

Impacto da suplementação de selênio na fertilidade e fecundidade de ratas

Impact of selenium supplementation on the fertility and fecundity of rats

DOI:10.34119/bjhrv4n2-364

Recebimento dos originais: 01/03/2021

Aceitação para publicação: 15/04/2021

Tiago Daniel Gueiber

Graduando em Medicina

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Departamento de Medicina. Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas - 84030900

- Ponta Grossa, PR – Brasil

tiagogueiber@gmail.com

Luiz Gustavo Lima

Graduando em Medicina

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Departamento de Medicina. Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas -

84030900 - Ponta Grossa, PR – Brasil

luizlima742@gmail.com

André Amaro Mamédio dos Santos

Graduando em Medicina

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Departamento de Medicina. Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas -

84030900 - Ponta Grossa, PR – Brasil

andre.amaro.mamedio@gmail.com

Vitória Rossetim Celinski

Graduanda em Medicina

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Departamento de Medicina. Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas - 84030900

- Ponta Grossa, PR – Brasil

vitória.ro.c@hotmail.com

Letícia Fillos

Graduanda em Medicina

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Departamento de Medicina. Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas - 84030900

- Ponta Grossa, PR – Brasil

lefillos@hotmail.com

Andrielle Cristina Chaikoski

Graduanda em Medicina

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Departamento de Medicina. Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas - 84030900
- Ponta Grossa, PR – Brasil
andriellechaikoski@gmail.com

Ricardo Zanetti Gomes

Doutorado em Clínica Cirúrgica

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Departamento de Medicina. Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas - 84030900
- Ponta Grossa, PR – Brasil
zanetticons@uol.com.br

Camila Marinelli Martins

Doutorado em Epidemiologia Experimental aplicado à Zoonoses

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Departamento de Enfermagem e Saúde Pública. Av. General Carlos Cavalcanti, 4748,
Uvaranas - 84030900 - Ponta Grossa, PR – Brasil
camila.marinelli@aacet.com.br

RESUMO

O uso do selênio (Se) na alimentação humana e animal tem despertado a atenção dos pesquisadores devido ao seu duplo status como nutriente essencial e altamente tóxico (GIERUS, 2007). Diversos estudos apontam o papel do mineral na fertilidade masculina, contudo, não há evidências claras sobre a sua influência na fertilidade feminina. A partir disso, este trabalho objetivou analisar a relação entre o uso de selênio e a reprodução feminina, através de análises do ciclo estral, níveis de FSH e LH, e avaliação da taxa de fecundidade. Neste estudo, 36 ratas foram divididas em 3 grupos, e submetidas às técnicas de lavado vaginal e gavagem com selênio quelado, além de histerectomia total para contagem do número de fetos gerados. A análise dos resultados apontou que não houve influência significativa do selênio na fertilidade e fecundidade das ratas.

Palavras-chave: selênio, fertilidade, fecundidade, suplementação, ratas.

ABSTRACT

The use of selenium (Se) in human and animal nutrition has attracted the attention of researchers, due to its dual status as an essential and highly toxic nutrient (GIERUS, 2007). Manifold studies point to the role of the mineral in male fertility, however, there is no clear evidence about its influence on female fertility. Based on it, this study aimed to analyze the relationship between the use of selenium and female reproduction, through analysis of the estrous cycle, FSH and LH levels, and fecundity rate assessment. In this study, 36 rats were divided into 3 groups, and subjected to vaginal lavage and gavage techniques with chelated selenium, in addition to total hysterectomy to count the number of fetuses generated. The analysis of the results showed that there was no significant influence of selenium on fertility and fecundity in rats.

Keywords: selenium, fertility, fecundity, supplementation, rats.

