a hipótese que o Se, indiretamente, influencia na condução dos impulsos nervosos nos axônios, o que ajudaria a explicar sua influência no sistema neurolocomotor.

Em relação a força muscular dos animais, não foram observadas diferenças entre os grupos testados no início e na metade do experimento, com exceção para um aumento de força observado no grupo Se+PQ em relação ao Se, observada no teste realizado no final do experimento (Figura 9). Torna-se difícil atribuir esta diferença a um dos tratamentos testados (Se ou PQ), pois ela foi observada apenas no grupo em que tanto o Se quanto o PQ foram administrados e, ainda, o resultado significativo foi apenas em relação ao grupo Se e não em relação ao controle. Interpretando esse achado isoladamente, poder-se-ia inferir que o PQ potencializou a força dos animais na presença do Se, mas essa interpretação não deve ser considerada, uma vez que esse dado não foi encontrado no teste realizado na metade do experimento, na qual o mesmo tratamento foi utilizado e também porque não foram observadas diferenças nos demais grupos.

Apesar da força muscular ser afetada nos pacientes com DP e esse ser um dos parâmetros clinicamente avaliados nos pacientes com a doença (MAZZONI *et al.*, 2012), conforme nossos resultados, este parece ser um parâmetro que não se mostra alterado no modelo animal da DP induzido por PQ. Esses achados estão de acordo com o relatado por WIDDOWSON *et al.* (1996), que não observaram

diferença significativa nos resultados de uma versão do Teste da Força de Preensão em animais que receberam PQ em relação a controles. Porém, é relevante mencionar que no estudo desses autores a administração do PQ aconteceu de forma oral e também não induziu déficits locomotores nos animais. A partir do exposto, o Teste da Força de Preensão não se mostrou efetivo para registrar de forma adequada possíveis modificações na força muscular dos animais avaliados ou, ainda, o modelo testado não induziu essa diferença. A influência do Se e do PQ nos resultados deste teste precisa ser melhor investigado em novos trabalhos para que estes resultados sejam caracterizados com maiores detalhes.

Os resultados do Teste da Pata Impressa também podem ser considerados inconclusivos. Observando os resultados que indicaram diferença significativa entre os grupos, não se observa um padrão de alteração na marcha dos animais, sendo que no momento I (início do experimento) foi observada uma maior distância entre as patas dianteira e traseira do lado direito no grupo Se+PQ em relação aos outros três grupos, o que não era esperado, uma vez que este teste foi realizado no início do experimento, momento em que os animais não deveriam apresentar diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados. No segundo momento foram observadas diferenças significativas entre o grupo Se em relação ao grupo controle nos parâmetros “distância entre patas dianteira e traseira do lado direito” (maior distância) e “distância entre patas dianteira do lado esquerdo e dianteira do lado direito” (menor distância), o que reforça a falta de padrão nos resultados encontrado, inclusive no mesmo grupo (Figura 10).

Ainda no teste realizado na metade do experimento, o grupo PQ apresentou uma menor distância entre as patas traseira do lado esquerdo e traseira do lado direito em relação ao grupo controle. Por último, no teste realizado ao final do experimento, tanto o grupo PQ quanto o grupo Se+PQ indicaram menores distâncias entre as patas dianteira do lado esquerdo e dianteira do lado direito em relação ao grupo Se (Figura 10). Esses resultados indicam que alguns dos animais que receberam PQ apresentaram uma amplitude

de movimento mais limitada, visto a menor distância mensurada entre as patas em alguns dos parâmetros avaliados, fato que é coerente, pois sabe-se que a fisiopatologia da DP acarreta em humanos movimentos menos amplos e mais limitados (MORRIS *et al.*, 2005; LEES *et al.*, 2009; MAZZONI *et al.*, 2012). Entretanto, levando em consideração os demais resultados observados, essa não é uma conclusão possível de ser inferida. Dessa forma, levando em consideração os resultados encontrados neste teste, não foi possível obter uma conclusão sobre o efeito do Se ou do PQ sobre a marcha dos animais testados.

De acordo com os achados obtidos através dos dois testes locomotores e do teste de força realizados, considera-se que destes, apenas o Teste da Barra Estreita é o ideal para ser usado no modelo da DP empregado e avaliar os danos locomotores induzidos pelo PQ nos animais, reforçando resultados similares descritos na literatura sobre a utilização deste teste (ALLBUTT e HENDERSON, 2007). Ainda, de acordo com os objetivos propostos neste trabalho, os resultados do Teste da Barra Estreita possibilitaram observar também os efeitos do Se sobre o modelo empregado. Os outros dois testes, apesar de serem usados por diversos pesquisadores e apresentarem-se adequados para as finalidades propostas (MITRA *et al.*, 2011; ICHIKAWA-TOMIKAWA *et al.*, 2012; SCALI *et al.*, 2013), não se mostraram efetivos para avaliar diferenças entre os grupos a respeito da força ou marcha dos animais neste estudo.

Em relação aos danos no DNA, o PQ se mostrou como um agente indutor deste tipo de dano nos leucócitos dos animais, estando de acordo com o que foi descrito por outros autores em um trabalho que avaliou danos no DNA de linfócitos humanos também através do Ensaio Cometa (RIBAS *et al.*, 1995). Esse resultado é evidenciado tanto nas análises apresentadas na Figura 3 (Capítulo II), que apresenta os resultados comparando-se todos os grupos, quanto pelos resultados apresentados na Figura 16, na qual apenas os resultados do grupo PQ são comparados ao grupo controle. Neste contexto, o resultado mais interessante deste trabalho é a proteção do Se conferida ao DNA deste tipo celular (Figura 3, Capítulo II), que pode ser atribuída a ação antioxidante do Se (MALDONADO *et*

*al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; ROMAN *et al.*, 2014). Assim como citado no artigo de dados, é possível também que o Se tenha conferido proteção ao DNA através de uma estimulação da reparação do DNA (BERA *et al.*, 2013). Os resultados do grupo Pré-tratamento demonstram que esse efeito do Se é obtido também quando o mineral é administrado previamente a aplicação da toxina (Figura 18). Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de danos no DNA nos resultados do Ensaio Cometa realizado com células do tecido encefálico ao final do experimento (Capítulo II e Figura 16).

O Se desempenha um papel importante na estabilidade genômica (FERGUSON *et al.*, 2012) e sua deficiência induz efeito genotóxico (GRAUPNER *et al.*, 2015). Essas informações indicam que os níveis corporais de Se influenciam no grau de proteção ao DNA exercida pelo mineral. Neste contexto, os resultados do Ensaio Cometa podem ser explicados pelo fato de que, conforme o esperado, os níveis de Se no sangue foram maiores nos grupos de animais que receberam o mineral (Se e Se+PQ) em comparação ao grupo controle, porém não apresentaram um aumento tão expressivo no encéfalo dos animais (Tabela 7). Este resultado é fisiologicamente coerente, pois os níveis de Se no encéfalo podem não corresponder a aqueles observados no sangue (KRISHNAN e RANI, 2014). Com isso, a proteção contra os danos no DNA dos leucócitos atribuída ao Se justifica-se.

No encéfalo, além dos níveis de Se não serem tão altos entre os animais que receberam o mineral comparando-se aos níveis encontrado no sangue (Tabela 7), os danos no DNA podem ter sido reparados com maior rapidez do que nos leucócitos em resposta aos altos níveis de estresse oxidativo causados pelo PQ, dificultando a detecção dos danos pelo Ensaio Cometa. Essa hipótese é possível, uma vez que já foi descrito que as enzimas de reparação de DNA OGG1,  $\beta$ OGG1, MUTY e MTH1 podem ser encontradas em níveis maiores do que o normal na substância negra de pacientes com DP (CANUGOVI *et al.*, 2013). Esse achado poderia ser esclarecido com os resultados do Ensaio Cometa com cinética de reparo, que apensar de ter sido realizado tanto com as células do

encéfalo como com os leucócitos, tiveram seus resultados excluídos das análises, pois foram considerados não adequados de serem apresentados em razão de que tiveram seus resultados afetados por problemas metodológicos durante a realização do teste (dados não apresentados). Também existe a possibilidade do Ensaio Cometa na sua versão convencional não ter sido sensível para detectar danos no DNA nas células do encéfalo, apesar desta hipótese ser improvável, pois este teste é amplamente considerado adequado para ser desenvolvido com células nervosas (GIOVANNELLI *et al.*, 2003; PICADA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2007; CONSIGLIO *et al.*, 2010; GREGGIO *et al.*, 2011; SWAIN e SUBBA RAO, 2011, De MELO *et al.*, 2012). A hipótese de que o DNA das células encefálicas poderia ter sido danificado pelo PQ ao ponto de induzir as células e entrarem em vias de apoptose não foi sustentada na análise preliminar realizada neste trabalho, uma vez que não foram encontradas diferenças entre o número de nucleoides indicativos de morte celular entre os grupos (Capítulo II). Porém, este tipo de análise é apenas indicativa de morte celular, com isso, a realização de testes mais sensíveis para a indicação de morte celular (ver tópico Perspectivas) poderão ajudar a esclarecer os resultados do Ensaio Cometa realizado com as células encefálicas.

Dos órgãos analisados em nível tecidual, apenas o pulmão apresentou modificações morfológicas significativamente diferentes, sendo estas presentes nos animais do grupo PQ em relação ao grupo controle nas quatro lesões avaliadas. Ainda, nos critérios “hemorragia” e “edema” essa diferença também foi significativa em relação ao grupo Se. É importante ressaltar que em nenhum dos critérios histopatológicos avaliados os resultados do grupo Se foram diferentes daqueles apresentados pelo grupo controle, indicando que o Se não induziu nenhuma alteração tecidual. O grupo Se+PQ não se mostrou significativamente diferente dos grupos controle ou Se, indicando que o Se conferiu proteção em nível tecidual contra os efeitos do PQ (Figura 11). Em relação ao critério “hemorragia”, é importante citar que este achado pode ser um artefato gerado no momento da coleta do tecido (KADOKURA *et al.*, 1995; BINDHU *et al.*, 2013) que,

durante o corte das amostras de pulmão, pode ter sido ocasionado pelo extravasamento acidental de sangue para os alvéolos.