1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um micronutriente importante na produção e constituição de proteínas, através das selenoproteínas, que possuem função estrutural e enzimática, destacando-se o poder antioxidante e catalítico. (Qazi et al., 2018). Além disso, previne doenças cardiovasculares sistêmicas e ativa fatores anticarcinogênicos (Stranges et al., 2011). É encontrado principalmente em frutos do mar, ovos, brócolis, nabo, nozes e, em especial, na castanha-do-brasil (Pieczyńska & Grajeta, 2015).

A concentração de Se em tecidos animais depende da quantidade ingerida na dieta (Tood, 2006). Quando há hiposselenemia, diversas funções metabólicas normais e enzimáticas ficam comprometidas (Navarro et al., 2008). Já a hipersselenemia se caracteriza por alopecia, unhas frágeis, distúrbios gastrointestinais, erupções cutâneas e anormalidades no sistema nervoso e endócrino, no entanto o nível de Se considerado tóxico pode variar amplamente entre os autores encontrados na literatura, bem como entre as espécies (Reilly, 2006; Navarro et al., 2008). A ingestão diária recomendada (RDA) para mulheres adultas, segundo a Academia Nacional de Medicina dos Estados Unidos, é de 55 µg (Mistry et al, 2011).

O selênio ganhou atenção especial quando evidências apontaram que a suplementação humana pode influenciar a motilidade dos espermatozoides, impactando na fertilidade masculina. (Kuchakulla, 2019). Sabe-se ainda da sua relação com a fisiologia do sistema reprodutor feminino, porém são escassos os estudos que caracterizam a modulação desse vínculo (Qazi et al., 2018).

Tanto as formas inorgânicas quanto orgânicas de Se estão supostamente envolvidas na regulação da expressão do gene SELENOP, que juntamente com outras selenoproteínas, como iodotironina deiodinase 3 (DiO3) e tioredoxina reductase (Txnrd), são expressas no útero (Qazi et al., 2018). Existem, também, evidências sobre a expressão de outros genes de selenoproteínas, a destacar: as glutationas peroxidases (GPX) GPX1, GPX2, GPX3 e GPX4, além de SELENOS e SELENOM, em ovários bovinos (Ceko et al., 2015).

A superexpressão de SELENOP e a expressão diminuída de GPX1 e GPX3 foram relatados em pequenos folículos bovinos atresícos em relação aos folículos bovinos saudáveis (Hatzirodos et al., 2014). Alterações na expressão SELENOP placentário e uterino também foram observadas com o avanço da gravidez em camundongos (Qazi et al., 2018). Além disso, sabe-se que as GPXs reduzem o peróxido de hidrogênio e os

peróxidos lipídicos em produtos não prejudiciais, desempenhando um papel fundamental na reprodução e na gravidez ao diminuir a ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mistry et al., 2011).

Não obstante, na fisiologia reprodutiva feminina, o hormônio luteinizante (LH), produzido nas células basófilas da adeno-hipófise, é responsável, principalmente, pelo desenvolvimento do corpo lúteo nos ovários e pela ovulação (Guyton & Hall, 2017). Arelado a isso, o hormônio folículo-estimulante (FSH), também produzido na adenohipófise, causa a proliferação das células foliculares ovarianas e estimula a secreção de estrógeno, sendo fundamental para a produção dos folículos. (Salha et al., 1998).

Os ovários secretam duas classes de hormônios: os estrogênios e as progestinas, sendo o estradiol o mais importante dos estrogênios e a progesterona a principal progestina. (Guyton & Hall, 2017).

Devido a essas funções, o FSH, juntamente com o LH, o estrógeno e a progesterona, são os principais hormônios reguladores do ciclo menstrual (Salha et al., 1998).