Também em relação aos efeitos do PQ no pulmão, destaca-se a intensidade do infiltrado inflamatório e do espessamento alveolar observados no órgão dos animais do grupo PQ (Figura 11). Esse achado evidencia a toxicidade do PQ ao tecido pulmonar, fato amplamente relatado na literatura (HANTSON *et al.*, 2008; DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; JIAN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; AMIRSHAHROKHI, 2013; AMIRSHAHROKHI e BOHLOOLI, 2013; GIL *et al.*, 2014). A lesão pulmonar é uma das principais características da intoxicação pelo PQ, sendo que a morte das células pulmonares é devida aos danos no DNA induzidos pelo PQ, o que sugere que este tipo celular não possui um sistema de reparação de DNA eficiente (DUŠINSKÁ *et al.*, 1998). Também é descrito que o PQ reduz a atividade da GPx neste tecido (TSUKAMOTO *et al.*, 2002), uma enzima de grande importância para o combate dos efeitos tóxicos do PQ (KELNER *et al.*, 1995; CHENG *et al.*, 1998). De acordo com o exposto, a capacidade do Se de potencializar a ação da GPx (BERMINGHAM *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014) explica a proteção que o Se exerceu no tecido pulmonar contra os efeitos tóxicos do PQ.

Não foram encontradas alterações teciduais nos outros órgãos avaliados neste trabalho (Figura 12, 13 e 14), porém deve-se citar que outros pesquisadores já relataram efeitos tóxicos do PQ ao fígado (DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2009; AMIRSHAHROKHI e BOHLOOLI, 2013; COSTA *et al.*, 2013), testículo (FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2006; MANTECCA *et al.*, 2006) e células cerebelares (GONZÁLEZ-POLO *et al.*, 2004). Esses achados foram os responsáveis por motivar a análise histopatológica realizada nestes outros três órgãos. É possível que os tipos de lesões investigadas no presente estudo não tenham sido sensíveis aos possíveis efeitos causados pela toxina, mas que talvez seriam encontrados caso outros tipos de lesões fossem investigadas através de técnicas mais específicas como a imuno-histoquímica.

Conforme citado anteriormente, a motivação para realizar a análise histomorfométrica do cerebelo partiu do fato de que é conhecido que essa estrutura encefálica pode ter um envolvimento na DP (YU *et al.*, 2007; WU e HALLETT, 2013) e que a perda de células cerebelares pode acarretar em distúrbios do movimento (SØRENSEN *et al.*, 2000; BOLDUC e LIMPEROPOULOS, 2009; JHA *et al.*, 2012; BASSON e WINFGATE, 2013). Ainda, também já foi mostrado que o Se apresenta um papel de proteção das células cerebelares (BEN AMARA *et al.*, 2009), fato que estimulou mais ainda a realização desta análise como parte da estratégia experimental proposta. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos em relação a espessura da camada granular do cerebelo (Figura 15). Isso evidencia que o PQ, no modelo avaliado, não causa morte celular em um nível suficiente para acarretar modificações morfológicas em escalas possíveis de serem detectados em análises morfométricas. Apesar de não ter sido encontrada diferença entre os grupos, o uso de testes histomorfométricos não é desencorajado, uma vez que esta é uma forma de complementar as análises histopatológicas e ajudar na descrição de características histológicas de diferentes tecidos (DHAR *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; De CAMPOS *et al.*, 2013; ELLWANGER *et al.*, 2013; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

Analisando todos os resultados deste trabalho, pode-se considerar que não apenas os efeitos do Se sobre um modelo da DP foi testado. Além disso, foi possível analisar isoladamente os efeitos do PQ e do Se em uma perspectiva toxicológica. Considerando os resultados dentro da primeira perspectiva, o Se apresentou um efeito protetor contra danos locomotores e no DNA de leucócitos dos ratos submetidos ao modelo experimental da doença, o que reforça o conceito de que o Se pode ser um agente com grande potencial para ser utilizado no tratamento dietoterápico de pacientes com DP, principalmente para combater os danos causados pelo estresse oxidativo envolvido na fisiopatologia desta desordem neurodegenerativa. Já na perspectiva da toxicologia, os resultados indicaram que o Se possui uma potencial ação de combate aos efeitos tóxicos ocasionados pelo PQ. Esses resultados são muito importantes em uma



perspectiva translacional e corroboram achados similares já apresentado em outros estudos (CAGEN e GIBSO, 1977; OMAYE *et al.*, 1978; COMBS e PETERSON, 1983; TAKIZAWA *et al.*, 2007). O uso de suplementos de Se para se obter de forma equivalente em humanos o nível de mineral testado experimentalmente neste trabalho deve ser levado em consideração em futuros estudos envolvendo populações/indivíduos que não consigam obtê-lo através da alimentação.

Muitos dos resultados aqui apresentados são bastante promissores, porém é essencial ressaltar que eles são provenientes de uma modelo animal da DP. Por isso, antes de serem usados como subsídio teórico para serem empregados em estratégias dietoterápicas em humanos, devem ser melhor caracterizados experimentalmente, principalmente através de pesquisas envolvendo humanos, como estudos epidemiológicos, por exemplo. Entretanto, este trabalho reforça a importância da manutenção de um adequado estado nutricional de Se em pacientes afetados pela DP ou em indivíduos com histórico familiar da doença.

Ainda, o presente estudo destaca-se pela abrangência nos tipos de análises realizadas e pela integração de resultados de diferentes experimentos. Foram avaliadas modificações moleculares (danos no DNA), fisiológicos (níveis de Se no sangue e encéfalo), celulares e teciduais (análise histopatológica e morfométrica), locomotoras (testes de locomoção) e na força dos animais. A integração desses diferentes critérios torna este trabalho útil para pesquisadores de uma grande diversidade de áreas do conhecimento.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho indicaram que o Se é um mineral com um importante potencial para a prevenção e tratamento da DP e dos efeitos tóxicos causados pelo PQ. De forma mais específica, as abordagens de pesquisa apresentadas nesta dissertação permitem diferentes conclusões obtidas através das estratégias teórica e experimental desenvolvidas. Dessa forma:

**(I)** Conforme as análises teóricas realizadas neste trabalho, conclui-se que:

- O DP é uma doença com múltiplas causas, sendo que fatores genéticos e o estresse oxidativo destacam-se entre elas;

- Por possuir efeito antioxidante e neuroprotetor o Se é um agente com potencial de ser usado para a prevenção e combate da DP. Porém, poucos estudos foram realizados até o momento sobre este aspecto;

- Trabalhos investigando o potencial uso dietoterápico do Se no tratamento de indivíduos com DP devem ser estimulados.

**(II)** Em relação aos resultados obtidos neste estudo através da aplicação do modelo experimental da DP induzido por PQ, conclui-se que:

- O Teste da Barra Estreita é adequado para avaliar os efeitos locomotores de ratos submetidos ao modelo experimental;

- O Se possuiu a capacidade de prevenir contra a bradicinesia causada pelo PQ nos animais testados e potencializar o ato de iniciar os movimentos;

- O Se foi capaz de mitigar os danos no DNA de linfócitos causados pelo uso do PQ;

- Neste trabalho não foram encontradas alterações nos níveis de danos no DNA em células do encéfalo dos animais dos grupos avaliados;

- O uso do Se causou uma elevação nos níveis de mineral circulante no sangue dos animais expressivamente maior do que aquela encontrada no tecido encefálico;

- Em relação às lesões histopatológicas avaliadas, o PQ causou danos teciduais ao pulmão, mas não ao fígado, testículos e cerebelo dos animais;

- Os efeitos tóxicos do PQ ao tecido pulmonar foram atenuados pelo Se;

- O PQ não foi capaz de causar mudanças na espessura da camada granular do cerebelo dos animais;

Por fim, mais estudos experimentais avaliando os critérios testados neste trabalho devem ser conduzidos. Isso permitirá explorar, refinar e melhor caracterizar os resultados relatados neste trabalho.

## 9 PERSPECTIVAS

Abaixo estão listadas algumas análises que são possíveis de serem conduzidas com o objetivo de complementar os resultados citados nesta dissertação:

- Realizar análise imuno-histoquímica com as fatias (já emblocadas em parafina histológica) de encéfalo dos animais usados no estudo para marcação de morte celular (usando anti-Anexina V, por exemplo) no cerebelo e redução de neurônios dopaminérgicos (usando anti-Tirosina Hidroxilase) na região da substância negra;

- Executar a técnica *Western Blot* para Tirosina Hidroxilase objetivando avaliar a redução de neurônios dopaminérgicos com amostras de encéfalo dos animais (armazenadas em ambiente -80°C);

- Avaliar indicadores de atividade antioxidante com amostras armazenadas de tecidos dos animais (pulmão, fígado e testículos).

## 10 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S. & REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6): RA141-RA147, 2004.

ABDULLAH, R.; BASAK, I.; PATIL, K. S.; ALVES, G.; LARSEN J. P. & MØLLER, S. G. Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. *Experimental Gerontology*, [Epub ahead of print], 2014.

ADAMS, J. D. Jr.; CHANG, M. L. & KLAIDMAN, L. Parkinson's disease - Redox mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 809-814, 2001.

AGUILAR, M. V.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F. J.; MOLINA, J. A.; MESEGUER, I.; MATEOS-VEJA, C. J.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; De BUSTOS, F.; GÓMEZ-ESCALONILLA, C.; ORT-PAREJA, M.; ZURDO, M. & MARTÍNEZ-PARA, M. C. Cerebrospinal fluid selenium and chromium levels in patients with Parkinson's disease. *Journal of Neuronal Transmission*, 105(10-12): 1245-1251, 1998.

ALIPANAH, N.; VARADHAN, R.; SUN, K.; FERRUCCI, L.; FRIED, L. P. & SEMBA, R. D. Low serum carotenoids are associated with a decline in walking speed in older women. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 13(3): 170-175, 2009.

ALLBUTT, H. N. & HENDERSON, J. M. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 159(2): 195-202, 2007.

AMIRSHAHROKHI, K. & BOHLOOLI, S. Effect of methylsulfonylmethane on paraquat-induced acute lung and liver injury in mice. *Inflammation*, 36(5): 1111-1121, 2013.

AMIRSHAHROKHI, K. Anti-inflammatory effect of thalidomide in paraquat-induced pulmonary injury in mice. *International Immunopharmacology*, 17(2): 210-215, 2013.

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine*, 10: S18-S25, 2004.

ARMSTRONG, M. J.; GRUBER-BALDINI, A. L.; REICH, S. G.; FISHMAN, P. S.; LACHNER, C. & SHULMAN, L. M. Which features of Parkinson's disease predict earlier exit from the workforce? *Parkinsonism and Related Disorders*, 20: 1257-1259, 2014.

ASCHERIO, A.; CHEN, H.; WEISSKOPF, M. G.; O'REILLY, E.; McCULLOUGH, M. L.; CALLE, E. E.; SCHWARZSCHILD, M. A. & THUN, M. J. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 60(2): 197-203, 2006.

BALTAZAR, M. T.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; De LOURDES BASTOS, M.; TSATSAKIS, A. M.; DUARTE, J. A. & CARVALHO, F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases - A mechanistic approach. *Toxicology Letters*, 230(2): 85-103, 2014.

BAPTISTA, P. P.; De SENNA, P. N.; PAIM, M. F.; SAUR, L.; BLANK, M.; Do NASCIMENTO, P.; ILHA, J.; VIANNA, M. R. M.; MESTRINER, R. G.; ACHAVAL, M. & XAVIER, L. L. Physical exercise down-regulated locomotor side effects induced by haloperidol treatment in Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 104: 113-118, 2013.

BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M. C. Q.; GUERRA, H. L.; LIMA-COSTA, M. F. & CARDOSO, F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). *Movement Disorders*, 21(6): 800-808, 2006.

BARZILAI, A. & MELAMED, E. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *TRENDS in Molecular Medicine*, 9(3): 126-132, 2003.

BASSON, M. A. & WINGATE, R. J. Congenital hypoplasia of the cerebellum: developmental causes and behavioral consequences. *Frontiers in Neuroanatomy*, 7: 29, 2013.

BEN AMARA, I.; FETOUI, H.; GUERMAZI, F. & ZEGHAL, N. Dietary selenium addition improves cerebrum and cerebellum impairments induced by methimazole in suckling rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27(7): 719-726, 2009.

BENITO-LEÓN, J.; LOUIS, E. D.; VILLAREJO-GALENDE, A.; ROMERO, J. P. & BERMEJO-PAREJA, F. Under-reporting of Parkinson's disease on death certificates: A population-based study (NEDICES). *Journal of the Neurological Sciences*, 347(1-2): 188-192, 2014.

BENTLEY-HEWITT, K. L.; CHEN, R. K. Y.; LILL, R. E.; HEDDERLEY, D. I.; HERATH, T. D.; MATICH, A. J. & MCKENZIE, M. J. Consumption of selenium-enriched broccoli increases cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated ex vivo, a preliminary human intervention study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(12): 2350-2357, 2014.

BERA, S.; De ROSA, V.; RACHIDI, W. & DIAMOND, A. M. Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? *Mutagenesis*, 28(2): 127-134, 2013.

BERMINGHAM, E. N.; HESKETH, J. E.; SINCLAIR, B. R.; KOOLAARD, J. P. & ROY, N. C. Selenium-enriched foods are more effective at increasing glutathione peroxidase (GPX) activity compared with selenomethionine: A meta-analysis. *Nutrients*, 6(10): 4002-4031, 2014.

- BINDHU, P.; KRISHNAPILLAI, R.; THOMAS, P. & JAYANTHI, P. Facts in artifacts. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 17(3): 397-401, 2013.
- BLANCO-AYALA, T.; ANDÉRICA-ROMERO, A. C. & PEDRAZA-CHAVERRI, J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radical Research*, 48(6): 623-640, 2014.
- BOLDUC, M. E. & LIMPEROPOULOS, C. Neurodevelopmental outcomes in children with cerebellar malformations: a systematic review. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 51(4): 256-267, 2009.
- BOYD, R. Selenium stories. *Nature Chemistry*, 3(7): 570, 2011.
- BRANCO, D. M.; ARDUINO, D. M.; ESTEVES, A. R.; SILVA, D. F. F.; CARDOSO, S. M. & OLIVEIRA, C. R. Cross-talk between mitochondria and proteasome in Parkinson's disease pathogenesis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2: 17, 2010.
- BREYDO, L.; WU, J. W. & UVERSKY, V. N.  $\alpha$ -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(2): 261-285, 2012.
- BROMILOW, R. H. Paraquat and sustainable agriculture. *Pest Management Science*, 60(4): 340-349, 2003.
- BROOKS, A. I.; CHADWICK, C. A.; GELBARD, H. A.; CORY-SLECHTA, D. A. & FEDEROFF, H. J. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Research*, 823(1-2): 1-10, 1999.
- BROOKS, S. P. & DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(7): 519-529, 2009.
- BULLIVANT, C. M. Accidental poisoning by paraquat: Report of two cases in man. *British Medical Journal*, 1(5498): 1272-1273, 1966.



CAGEN, S. Z. & GIBSON, J. E. Liver damage following paraquat in selenium-deficient and diethyl maleate-pretreated mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 40(2): 193-200, 1977.

CAMPOS, F. L.; CARVALHO, M. M.; CRISTOVÃO, A. C.; JE, G.; BALTAZAR, G.; SALGADO, A. J.; KIM, Y. S. & SOUSA, N. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7: 175, 2013.

CANUGOVI, C.; MISIAK, M.; FERRARELLI, L. K.; CROTEAU, D. L. & BOHR, V. A. The role of DNA repair in brain related disease pathology. *DNA Repair*, 12(8): 578-587, 2013.

CHAI, C. & LIM, K. L. Genetic insights into sporadic Parkinson's disease pathogenesis. *Current Genomics*, 14(8): 486-501, 2013.

CHEN, J. G.; ELDRIDGE, D. L.; LODESERTO, F. J.; MING, D. Y.; TURNER, K. M.; VANDERFORD, J. L.; SPORN, T. A. & SCHULMAN, S. R. Paraquat ingestion: a challenging diagnosis. *Pediatrics*, 125(6): e1505-e1509, 2010.

CHEN, J.; GUAN, Z.; WANG, L.; SONG, G.; MA, B. & WANG, Y. Meta-analysis: overweight, obesity, and Parkinson's disease. *International Journal of Endocrinology*, 2014: 203930, 2014.

CHENG, W. H.; HO, Y. S.; VALENTINE, B. A.; ROSS, D. A.; COMBS, G. F. Jr. & LEI, X. G. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *The Journal of Nutrition*, 128(7): 1070-1076, 1998.

CHOI, J. S.; JOU, S. S.; OH, M. H.; KIM, Y. H.; PARK, M. J.; GIL, H. W.; SONG, H. Y.; HONG, S. Y. The dose of cyclophosphamide for treating paraquat-induced rat lung injury. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 28(4): 420-427, 2013.

CHOI, Y.; CHO, K.; YOON, S.; LEE, H. & CHOI, Y. A case of paraquat intoxication caused by intravenous injection. *American Journal of Emergency Medicine*, 26(7): 836.e3-836.e4, 2008.

CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M. T.; ROOS, W. P. & KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2): 3-34, 2003.

CICCHETTI, F.; LAPOINTE, N.; ROBERGE-TREMBLAY, A.; SAINT-PIERRE, M.; JIMENEZ, L.; FICKE, B. W. & GROSS, R. E. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiology of Disease*, 20(2): 360-371, 2005.

COLPO, E.; VILANOVA, C. D. D. A.; REETZ, L. G. B.; DUARTE, M. M. M. F.; FARIAS, I. L. G.; MEINERZ, D. F.; MARIANO, D. O. C.; VENDRUSCULO, R. G.; BOLIGON, A. A.; DALLA CORTE, C. L.; WAGNER, R.; ATHAYDE, M. L. & Da ROCHA, J. B. T. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition*, 30(4): 459-465, 2014.

COMBS, G. F. Jr. & PETERSON, F. J. Protection against acute paraquat toxicity by dietary selenium in the chick. *The Journal of Nutrition*, 113(3): 538-545, 1983.

COMBS, G. F. Jr. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 85(5): 517-547, 2001.

COMINETTI, C.; De BORTOLI, M. C.; GARRIDO, A. B. Jr. & COZZOLINO, S. M. F. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutrition Research*, 32(6): 403-407, 2012.

CONSIGLIO, A. R.; RAMOS, A. L. L. P.; HENRIQUES, J. A. P. & PICADA, J. N. DNA brain damage after stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 34(4): 652-656, 2010.

COSTA, M. D.; De FREITAS, M. L.; DALMOLIN, L.; OLIVEIRA, L. P.; FLECK, M. A.; PAGLIARINI, P.; ACKER, C.; ROMAN, S. S. & BRANDÃO, R. Diphenyl diselenide prevents hepatic alterations induced by paraquat in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3): 750-758, 2013.

Da COSTA, L. A.; BADAWI, A. & EL-SOHEMY, A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 60(suppl 3): 27-36, 2012.

DAUER, W. & PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6): 889-909, 2003.

De BORTOLI, M. C. & COZZOLINO, S. M. Zinc and selenium nutritional status in vegetarians. *Biological Trace Element Research*, 127(3): 228-233, 2009.

De CAMPOS D.; ELLWANGER, J. H.; Do NASCIMENTO, P. S.; DA ROSA, H. T.; SAUR, L.; JOTZ, G. P. & XAVIER, L. L. Sexual dimorphism in the human vocal fold innervation. *Journal of Voice*, 27(3): 267-272, 2013.

De LAU, L. M. L. & BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 5(6): 525-535, 2006.

De MELO, F. T.; De OLIVEIRA, I. M.; GREGGIO, S.; DaCOSTA, J. C.; GUECHEVA, T. N.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. & ROSA, R. M. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10): 3548-3555, 2012.

DEXTER, D. T. & JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62: 132-144, 2013.

DHAR, P.; MOHARI, N. & MEHRA, R. D. Preliminary morphological and morphometric study of rat cerebellum following sodium arsenite exposure during rapid brain growth (RBG) period. *Toxicology*, 234(1-2): 10-20, 2007.