O ciclo menstrual de ratas, denominado ciclo estral, tem duração média de 4 dias e é regular em torno de 60% a 70% desses animais, sendo composto pelas fases consecutivas: proestro, estro, metaestro e diestro (Marcondes et al., 2002). Durante o ciclo estral, a prolactina, LH e FSH permanecem baixos e aumentam ao final da fase proestro, enquanto que os níveis de estradiol começam a aumentar em metaestro, atingindo níveis máximos durante o proestro e retornam à linha de base em estro (Marcondes et al., 2002). A secreção de progesterona também aumenta durante metaestro e diestro, diminuindo ao final desta fase, ao passo que o valor da progesterona sobe para atingir seu segundo pico no final do proestro (Marcondes et al., 2002). O período entre início do proestro e fim do estro ocorre a ovulação. Por conta desta rápida alternância entre os ciclos, os estudos acerca da fertilidade a partir de ratas é um bom modelo para análise das alterações do ciclo reprodutivo (Marcondes et al., 2002).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar o impacto da suplementação de selênio na fertilidade e fecundidade de ratas.

2 METODOLOGIA

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado utilizando o GPower 3.1.9.4 (Faul et al., 2007). Dado que este estudo visa verificar as diferenças entre 3 grupos de animais, sendo 2 suplementados com selênio e um controle, foi utilizado um poder de amostra de 80%, um erro máximo de 10% para medidas quantitativas, grupos independentes e uma

expectativa de diferenças de 50%. Com estes pressupostos, a amostra total calculada foi de 36 animais.

O material biológico utilizado na pesquisa foi composto por 36 ratas (fêmeas) e 12 ratos (machos) da raça Wistar (*Rattus norvegicus*), inicialmente com idade de 3 meses, e com peso médio de $232,2\text{g} \pm 17,4$ ($p = 0,09$). As ratas foram disponibilizadas pelo biotério central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEPG (CEUA-UEPG) (Processo CEUA: 2020/0241818). Durante o estudo, as ratas foram divididas em 3 grupos:

- G0 (grupo controle): recebeu 0,5 ml de soro fisiológico por gavagem diária;
- G1 (grupo 1): recebeu 0,2 ml de selênio quelado ($48 \mu\text{g}$) dissolvidos em 0,5 ml de soro fisiológico por gavagem diária;
- G2 (grupo 2): recebeu 0,4 ml de selênio quelado ($96 \mu\text{g}$) dissolvidos em 0,1 ml de soro fisiológico por gavagem diária;

Durante toda a realização da pesquisa, os animais foram mantidos no biotério supracitado, em condições constantes de luz e temperatura, com doze horas de claridade e doze horas de escuridão, em sala isenta de ruídos e iluminada com lâmpadas fluorescentes. Os animais foram acondicionados 3 a 3, em gaiolas-padrão, forradas com maravalha, sendo alimentados com ração comercial e água tratada. Em cada grupo, cada gaiola foi designada por numeral de 1 a 4, contendo animais designados de 0 a 2 através da marcação nos rabos com caneta atóxica, podendo ser ausência de marcação, um anel ou dois anéis.

Para análise do ciclo estral, foi realizada a técnica de lavado vaginal diariamente, sempre ao mesmo horário do dia, com posterior análise microscópica da coleta. A coleta de lavado vaginal foi feita com micropipeta calibrada e validada, com troca de ponteira a cada coleta, aspirando $10 \mu\text{l}$ com solução de soro fisiológico. Após a coleta, realizou-se análise com microscópio óptico para a identificação da fase do ciclo estral em que cada rata se encontrava, registrada em planilha na sequência. No lavado vaginal existem três tipos celulares visíveis em microscópio óptico, a saber: células epiteliais nucleadas, células cornificadas anucleadas e linfócitos. Dessa forma, os ciclos estrais podem ser determinados a partir da predominância dos tipos celulares. No proestro existe predominância de células epiteliais nucleadas, no estro predominância de células cornificadas anucleadas, no metaestro células epiteliais nucleadas, células cornificadas

anucleadas e linfócitos em iguais proporções e no diestro predominância de linfócitos (Marcondes et al., 2002). Ratas que ficaram de 4 ou 5 dias na mesma fase do ciclo ou que pularam a sequência proestro, estro, metaestro e diestro, foram consideradas em ciclo irregular (Marcondes et al., 2002).