Di MONTE, D. A.; LAVASANI, M. & MANNING-BOG, A. B. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 23(4-5): 487-502, 2002.

DIAS, V.; JUNN, E. & MOURADIAN, M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4): 461-491, 2013.

DÍAZ-CASTRO, J.; OJEDA, M. L.; ALFÉREZ, M. J. M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; NESTARES, T. & CAMPOS, M. S. Se bioavailability and glutathione peroxidase activity in iron deficient rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(1): 42-46, 2011.

DICKSON, D. W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8): a009258, 2012.

DICKSON, D. W.; BRAAK, H.; DUDA, J. E.; DUYCKAERTS, C.; GASSER, T.; HALLIDAY, G. M.; HARDY, J.; LEVERENZ, J. B.; DeI TREDICI, K.; WSZOLEK, Z. K. & LITVAN, I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet. Neurology*, 8(12): 1150-1157, 2009.

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

DINIS-OLIVEIRA, R. J.; De PINHO, P. G.; SANTOS, L.; TEIXEIRA, H.; MAGALHÃES, T.; SANTOS, A.; DE LOURDES BASTOS, M.; REMIÃO, F.; DUARTE, J. A. & CARVALHO, F. Postmortem analyses unveil the poor efficacy of decontamination, anti-inflammatory and immunosuppressive therapies in paraquat human intoxications. *PLoS One*, 4(9): e7149, 2009.

DINIS-OLIVEIRA, R. J.; REMIÃO, F.; CARMO, H.; DUARTE, J. A.; NAVARRO, A. S.; BASTOS, M. L. & CARVALHO, F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 27(6): 1110-1122, 2006.

DONG, J.; BEARD, J. D.; UMBACH, D. M.; PARK, Y.; HUANG, X.; BLAIR, A.; KAMEL, F. & CHEN, H. Dietary fat intake and risk for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 29(13): 1623-1630, 2014.

DUŠINSKÁ, M.; KOVACIKOVÁ, Z.; VALLOVÁ, B. & COLLINS, A. Responses of alveolar macrophages and epithelial type II cells to oxidative DNA damage caused by paraquat. *Carcinogenesis*, 19(5): 809-812, 1998.

ELLWANGER, J. H.; Da COSTA ROSA, J. P.; Dos SANTOS, I. P.; Da ROSA, H. T.; JOTZ, G. P.; XAVIER, L. L. & De CAMPOS, D. Morphologic evaluation of the fetal recurrent laryngeal nerve and motor units in the thyroarytenoid muscle. *Journal of Voice*, 27(6): 668-673, 2013.

ESTEVEZ, A. O.; MUELLER, C. L.; MORGAN, K. L.; SZEWCZYK, N. J.; TEECE, L.; MIRANDA-VIZUETE, A. & ESTEVEZ, M. Selenium induces cholinergic motor neuron degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology*, 33(5): 1021-1032, 2012.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E. & HURST, R. Selenium in human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(7): 1337-1383, 2011.

FANG, Y. Z.; YANG, S. & WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10): 872-879, 2002.

FARRER, M. J. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature Reviews. Genetics*, 7(4): 306-318, 2006.

FENECH, M.; EL-SOHEMY, A.; CAHILL, L.; FERGUSON, L. R.; FRENCH, T. A. C.; TAI, E. S.; MILNER, J.; KOH, W. P.; XIE, L.; ZUCKER, M.; BUCKLEY, M.; COSGROVE, L.; LOCKETT, T.; FUNG, K. Y. C. & HEAD, R. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition

research and practice. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 4(2): 69-89, 2011.

FERGUSON, L. R.; KARUNASINGHE, N.; ZHU, S. & WANG, A. H. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutation Research*, 733(1-2): 100-110, 2012.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R. & JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 11(3): 172-177, 2002.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; ROCHA, E. & REIS-HENRIQUES, M. A. The effect of paraquat on hepatic EROD activity, liver, and gonadal histology in males and females of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed at different temperatures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(4): 626-632, 2006.

FINLEY, JW. Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition Reviews*, 64(3): 146-151, 2006.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921): 436-440, 2003.

FRIEDLICH, A. L.; SMITH, M. A.; ZHU, X.; TAKEDA, A.; NUNOMURA, A.; MOREIRA, M. I. & PERRY, G. Oxidative stress in Parkinson's disease. *The Open Pathology Journal*, 3: 38-42, 2009.

GAD, M. A. & ABD EL-TWAB, S. M. Selenium toxicosis assessment (*in vivo* and *in vitro*) and the protective role of vitamin B12 in male quail (*Coturnix Coturnix*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(1): 7-16, 2009.

GAETKE, L. M. & CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2): 147-163, 2003.

GAKI, G. S. & PAPAVALASSILIOU, A. G. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Medicine*, 16(2): 217-230, 2014.

GALAN-CHILET, I.; TELLEZ-PLAZA, M.; GUALLAR, E.; De MARCO, G.; LOPEZ-IZQUIERDO, R.; GONZALEZ-MANZANO, I.; TORMOS, M. C.; MARTIN-NUÑEZ, G. M.; ROJO-MARTINEZ, G.; SAEZ, G. T.; MARTÍN-ESCUADERO, J. C.; REDON, J. & CHAVES, F. J. Plasma selenium levels and oxidative stress biomarkers: a gene-environment interaction population-based study. *Free Radical Biology and Medicine*, 74: 229-236, 2014.

GANTHER, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20(9): 1657-1666, 1999.

GAWARAMMANA, I. B. & BUCKLEY, N. A. Medical management of paraquat ingestion. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 72(5): 745-757, 2011.

GELB, D. J.; OLIVER, E. & GILMAN, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 56(1): 33-39, 1999.

GIACOSA, A.; FALIVA, M. A.; PERNA, S.; MINOIA, C.; RONCHI, A. & RONDANELLI, M. Selenium fortification of an Italian rice cultivar via foliar fertilization with sodium selenate and its effects on human serum selenium levels and on erythrocyte glutathione peroxidase activity. *Nutrients*, 6(3): 1251-1261, 2014.

GIL, H. W.; HONG, J. R. JANG, S. H. & HONG, S. Y. Diagnostic and therapeutic approach for acute paraquat intoxication. *Journal of Korean Medical Science*, 29(11): 1441-1449, 2014.

GIOVANNELLI, L.; DECOROSI, F.; DOLARA, P. & PULVIRENTI, L. Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain Research*, 969(1-2): 244-247, 2003.

GIRIRAJAN, S.; PATEL, N.; SLAGER, R. E.; TOKARZ, M. E.; BUCAN, M.; WILEY, J. L. & ELSEA, S. H. How much is too much? Phenotypic consequences of *Rai1* overexpression in mice. *European Journal of Human Genetics*, 16(8): 941-954, 2008.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1): a008862, 2011.

GONZÁLEZ-POLO, R. A.; RODRÍGUEZ-MARTÍN, A.; MORÁN, J. M.; NISO, M.; SOLER, G. & FUENTES, J. M. Paraquat-induced apoptotic cell death in cerebellar granule cells. *Brain Research*, 1011(2): 170-176, 2004.

GRAUPNER, A.; INSTANES, C.; ANDERSEN, J. M.; BRANDT-KJELSEN, A.; DERTINGER, S. D.; SALBU, B.; BRUNBORG, G. & OLSEN, A. K. Genotoxic effects of two-generational selenium deficiency in mouse somatic and testicular cells. *Mutagenesis*, 30(2): 217-225, 2015.

GREGGIO, S.; De PAULA, S.; De OLIVEIRA, I. M.; TRINDADE, C.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P. & DaCOSTA, J. C. NAP prevents acute cerebral oxidative stress and protects against long-term brain injury and cognitive impairment in a model of neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiology of Disease*, 44(1): 152-159, 2011.

GROSETH, A.; MARZI, A.; HOENEN, T.; HERWIG, A.; GARDNER, D.; BECKER, S.; EBIHARA, H. & FELDMANN, H. The Ebola virus glycoprotein contributes to but is not sufficient for virulence *in vivo*. *PLoS Pathogens*, 8(8): e1002847, 2012.



HANTSON, P.; WEYNAND, B.; DOYLE, I.; BERNAND, A. & HERMANS, C. Pneumoproteins as markers of paraquat lung injury: a clinical case. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 15(1): 48-52, 2008.

HARTHILL, M. Review: micronutrient selenium deficiency influences evolution of some viral infectious diseases. *Biological Trace Element Research*, 143(3): 1325-1336, 2011.

HATFIELD, D. L.; TSUJI, P. A.; CARLSON, B. A. & GLADYSHEV, V. N. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(3): 112-120, 2014.

HAWKES, W. C.; ALKAN, F. Z. & OEHLER, L. Absorption, distribution and excretion of selenium from beef and rice in healthy North American men. *The Journal of Nutrition*, 133(11): 3434-3442, 2003.

HAYS, S. M.; MACEY, K.; NONG, A. & AYLWARD, L. L. Biomonitoring Equivalents for selenium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70(1): 333-339, 2014.

HENCHCLIFFE, C. & BEAL, M. F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 4(11): 600-609, 2008.

HONG, S. Y.; HWANG, K. Y.; LEE, E. Y.; EUN, S. W.; CHO, S. R.; HAN, C. S.; PARK, Y. H. & CHANG, S. K. Effect of vitamin C on plasma total antioxidant status in patients with paraquat intoxication. *Toxicology Letters*, 126(1): 51-59, 2002.

HWANG, O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology*, 22(1): 11-17, 2013.

ICHIKAWA-TOMIKAWA, N.; OGAWA, J.; DOUET, V.; XU, Z.; KAMIKUBO, Y.; SAKURAI, T.; KOHSAKA, S.; CHIBA, H.; HATTORI, N.; YAMADA, Y. & ARIKAWA-HIRASAWA, E. Laminin  $\alpha$ 1 is essential for mouse cerebellar development. *Matrix Biology*, 31(1): 17-28, 2012.

IOM - Institute of Medicine. DRI: dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington, DC: The National Academic Press; 2000.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 79(4): 368-376, 2008.

JEPPESEN, D. K.; BOHR, V. A. & STEVNSNER, T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 94(2): 166-200, 2011.

JHA, V. C.; KUMAR, R.; SRIVASTAV, A. K.; MEHROTRA, A. & SAHU, R. N. A case series of 12 patients with incidental asymptomatic Dandy-Walker syndrome and management. *Child's Nervous System*, 28(6): 861-867, 2012.

JIAN, X.; LI, M.; ZHANG, Y.; RUAN, Y.; GUO, G.; SUI, H. ZHANG, Y. Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model. *Human and Experimental Toxicology*, 30(6): 460-469, 2010.

JIANG, W.; JU, C.; JIANG, H. & ZHANG, D. Dairy foods intake and risk of Parkinson's disease: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Epidemiology*, 29(9): 613-619, 2014.

JOMOVA, K. & VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3): 65-87, 2011.

JUNQUEIRA, V. B. C; BARROS, S. B. M.; CHAN, S. S.; RODRIGUES, L.; GIAVAROTTI, L.; ABUD, R. L.; DEUCHER, G. P. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1-2): 5-16, 2004.

KADOKURA, M.; COLBY, T. V.; MYERS, J. L.; ALLEN, M. S.; DESCHAMPS, C.; TRASTEK, V. F. & PAIROLERO, P. C. Pathologic comparison of video-assisted thoracic surgical lung biopsy with traditional open lung biopsy. *The Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery*, 109(3): 494-498, 1995.

KAMEL, F. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science*, 341(6147): 722-723, 2013.

KAMEL, F.; GOLDMAN, S. M.; UMBACH, D. M.; CHEN, H.; RICHARDSON, G.; BARBER, M. R.; MENG, C.; MARRAS, C.; KORELL, M.; KASTEN, M.; HOPPIN, J. A.; COMYNS, K.; CHADE, A.; BLAIR, A.; BHUDHIKANOK, G. S.; ROSS, G. W.; LANGSTON, J. W.; SANDLER, D. P. & TANNER, C. M. Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20(1): 82-87, 2014.

KAUR, D. & ANDERSEN, J. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Research Reviews*, 3(3): 327-343, 2004.

KELNER, M. J.; BAGNELL, R. D.; UGLIK, S. F.; MONTOYA, M. A. & MULLENBACH, G. T. Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase affords cellular resistance to paraquat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323(1): 40-46, 1995.

KIELISZEK, M. & BŁAŻEJAK, S. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 29(5): 713-718, 2013.

KIM, Y.; KIM, D. C.; CHO, E. S.; KO, S. O.; KWON, W. Y.; SUH, G. J. & SHIN, H. K. Antioxidant and anti-inflammatory effects of selenium in oral buccal mucosa and small intestinal mucosa during intestinal ischemia-reperfusion injury. *Journal of Inflammation*, 11(1): 36, 2014.

KIRBAS, A.; KIRBAS, S.; CURE, M. C. & TUFEKCI, A. Paraoxonase and arylesterase activity and total oxidative/anti-oxidative status in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(3): 451-455, 2014.

KOUREAS, M.; TSEZOU, A.; TSAKALOF, A.; ORFANIDOU, T. & HADJICHRISTODOULOU, C. Increased levels of oxidative DNA damage in pesticide sprayers in Thessaly Region (Greece). Implications of pesticide exposure. *Science of the Total Environment*, 496: 358-364, 2014.

KOWAL, S. L.; DALL, T. M.; CHAKRABARTI, R.; STORM, M. V. & JAIN, A. The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. *Movement Disorders*, 28(3): 311-318, 2013.

KRISHNAN, S. & RANI, P. Evaluation of selenium, redox status and their association with plasma amyloid/tau in Alzheimer's disease. *Biological Trace Element Research*, 158(2): 158-165, 2014.

KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. V.; ZEHTAB, O.; GUIGÓ, R. & GLADYSHEV, V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300(5624): 1439-1443, 2003.

KUTER, K.; ŚMIAŁOWSKA, M.; WIEROŃSKA, J.; ZIĘBA, B.; WARDAS, J.; PIETRASZEK, M.; NOWAK, P.; BIEDKA, I.; ROCZNIAK, W.; KONIECZNY, J.; WOLFARTH, S. & OSSOWSKA, K. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Research*, 1155: 196-207, 2007.

LANGSTON, J. W.; BALLARD, P.; TETRUD, J. W. & IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587): 979-980, 1983.

LEE, K. H. & JEONG, D. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: The selenium paradox (Review). *Molecular Medicine Reports*, 5(2): 299-304, 2012.

LEES, A. J.; HARDY, J. & REVESZ, T. Parkinson's disease. *Lancet*, 373(9680): 2055-2066, 2009.

LEMIRE, M.; FILLION, M.; FRENETTE, B.; PASSOS, C. J. S.; GUIMARÃES, J. R. D.; BARBOSA, F. Jr. & MERGLER, D. Selenium from dietary sources and motor functions in the Brazilian Amazon. *Neurotoxicology*, 32(6): 944-953, 2011.

LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K. & SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(12): 1921-1942, 2004.

LeWITT, P. A.; LI, J.; LU, M.; BEACH, T. G.; ADLER, C. H.; GUO, L.; ARIZONA PARKINSON'S DISEASE CONSORTIUM. 3-hydroxykynurenine and other Parkinson's disease biomarkers discovered by metabolomic analysis. *Movement Disorders*, 28(12): 1653-1660, 2013.

LI, X.; YIN, D.; YIN, J.; CHEN, Q. & WANG R. Dietary selenium protect against redox-mediated immune suppression induced by methylmercury exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 72: 169-177, 2014.

LIM, K. L. & ZHANG, C. W. Molecular events underlying Parkinson's disease - an interwoven tapestry. *Frontiers in Neurology*, 4: 33, 2013.

LIU, S.; LIU, K.; SUN, Q.; LIU, W.; XU, W.; DENOBLE, P.; TAO, H. & SUN, X. Consumption of hydrogen water reduces paraquat-induced acute lung injury in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 305086, 2011.

LIU, Z. N.; ZHU, H. T.; CHEN, K. L.; QIU, C.; TANG, K. F. & NIU, X. L. Selenium attenuates high glucose-induced ROS/TLR-4 involved apoptosis of rat cardiomyocyte. *Biological Trace Element Research*, 156(1-3): 262-270, 2013.

LOGROSCINO, G.; GAO, X.; CHEN, H.; WING, A. & ASCHERIO, A. Dietary iron intake and risk of Parkinson's disease. *American Journal of Epidemiology*, 168(12): 1381-1388, 2008.

LOSCALZO, J. Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. *The New England Journal of Medicine*, 370(18): 1756-1760, 2014.

LU, Z.; MARKS, E.; CHEN, J.; MOLINE, J.; BARROWS, L.; RAISBECK, M.; VOLITAKIS, I.; CHERNY, R. A.; CHOPRA, V.; BUSH, A. I.; HERSCH, S. & FOX, J. H. Altered selenium status in Huntington's disease: Neuroprotection by selenite in the N171-82Q mouse model. *Neurobiology of Disease*, 71: 34-42, 2014.

LUBOMSKI, M.; RUSHWORTH, R. L., LEE, W.; BERTRAM, K. L. & WILLIAMS, D. R. Sex differences in Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(9): 1503-1506, 2014.

LYONS, G.; STANGOULIS, J. & GRAHAM, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutrition Research Reviews*, 16(1): 45-60, 2003.

MacFARQUHAR, J. K.; BROUSSARD, D. L.; MELSTROM, P.; HUTCHINSON, R.; WOLKIN, A.; MARTIN, C.; BURK, R. F.; DUNN, J. R.; GREEN, A. L.; HAMMOND, R.; SCHAFFNER, W. & JONES, T. F. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Archives of Internal Medicine*, 170(3): 256-261, 2010.

MAGISTRETTI, P. J. & PELLERIN, L. Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes. *Cerebral Cortex*, 6(1): 50-61, 1996.

MALDONADO, P. D.; PÉREZ-De La CRUZ, V.; TORRES-RAMOS, M.; SILVA-ISLAS, C.; LECONA-VARGAS, R.; LUGO-HUITRÓN, R.; BLANCO-AYALA, T.; UGALDE-MUÑIZ, P.; VÁZQUEZ-CERVANTES, G. I.; FORTOUL, T. I.; ALI, S. F. & SANTAMARÍA, A. Selenium-induced antioxidant protection recruits modulation of thioredoxin reductase during excitotoxic/pro-oxidant events in the rat striatum. *Neurochemistry International*, 61(2): 195-206, 2012.

MANTECCA, P.; VAILATI, G. & BACCHETTA, R. Histological changes and micronucleus induction in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* after paraquat exposure. *Histology and Histopathology*, 21(8): 829-840, 2006.

MARIANI, E.; POLIDORI, M. C.; CHERUBINI, A. & MECOCCHI, P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *Journal of Chromatography B*, 827(1): 65-75, 2005.

MAZZONI, P.; SHABBOTT, B. & CORTÉS, J. C. Motor control abnormalities in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(6): a009282, 2012.

McCORMACK, A. L.; THIRUCHELVAM, M.; MANNING-BOG, A. B.; THIFFAULT, C.; LANGSTON, J. W.; CORY-SLECHTA, D. A. & Di MONTE, D. A. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiology of Disease*, 10(2): 119-127, 2002.

McLAREN, D. S. Just 40 years ago. *Nutrition*, 15(3): 254, 256, 1999. Comentário sobre: SCHWARZ, K. & FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutrition* (reimpressão), 15(3): 255, 1999.

MEHDI, Y.; HORNICK, J. L.; ISTASSE, L. & DUFRASNE, I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 18(3): 3292-3311, 2013.

MÉZES, M. & BALOGH, K. Prooxidant mechanisms of selenium toxicity - a review. *Acta Biologica Szegediensis*, 53(Suppl.1): 15-18, 2009.

MISCHLEY, L. K.; ALLEN, J. & BRADLEY, R. Coenzyme Q10 deficiency in patients with Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 318(1-2): 72-75, 2012.

MITRA, S.; CHAKRABARTI, N. & BHATTACHARYYA, A. Differential regional expression patterns of  $\alpha$ -synuclein, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ ; and variable status of dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after Paraquat treatment. *Journal of Neuroinflammation*, 8:163, 2011.