Para a suplementação de selênio, utilizou-se solução de selênio quelado solubilizado em glicerol com concentração de 240 µg/ml, agulha de gavagem, seringa de 1 ml e soro fisiológico para diluição. Na realização do experimento, durante a primeira semana realizou-se apenas lavado vaginal e análise microscópica. Na segunda semana, adicionou-se a gavagem. Durante a terceira semana, manteve-se o lavado vaginal e a gavagem. Na quarta semana, foi interrompido o lavado vaginal e realizado apenas a gavagem. A quinta e a sexta semanas foram designadas para a fertilização das ratas, considerando-se que o tempo médio para a fecundação é de 14 dias. Desse modo, nessas semanas, houve exposição aos machos, sendo 1 macho em cada caixa, mantendo-se a gavagem. Após essas duas semanas de exposição, as ratas foram submetidas a eutanásia com anestésico inalatório Isoflurano 1 ml/ml. Posteriormente, foi realizada histerectomia total para retirada do útero e dos ovários com o objetivo de analisar a fecundidade, a partir da contagem do número de fetos gerados em cada rata.

O período total de realização do lavado vaginal e avaliação microscópica com identificação da fase do ciclo estral diariamente foi de 21 dias. Foram analisados os dados de ciclo estral registrados e o número de fetos por rata, em cada grupo, de forma descritiva. A avaliação das diferenças entre os grupos foi realizada a partir do método estatístico paramétrico ANOVA. A fim de interpretar os resultados, tabelas foram produzidas. Os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$ e as análises ocorreram no software Epi Info®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do ciclo estral das ratas revelou que não houve diferenças significativas entre os grupos. Comparou-se a frequência de registros de proestro entre os três grupos ao longo das semanas da aferição do ciclo estral (Tabela 1), considerando que os níveis de FSH e LH atingem seu pico em proestro e apresentam níveis baixos nas outras fases do ciclo, o que caracteriza a ocorrência de proestros como um importante marcador da presença desses hormônios e, portanto, da atividade reprodutiva.

Tabela 1. Frequência de registros da fase proestro nos grupos ao longo das semanas.

Grupos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	valor-p
G0	22	20	18	0,81
G1	17	19	19	0,91
G2	20	16	16	0,74
valor-p	0,66	0,74	0,90	

Fonte: Os autores.

A partir dos dados da tabela 1, percebeu-se que não houve diferença significativa entre os grupos na semana 1 ($p = 0,66$), semana 2 ($p = 0,74$) e semana 3 ($p = 0,90$). Ainda, observou-se que no decorrer das semanas as frequências de proestros nos grupos G0 ($p = 0,81$), G1 ($p = 0,91$) e G2 ($p = 0,74$) não se alteraram significativamente. Assim, constatou-se que o selênio não causou alterações nos níveis séricos de FSH e LH.

Outra fase do ciclo estral avaliada foi a estro, que apresenta alto nível de concentração do hormônio estrogênio, outro marcador importante da atividade reprodutiva feminina. A frequência da fase estro foi apresentada na Tabela 2, a fim de avaliar possível correlação entre o nível de estrogênio e o uso do selênio.

Tabela 2. Frequência de registros da fase estro nos grupos ao longo das semanas.

Grupos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	valor-p
G0	12	21	22	0,14
G1	13	15	19	0,32
G2	15	16	23	0,28
valor-p	0,80	0,41	0,75	

Fonte: Os autores.

A Tabela 2 revelou que também não houve diferença significativa entre os grupos na semana 1 ($p = 0,80$), semana 2 ($p = 0,41$) e semana 3 ($p = 0,75$). Além disso, ao longo das semanas, a frequência de estros nos grupos G0 ($p = 0,14$), G1 ($p = 0,32$) e G2 ($p = 0,28$) não se alterou significativamente. Portanto, constatou-se que o selênio não impactou os níveis séricos de estrogênio.