MOLZ, P.; ELLWANGER, J. H.; Dos SANTOS, C. E. I.; DIAS, J. F.; De CAMPOS, D.; CORBELLINI, V. A.; PRÁ, D.; PUTZKE, M. T. L. & FRANKE, S. I. R. A metabolomics approach to evaluate the effects of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) treatment in undernourished young rats. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 318: 194-197, 2014.

MONEY, K. M. & STANWOOD, G. D. Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7: 260, 2013.

MOORE, D. J.; WEST, A. B.; DAWSON, V. L. & DAWSON, T. M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 28: 57-87, 2005.

MORAES, M. F.; WELCH, R. M.; NUTTI, M. R.; CARVALHO, J. L. V. & WATANABE, E. Evidences of selenium deficiency in Brazil: From soil to human nutrition. In: BANUELOS, G. R.; LIN, Z. G.; YIN, X. B. (Eds.) First International



Conference on Selenium in the Environment and Human Health, 2009, Suzhou. Selenium: deficiency, toxicity and biofortification for human health. 116p. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 2009. p. 73-74.

MORRIS, M.; IANSEK, R.; MCGINLEY, J.; MATYAS, T. & HUXHAM, F. Three-dimensional gait biomechanics in Parkinson's disease: evidence for a centrally mediated amplitude regulation disorder. *Movement Disorders*, 20(1): 40-50, 2005.

MÜLLER, M. & KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nature Reviews. Genetics*, 4(4): 315-322, 2003.

MUTCH, D. M.; WAHLI, W. & WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *The FASEB Journal*, 19(12): 1602-1616, 2005.

NAVARRO-ALARCON, M. & CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. *Science of the Total Environment*, 400(1-3): 115-141, 2008.

NEVES, F. F.; SOUSA, R. B.; PAZIN-FILHO, A.; CUPO, P.; ELIAS, J. Jr., NOGUEIRA-BARBOSA, M. H. Severe paraquat poisoning: clinical and radiological findings in a survivor. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36(4): 513-516, 2010.

NIKAM, S.; NIKAM, P.; AHALEY, S. K. & SONTAKKE, A. V. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24(1): 98-101, 2009.

NUNES, R. G. F. L.; Da LUZ, J. M. R.; FREITAS, R. B.; HIGUCHI, A.; KASUYA, M. C. M. & VANETTI, M. C. D. Selenium bioaccumulation in Shiitake mushrooms: a nutritional alternative source of this element. *Journal of Food Science*, 77(9): C983-C986, 2012.

NUSSBAUM, R. L. & ELLIS, C. E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 348(14): 1356-1364, 2003.

OJHA, A. & SRIVASTAVA, N. *In vitro* studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 761:10-17, 2014.

OMAYE, S. T.; REDDY, K. A. & CROSS, C. E. Enhanced lung toxicity of paraquat in selenium-deficient rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 43(2): 237-247, 1978.

OSSOWSKA, K.; SMIAŁOWSKA, M.; KUTER, K.; WIEROŃSKA, J.; ZIĘBA, B.; WARDAS, J.; NOWAK, P.; DĄBROWSKA, J.; BORTEL, A.; BIEDKA, I.; SCHULZE, G. & ROMMELSPACHER, H. Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: implications for Parkinson's disease. *Neuroscience*, 141(4): 2155-2165, 2006.

OSSOWSKA, K.; WARDAS, J.; ŚMIAŁOWSKA, M.; KUTER, K.; LENDA, T.; WIEROŃSKA, J. M.; ZIĘBA, B.; NOWAK, P.; DĄBROWSKA, J.; BORTEL, A.; KWIECIŃSKI, A. & WOLFARTH, S. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? *European Journal of Neuroscience*, 22(6): 1294-1304, 2005.

PEREIRA, P.; De OLIVEIRA, P. A.; ARDENGHI, P.; ROTTA, L.; HENRIQUES, J. A. P. & PICADA, J. N. Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 99(5): 374-378, 2006.

PERIER, C.; BOVÉ, J. & VILA, M. Mitochondria and programmed cell death in Parkinson's disease: apoptosis and beyond. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(9): 883-895, 2012.

PETERSON, A. L. A review of vitamin D and Parkinson's disease. *Maturitas*, 78(1): 40-44, 2014.

PICADA, J. N.; FLORES, D. G.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, N. P.; ROESLER, R. & HENRIQUES, J. A. P. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Molecular Brain Research*, 114(1): 80-85, 2003.

PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A. & STEEVES, T. D. L. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 29(13): 1583-1590, 2014.

QI, Z.; MILLER, G. W. & VOIT, E. O. Rotenone and paraquat perturb dopamine metabolism: A computational analysis of pesticide toxicity. *Toxicology*, 315: 92-101, 2014.

QURESHI, G. A.; QURESHI, A. A.; MEMON, S. A. & PARVEZ, S. H. Impact of selenium, iron, copper and zinc in on/off Parkinson's patients on L-dopa therapy. *Journal of Neural Transmission*, (Suppl) 71: 229-236, 2006.

RAPPOLD, P. M.; CUI, M.; CHESSER, A. S.; TIBBETT, J.; GRIMA, J. C.; DUAN, L.; SEN, N.; JAVITCH, J. A. & TIEU, K. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51): 20766-20771, 2011.

RASBAND, W. S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

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

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. *Lancet*, 379(9822): 1256-1268, 2012.

RAYMAN, M. P. The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(2): 203-215, 2002.

RIBAS, G.; FRENZILLI, G.; BARALE, R. & MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research*, 344(1-2): 41-54, 1995.

ROMAN, M.; JITARU, P. & BARBANTE, C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*, 6(1): 25-54, 2014.

ROMEO, S.; VIAGGI, C.; Di CAMILLO, D.; WILLIS, A. W.; LOZZI, L.; ROCCHI, C.; CAPANNOLO, M.; ALOISI, G.; VAGLINI, F.; MACCARONE, R.; CALEO, M.; MISSALE, C.; RACETTE, B. A.; CORSINI, G. U. & MAGGIO, R. Bright light exposure reduces TH-positive dopamine neurons: implications of light pollution in Parkinson's disease epidemiology. *Scientific Reports*, 3: 1395, 2013.

ROSA, R. M.; HOCH, N. C.; FURTADO, G. V.; SAFFI, J. & HENRIQUES, J. A. P. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. *Mutation Research*, 633(1): 35-45, 2007.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K. & LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73: 39-85, 2004.

SCALI, M.; BEGENISIC, T.; MAINARDI, M.; MILANESE, M.; BONIFACINO, T.; BONANNO, G.; SALE, A. & MAFFEI, L. Fluoxetine treatment promotes functional recovery in a rat model of cervical spinal cord injury. *Scientific Reports*, 3: 2217, 2013.

SCHÖTTKER, B.; SAUM, K. U.; JANSEN, E. H. J. M.; BOFFETTA, P.; TRICHOPOULOU, A.; HOLLECZEK, B.; DIEFFENBACH, A. K. & BRENNER, H. Oxidative stress markers and all-cause mortality at older age: a population-based

cohort study. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, [Epub ahead of print], 2014.

ŚCISKALSKA, M.; ZALEWSKA, M.; GRZELAK, A. & MILNEROWICZ, H. The influence of the occupational exposure to heavy metals and tobacco smoke on the selected oxidative stress markers in smelters. *Biological Trace Element Research*, 159(1-3): 59-68, 2014.

SEARLES NIELSEN, S.; BAMMLER, T. K.; GALLAGHER, L. G.; FARIN, F. M.; LONGSTRETH, W. T. Jr.; FRANKLIN, G. M.; SWANSON, P. D. & CHECKOWAY, H. Genotype and age at Parkinson disease diagnosis. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 4(1): 61-69, 2013.

SEET, R. C. S.; LEE, C. Y. J.; LIM, E. C. H.; TAN, J. J. H.; QUEK, A. M. L.; CHONG, W. L.; LOOI, W. F.; HUANG, S. H.; WANG, H.; CHAN, Y. H. & HALLIWELL, B. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radical Biology & Medicine*, 48(4): 560-566, 2010.

SELVARAJ, V.; TOMBLIN, J.; ARMISTEAD, M. Y. & MURRAY, E. Selenium (sodium selenite) causes cytotoxicity and apoptotic mediated cell death in PLHC-1 fish cell line through DNA and mitochondrial membrane potential damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87: 80-88, 2013.

ŞENOL, N.; NAZIROĞLU, M. & YÜRÜKER, V. N-acetylcysteine and selenium modulate oxidative stress, antioxidant vitamin and cytokine values in traumatic brain injury-induced rats. *Neurochemical Research*, 39(4): 685-692, 2014.

SHAHAR, A.; PATEL, K. V.; SEMBA, R. D.; BANDINELLI, S.; SHAHAR, D. R.; FERRUCCI, L. & GURALNIK, J. M. Plasma selenium is positively related to performance in neurological tasks assessing coordination and motor speed. *Movement Disorders*, 25(12): 1909-1915, 2010.

SHARPLES, S. A.; KOBLINGER, K.; HUMPHREYS, J. M. & WHELAN, P. J. Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Frontiers in Neural Circuits*, 8: 55, 2014.

SHENKIN, A. Selenium in intravenous nutrition. *Gastroenterology*, 137(5 Suppl): S61-S69, 2009.

SHULTS, C. W. Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6): 1661-1668, 2006.

SIES, H.; STAHL, W. & SEVANI, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *The Journal of Nutrition*, 135(5): 969-972, 2005.

SIGN - Scottish Intercollegiate Guidelines Network. *Diagnosis and pharmacological management of Parkinson's disease: A national clinical guideline*. Edinburgh: SIGN, 2010.

SITTIPUNT, C. Paraquat poisoning. *Respiratory Care*, 50(3): 383-385, 2005.

SMEYNE, R. J. & JACKSON-LEWIS, V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Molecular Brain Research*, 134(1): 57-66, 2005.

SMITH, K. M. & DAHODWALA, N. Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders. *Experimental Neurology*, 259: 44-56, 2014.

SOMAYAJULU-NIȚU, M.; SANDHU, J. K.; COHEN, J.; SIKORSKA, M.; SRIDHAR, T. S.; MATEI, A.; BOROWY-BOROWSKI, H. & PANDEY, S. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and parkinsonism in adult rats: Neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of coenzyme Q10. *BMC Neuroscience*, 10: 88, 2009.

SØRENSEN, F. W.; LARSEN, J. O.; EIDE, R. & SCHIØNNING, J. D. Neuron loss in cerebellar cortex of rats exposed to mercury vapor: a stereological study. *Acta Neuropathologica*, 100(1): 95-100, 2000.

SPILLER, H. A. & PFIEFER, E. Two fatal cases of selenium toxicity. *Forensic Science International*, 171(1): 67-72, 2007.

STELMASHOOK, E. V.; ISAEV, N. K.; GENRIKHS, E. E.; AMELKINA, G. A.; KHASPEKOV, L. G.; SKREBITSKY, V. G. & ILLARIOSHKIN, S. N. Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochemistry (Moscow)*, 79(5): 391-396, 2014.

STOCKLER-PINTO, M. B.; MAFRA, D.; FARAGE, N. E.; BOAVENTURA, G. T. & COZZOLINO, S. M. F. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. *Nutrition*, 26(11-12): 1065-1069, 2010.

STOCKLER-PINTO, M. B.; MAFRA, D.; MORAES, C.; LOBO, J.; BOAVENTURA, G. T.; FARAGE, N. E.; SILVA, W. S.; COZZOLINO, S. F. & MALM, O. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients. *Biological Trace Element Research*, 158(1): 105-112, 2014.

SUNTRES, Z. E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, 180(1): 65-77, 2002.

SWAIN, U. & SUBBA RAO, K. Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(8-9): 374-381, 2011.

SYKORA, P.; WILSON, D. M. III & BOHR, V. A. Base excision repair in the mammalian brain: implication for age related neurodegeneration. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(10): 440-448, 2013.

TAKIZAWA, M.; KOMORI, K.; TAMPO, Y. & YONAHARA, M. Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of cellular redox systems including antioxidative defense enzymes glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. *Toxicology in Vitro*, 21(3): 355-363, 2007.

TANNER, C. M.; KAMEL, F.; ROSS, G. W.; HOPPIN, J. A.; GOLDMAN, S. M.; KORELL, M.; MARRAS, C.; BHUDHIKANOK, G. S.; KASTEN, M.; CHADE, A. R.; COMYNS, K.; RICHARDS, M. B.; MENG, C.; PRIESTLEY, B.; FERNANDEZ, H. H.; CAMBI, F.; UMBACH, D. M.; BLAIR, A.; SANDLER, D. P. & LANGSTON JW. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental Health Perspectives*, 119(6): 866-872, 2011.

THIRUCHELVAM, M.; BROCKEL, B. J.; RICHFIELD, E. K.; BAGGS, R. B. & CORY-SLECHTA, D. A. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Research*, 873(2): 225-234, 2000.

THIRUCHELVAM, M.; McCORMACK, A.; RICHFIELD, E. K.; BAGGS, R. B.; TANK, A. W.; Di MONTE, D. A. & CORY-SLECHTA, D. A. Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *European Journal of Neuroscience*, 18(3): 589-600, 2003.

THIRY, C.; SCHNEIDER, Y. J.; PUSSEMIER, L.; De TEMMERMAN, L. & RUTTENS, A. Selenium bioaccessibility and bioavailability in Se-enriched food supplements. *Biological Trace Element Research*, 152(1): 152-160, 2013.



THOMSON, C. D.; CHISHOLM, A.; McLACHLAN, S. K. & CAMPBELL, J. M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2): 379-384, 2008.

TSUKAMOTO, M.; TAMPO, Y.; SAWADA, M. & YONAHARA, M. Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of the glutathione redox cycle in pulmonary microvascular endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 178(2): 82-92, 2002.

USDA - United States Department of Agriculture. *National Nutrient Database for Standard Reference Release 27 (Selenium)*. 2014. Disponível em: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/report/nutrientsfrm?max=25&offset=0&totalCount=0&nutrient1=317&nutrient2=&nutrient3=&subset=0&fg=&sort=f&measureby=>. Acesso em 22.10.14.

VALENTINE, W. M.; HILL, K. E.; AUSTIN, L. M.; VALENTINE, H. L.; GOLDOWITZ, D. & BURK, R. F. Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p. *Toxicologic Pathology*, 33(5): 570-576, 2005.

VALKO, M.; MORRIS, H. & CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10): 1161-1208, 2005.

Van Den EEDEN, S. K.; TANNER, C. M.; BERNSTEIN, A. L.; FROSS, R. D.; LEIMPETER, A.; BLOCH, D. A. & NELSON, L. M. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American Journal of Epidemiology*, 157(11): 1015-1022, 2003.

VENDEROVA, K. & PARK, D. S. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8): a009365, 2012.

VIRMANI, A.; PINTO, L.; BINIENDA, Z. & ALI, S. Food, nutrigenomics, and neurodegeneration - Neuroprotection by what you eat! *Molecular Neurobiology*, 48(2): 353-362, 2013.

WANG, A.; COSTELLO, S.; COCKBURN, M.; ZHANG, X.; BRONSTEIN, J.; RITZ, B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *European Journal of Epidemiology*, 26(7): 547-555, 2011.

WATANABE, C. & SATOH, H. Brain selenium status and behavioral development in selenium-deficient preweanling mice. *Physiology & Behavior*, 56(5): 927-932, 1994.

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

WEEKS, B. S.; HANNA, M. S. & COOPERSTEIN, D. Dietary selenium and selenoprotein function. *Medical Science Monitor*, 18(8): RA127-RA132, 2012.

WIDDOWSON, P. S.; FARNWORTH, M. J.; UPTON, R. & SIMPSON, M. G. No changes in behaviour, nigro-striatal system neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rats. *Human & Experimental Toxicology*, 15(7): 583-591, 1996.

WINKEL, L. H. E.; JOHNSON, C. A.; LENZ, M.; GRUNDL, T.; LEUPIN, O. X.; AMINI, M. & CHARLET, L. Environmental selenium research: from microscopic processes to global understanding. *Environmental Science & Technology*, 46(2): 571-579, 2012.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H. O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D. & MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology*, 26(Suppl 1): S1-S58, 2011.

WU, B.; SONG, B.; TIAN, S.; HUO, S.; CUI, C.; GUO, Y. & LIU, H. Central nervous system damage due to acute paraquat poisoning: A neuroimaging study with 3.0 T MRI. *Neurotoxicology*, 33(5): 1330-1337, 2012.

WU, T. & HALLETT, M. The cerebellum in Parkinson's disease. *Brain*, 136(Pt 3): 696-709, 2013.

YANG, X.; BAO, Y.; FU, H.; LI L.; REN, T. & YU, X. Selenium protects neonates against neurotoxicity from prenatal exposure to manganese. *PLoS One*, 9(1): e86611, 2014.

YIN, H. H. Action, time and the basal ganglia. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 369(1637): 20120473, 2014.

YOSHIZAWA, K.; EMOTO, Y.; KINOSHITA, Y.; YURI, T. & TSUBURA, A. N-methyl-N-nitrosourea-induced cerebellar hypoplasia in rats: Effect of arachidonic acid supplementation during the gestational, lactational and post-weaning periods. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(3): 627-634, 2013.

YOUNES-MHENNI, S.; AISSI, M.; MOKNI, N.; BOUGHAMMOURA-BOUATAY, A.; CHEBEL, S.; FRIH-AYED, M.; KERKENI, A.; BOST, M.; CHAZOT, G.; SFAR, M. T. & SFAR, M. H. Serum copper, zinc and selenium levels in Tunisian patients with Parkinson's disease. *La Tunisie Médicale*, 91(6): 402-405, 2013.

YU, H.; STERNAD, D.; CORCOS, D. M. & VAILLANCOURT, D. E. Role of hyperactive cerebellum and motor cortex in Parkinson's disease. *Neuroimage*, 35(1): 222-233, 2007.

ZHANG, J.; TU, Q.; GROSSCHEDL, R.; KIM, M. S.; GRIFFIN, T.; DRISSI, H.; YANG, P. & CHEN, J. Roles of SATB2 in osteogenic differentiation and bone regeneration. *Tissue Engineering: Part A*, 17(13-14): 1767-1776, 2011.

ZHANG, Q.; CHEN, L.; GUO, K.; ZHENG, L.; LIU, B.; YU, W.; GUO, C.; LIU, Z.; CHEN, Y. & TANG, Z. Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and antioxidative capacity in mice. *Biological Trace Element Research*, 154(2): 255-261, 2013.

ZHAO, H. W.; LIN, J.; WANG, X. B.; CHENG, X.; WANG, J. Y.; HU, B. L.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. & ZHU, J. H. Assessing plasma levels of selenium, copper, iron and zinc in patients of Parkinson's disease. *PLoS One*, 8(12): e83060, 2013.

## 11 *CURRICULUM VITAE* RESUMIDO

Estão apresentados neste currículo apenas publicações e atividades acadêmicas selecionadas pelo autor. Informações adicionais e detalhadas sobre o histórico acadêmico do mesmo podem ser consultadas no currículo disponibilizado na plataforma Lattes, através do seguinte endereço eletrônico: <http://lattes.cnpq.br/2144085580878208>

### **ELLWANGER, J. H.**

#### **DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Joel Henrique Ellwanger

**Local e data de nascimento:** Candelária, Rio Grande do Sul, Brasil, 29/11/1988.

**Endereço profissional:** Laboratório de Histologia e Patologia (Bloco 20, sala 2022), Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. Avenida Independência, 2293, Bairro Universitário, CEP: 96815-900 Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Telefone profissional:** (51) 3717-7643

**E-mail profissional:** joelellwanger@unisc.br

**E-mail pessoal:** joel.ellwanger@gmail.com

#### **FORMAÇÃO**

**2013 – 2015:** Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS).

Título: Efeitos do selênio sobre a neurotoxicidade, genotoxicidade, função locomotora e alterações teciduais em ratos Wistar submetidos a um modelo experimental da doença de Parkinson induzido por paraquat

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Prá

**2011 – período atual:** Graduação em andamento em Ciências Biológicas – Bacharelado (Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC).