As análises do ciclo estral e dos hormônios reprodutivos relevaram que o selênio não exerceu influência sobre a fertilidade em ratas. Destacamos aqui a necessidade de realização de outras pesquisas para corroborar com esses resultados.

Para avaliação da fecundidade das ratas, após a contagem do número de fetos

gerados, relacionou-se as médias por grupo na tabela 3.

Tabela 3. Média aritmética do número de fetos por rata nos grupos.

Grupos	Média do nº de fetos por rata
G0	5,2 ± 5,3
G1	5,3 ± 5,8
G2	5,7 ± 5,4
valor-p	0,97

Fonte: Os autores.

A partir dos dados da tabela 3, percebeu-se que não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de fetos gerados por rata ($p = 0,97$). Além disso, observou-se elevados valores de desvio-padrão em cada grupo, e um p-valor próximo a 1, o que indica que não houve impacto do selênio sobre a fecundidade.

Por fim, ressalta-se que estudos na literatura apontaram que a menor selenemia pode aumentar a chance de infertilidade feminina (Maeda et al., 2019), assim, resguarda-se a possibilidade que outros resultados sejam obtidos em outras pesquisas. Não obstante, existem evidências de que o selênio pode ter um papel positivo na maturação e replicação dos oócitos (Mintziori et al., 2019), relação não encontrada nas análises de fecundidade desta produção. Ademais, reforça-se a necessidade da realização de mais estudos para elucidar a relação do selênio com o sistema reprodutor feminino.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o selênio não impactou significativamente o ciclo estral e os níveis sérios de FSH, LH e estrogênio das ratas. Além disso, não houve variação significativa no número de fetos gerados. Assim sendo, a suplementação de selênio não demonstrou influência na fertilidade e fecundidade das ratas. Trabalhos futuros incluem avaliações histológicas e bioquímicas.

REFERÊNCIAS

CEKO, M.J. et al. X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function. *Metallomics*, v. 7, p. 71–82, 2015.

FAUL, F.; ERDFELDER, E.; LANG, A. G.; & BUCHNER, A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, v. 39, p. 175-191, 2007.

GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1212-1220, 2007.

GUYTON, A.C. & HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier. 2017.

HATZIRODOS, N. et al. Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia. *BMC Genomics*, v. 15, 2014.

KUCHAKULLA, M. et al. A systematic review and evidence-based analysis of ingredients in popular male fertility supplements. *Urology*, v. 136, p. 133-141, 2019.

MAEDA, E. et al. Associations of environmental exposures to methylmercury and selenium with female infertility: A case-control study. *Environmental Research*, v. 168, p. 357-363, 2019.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J. & TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MINTZIORI, G. et al. Evidence for a manifold role of selenium in infertility. *Hormones*, v. 19, n. 1, p. 55-59, 2019.

MISTRY, H.D. et al. Selenium in reproductive health. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 206, n. 1, p. 21-30, 2011.

NAVARRO-ALARCON, M. & CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment*, v. 400, n. 1, p. 115-141, 2008.

PIECZYNSKA, J. E GRAJETA, H. The role of selenium in human conception and pregnancy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 29, p. 31-38, 2015.

QAZI, I. H. et al. Selenium, selenoproteins, and female reproduction: A review. *Molecules*, v. 23, n. 12, p. 30-53, 2018.

REILLY, C. *Selenium in Food and Health*. Springer, 2006.

SALHA, O.; ABUSHEIKA, N. & SHARMA, V. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Human Reproductive Update*, v. 4, n. 6, p. 816-832, 1998.

STRANGES, S. ET AL. Associations of selenium status with cardiometabolic risk factors: An 8-year follow-up analysis of the Olivetti Heart Study. *Atherosclerosis*, v. 217,

n. 1, p. 274-278, 2011.

TOOD, S. E. Metabolism of selenium in cats and dogs. Thesis in physiology and nutrition. Massey University, 2006.