Título: Avaliação morfológica do nervo laríngeo recorrente e das unidades motoras do músculo tireoaritenóideo fetal humano

Orientador: Prof. Dr. Deivis de Campos

**2006 – 2010:** Graduação em Nutrição (Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC).

Título: Influência do status de selênio sobre a progressão da infecção pelo HIV

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Isabel Rech Franke

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Rieger

## **ESTÁGIOS E BOLSAS**

**2013 (1º semestre, total de 80 horas):** Atuou como estagiário no Serviço de Imuno-histoquímica do Laboratório de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas sob supervisão da bióloga Fabiana Facco Casarotti e do Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.

**2009 (1º semestre, 6 horas/semana):** Atuou como bolsista do Programa de Bolsa de Estudo para Atividades em Laboratórios de Ensino no Laboratório de Avaliação Nutricional da Universidade de Santa Cruz do Sul orientado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francisca Maria Assmann Wichmann.

**2008 (2º semestre, 4 horas/semana):** Atuou como bolsista do Programa de Bolsa de Estudo para Atividades de Ensino na disciplina de Bromatologia da Universidade de Santa Cruz do Sul orientado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nádia de Monte Baccar.

**2008 (2º semestre, 12 horas/semana):** Atuou como bolsista do Programa de Bolsa de Estudo para Atividades em Laboratórios de Ensino no Laboratório de

Histologia e Patologia da Universidade de Santa Cruz do Sul orientado pela bióloga Clara Forrer Charlier.

## **PRÊMIOS**

**2012:** Melhor trabalho original da VII Semana Acadêmica do Curso de Medicina da Universidade de Santa Cruz do Sul.

**2012:** 14º Prêmio Prof. Garcia do Prado de Anatomia Humana (1º lugar) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**2011:** Melhor pôster da XIII Semana Acadêmica do Curso de Odontologia da Universidade de Santa Cruz do Sul.

**2011:** Melhor trabalho original da VI Semana Acadêmica do Curso de Medicina da Universidade de Santa Cruz do Sul.

## **EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL E DIDÁTICA**

**2010 – período atual:** Atua desenvolvendo atividades técnicas no Laboratório de Histologia e Patologia da Universidade de Santa Cruz do Sul. Além de executar protocolos de histopatologia, desenvolve atividades didáticas através da realização de capacitações sobre os temas relacionados com a rotina do laboratório. Também auxilia professores em aulas práticas de diversos cursos de graduação e atua na orientação de bolsistas e estagiários.

## **ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS**

- **ELLWANGER, J. H.;** MOLZ, P.; DALLEMOLE, D. R.; Dos SANTOS, A. P.; MÜLLER, T. E.; CAPPELLETTI, L.; Da SILVA, M. G.; FRANKE, S. I. R.; PRÁ, D. & HENRIQUES, J. A. P. Selenium reduces bradykinesia and DNA damage in a rat

model of Parkinson's disease. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 31(2), p. 359 - 365, 2015.

- MOLZ, P.; **ELLWANGER, J. H.**; Dos SANTOS, C. E. I.; DIAS, J. F.; De CAMPOS, D.; CORBELLINI, V. A.; PRÁ, D.; PUTZKE, M. T. L. & FRANKE, S. I. R. A metabolomics approach to evaluate the effects of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) treatment in undernourished young rats. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research. Section B, Beam Interactions with Materials and Atoms (Print)*, 318: 194 - 197, 2014.

- De CAMPOS, D.; **ELLWANGER, J. H.**; ROSA, J. P. C.; Dos SANTOS, I. P.; CORBELLINI, R. O.; HOELSCHER, R. H.; BAGATINI, P. B.; JOTZ, G. P. & XAVIER, L. L. Morphology of fetal vocal fold and associated structures. *Journal of Voice*, 27(1), p. 5 - 10, 2013.

- Da SILVA, T. H.; **ELLWANGER, J. H.**; SILVA, H. T. R.; MORAES, D.; DOTTO, A. C.; VIERA, V. A. & De CAMPOS, D. Morphometric analysis of the middle meningeal artery organization in humans embryological considerations. *Journal of Neurological Surgery Part B: Skull Base*, 74: 108 - 112, 2013.

- De CAMPOS, D.; **ELLWANGER, J. H.**; NASCIMENTO, P. S.; SILVA, H. T. R.; SAUR, L.; JOTZ, G. P. & XAVIER, L. L. Sexual dimorphism in the human vocal fold innervation. *Journal of Voice*, 27(3): 267 - 272, 2013.

- Dos SANTOS, I. P.; ROSA, J. P. C.; **ELLWANGER, J. H.**; MOLZ, P.; SILVA, H. T. R. & De CAMPOS, D. Michelangelo's art on the Sistine Chapel ceiling: sacred representation or anatomy lessons? *Journal of Morphological Sciences*, 30(1): 43 - 48, 2013.

- Da SILVA, T. H.; **ELLWANGER, J. H.**; SILVA, H. T. R. & De CAMPOS, D. Origins of the middle meningeal artery and its probable embryological mechanism - A review. *Journal of Morphological Sciences*, 30(2): 69 - 72, 2013.



- **ELLWANGER, J. H.** & De CAMPOS, D. Abnormality of the foramen spinosum due to a variation in the trajectory of the middle meningeal artery: A case report in human. *Journal of Neurological Surgery Reports*, 74(2): 73 - 76, 2013.
  
- **ELLWANGER, J. H.**; ROSA, J. P. C.; Dos SANTOS, I. P.; SILVA, H. T. R.; JOTZ, G. P.; XAVIER, L. L. & De CAMPOS, D. Morphologic evaluation of the fetal recurrent laryngeal nerve and motor units in the thyroarytenoid muscle. *Journal of Voice*, 27(6): 668 - 673, 2013.
  
- Da SILVA, A. L. G.; SILVA, H. T. R.; KARNOPP, T. E.; CHARLIER, C. F.; **ELLWANGER, J. H.**; MOURA, D. J.; POSSUELO, L. G.; VALIM, A. R. M.; GUECHEVA, T. N. & HENRIQUES, J. A. P. Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes. *BMC Medical Genetics (Online)*, 14:93, 2013.
  
- De CAMPOS, D.; Do NASCIMENTO, P. S.; **ELLWANGER, J. H.**; GEHLEN, G.; RODRIGUES, M. F.; JOTZ, G. P. & XAVIER, L. L. Histological organization is similar in human vocal muscle and tongue a study of muscles and nerves. *Journal of Voice*, 26(6): 811.e19 - 811.e26, 2012.
  
- **ELLWANGER, J. H.**; MOHR, H. & De CAMPOS, D. Anatomy lessons in the Michelangelo's works? *Journal of Morphological Sciences*, 29(1): 38 - 43, 2012.
  
- ZENKNER, F. F.; ATHANÁSIO, C. G.; **ELLWANGER, J. H.**; PRÁ, D.; RIEGER, A. & ALCAYAGA, E. A. L. Análise genotóxica de efluente de lavanderia hospitalar: ensaio cometa com *Daphnia magna* STRAUS, 1820. *Revista Jovens Pesquisadores*, 2(1): 29 - 36, 2012.
  
- De CAMPOS, D.; Da SILVA, T. H.; **ELLWANGER, J. H.**; GOERCK, M. L.; KIPPER, J. F.; PIAZZA, J. L. & KRAETHER NETO, L. Atlanto-occipital fusion and

its neurological complications: a case report. *Journal of Morphological Sciences*, 29(2): 111 - 113, 2012.

- De CAMPOS, D.; **ELLWANGER, J. H.**; GOERCK, M. L.; CORBELLINI, R. O.; HOELSCHER, R. H.; SOUZA, M. S. & RIEGER, A. Anatomy of the first spinal nerve - A review. *Journal of Morphological Sciences*, 29(2): 65 - 68, 2012.

- De CAMPOS, D.; **ELLWANGER, J. H.**; ROSA, J. P. C.; Dos SANTOS, I. P.; Da SILVA, T. H.; PIAZZA, J. L. & KRAETHER NETO, L. Palatoglossus muscle neuroanatomy - A review. *Journal of Morphological Sciences*, 29(3): 123 - 124, 2012.

- **ELLWANGER, J. H.**; PRÁ, D.; RIEGER, A. & FRANKE, S. I. R. Influência do estado nutricional de selênio sobre a progressão da infecção pelo HIV. *Nutrire (São Paulo)*, 36(2): 109 - 122, 2011.

- De CAMPOS, D.; RIEGER, A.; MOHR, H.; **ELLWANGER, J. H.** & BORBA Jr., A. M. Anatomy and evolution of accessory nerve: cranial or spinal origins? - A review. *Journal of Morphological Sciences*, 28(4): 222 - 227, 2011.

## **RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS/CONGRESSOS**

- **ELLWANGER, J. H.**; MOLZ, P.; PEREIRA, C. S.; HENRIQUES, J. A. P.; FRANKE, S. I. R. & PRÁ, D. Selenium intake, glycated hemoglobin and cytotoxicity in adults with pre-diabetes. In: HUMN and HUMNxl Workshop, Canoas, RS, 2013.

- MAI, C.; MOLZ, P.; ZENKNER, F. F.; De CAMPOS, D.; **ELLWANGER, J. H.**; FENGLER, P.; MULLER, L. L.; PRÁ, D. & FRANKE, S. I. R. Influence of the vitamin C and hesperidin on the effects of excessive sucrose intake in rats: a study about blood glucose, memory, and DNA damage in blood and hippocampal cells. 2012. In: 10<sup>th</sup> Congress on Cell Biology & 16<sup>th</sup> Meeting of the Brazilian Society for

Cell Biology, Rio de Janeiro, RJ. Livro de Resumos do 10<sup>th</sup> Congress on Cell Biology & 16<sup>th</sup> Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, p.10, 2012.

- **ELLWANGER, J. H.**; ZENKNER, F. F.; ASSMANN, J.; PRÁ, D.; KELLERMANN, M. G.; RIEGER, A.; HENRIQUES, J. A. P. & De CAMPOS, D. Parkinson`s disease and cerebellum: new way of analyzing the brain lesions by a paraquat-induced classical experimental model. In: 10<sup>th</sup> Congress on Cell Biology & 16<sup>th</sup> Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, Rio de Janeiro, RJ. Livro de Resumos do 10<sup>th</sup> Congress on Cell Biology & 16<sup>th</sup> Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, p.278, 2012.