

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Matheus Mülling dos Santos

**EFEITOS DA DIETA CONTENDO DISSELENETO DE
DIFENILA SOBRE RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS,
BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM UM MODELO DE
HIPERGLICEMIA EM PEIXE-ZEBRA**

Santa Maria, RS

2018

Matheus Mülling dos Santos

**EFEITOS DA DIETA CONTENDO DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM UM
MODELO DE HIPERGLICEMIA EM PEIXE-ZEBRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Nilda B. de Vargas Barbosa

Santa Maria, RS

2018

Santos, Matheus

EFEITOS DA DIETA CONTENDO DISSELENETO DE DIFENILA
SOBRE RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E
MOLECULARES EM UM MODELO DE HIPERGLICEMIA EM PEIXE-ZEBRA
/ Matheus Santos.- 2018.

87 p.; 30 cm

Orientadora: Nilda Berenice de Vargas Barbosa
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2018

1. Hiperglicemia 2. Disseleneto de difenila 3. Danio
rerio 4. Ansiedade 5. Estresse oxidativo I. Berenice de
Vargas Barbosa, Nilda II. Título.

Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de doutorado

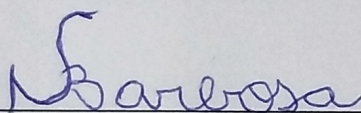
**EFEITOS DA DIETA CONTENDO DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM
UM MODELO DE HIPERGLICEMIA EM PEIXE-ZEBRA**

Elaborada por

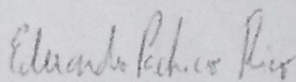
Matheus Mülling dos Santos

Como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**

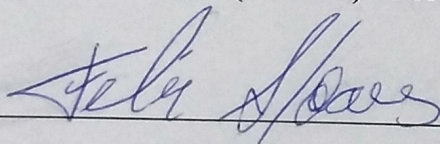
Comissão Examinadora:



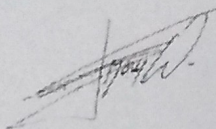
Prof.^a Dra. Nilda Vargas Barbosa (UFSM) - Presidente/Orientador



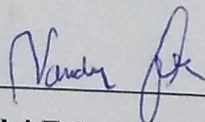
Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (UNESC) - Por parecer – Membro efetivo



Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares (UFSM) - Membro efetivo



Prof. Dr. Jeferson Luís Franco (UNIPAMPA) – Por parecer - Membro efetivo



Prof. Dr. Vanderlei Folmer (UNIPAMPA) - Membro efetivo

Santa Maria, 06 de agosto de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e companhia constante em todos os momentos.

Aos meus pais Leni e João, por todo apoio, amor e carinho durante toda minha vida.

À minha orientadora, Prof^a Nilda, por todos os ensinamentos, amizade, compreensão e confiança em meu trabalho.

Ao Prof. João Batista, por ter participado do início da minha vida no meio científico, contribuindo imensamente pra que eu percebesse que esse é o caminho que pretendo seguir.

A todos os colegas de laboratório os quais tive a oportunidade de conviver. Um agradecimento especial à Angelica, melhor amiga que foi de extrema importância pra mim nessa trajetória. Também ao Alessandro e Gabriel, grandes amigos que contribuíram muito nessa caminhada.

Ao professor Denis e Prof^a Vânia, bem como suas alunas Talise, Bárbara e Doti, muito obrigado por todas as contribuições nos trabalhos desenvolvidos nessa tese.

À CAPES pela bolsa de estudos durante todo o período do curso.

Por fim, agradeço à UFSM e ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

RESUMO

Tese de doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS DA DIETA CONTENDO DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM UM MODELO DE HIPERGLICEMIA EM PEIXE-ZEBRA

AUTOR: Matheus Mülling dos Santos

ORIENTADORA: Nilda B. de Vargas Barbosa

Data e local da defesa: Santa Maria, 06 de agosto de 2018.

Estudos vêm demonstrando um número cada vez maior de complicações secundárias causadas pelo diabetes. Dentre elas, estão doenças neuropsiquiátricas como ansiedade e depressão. Além disso, sabe-se que o estresse oxidativo desempenha um papel chave nessa desordem metabólica. Dessa forma, compostos que possuem atividade antioxidante vêm sendo considerados como possíveis agentes terapêuticos em modelos de hiperglicemia. Nesse contexto, destacamos o disseleneto de difenila (DD), um organocalcogênio com diversas atividades farmacológicas, incluindo antioxidante e neuroprotetora. No presente trabalho, utilizando o peixe-zebra como organismo modelo, investigamos os efeitos de uma dieta contendo DD sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e moleculares em um modelo de hiperglicemia. Inicialmente, com o intuito de avaliar uma possível toxicidade do composto, os peixes foram suplementados durante 74 dias com ração contendo 3 diferentes concentrações do composto (1, 2 e 3 mg/Kg). Nenhuma das concentrações utilizadas afetou a taxa de sobrevivência bem como parâmetros locomotores e de comportamento tipo ansiedade (através do teste “claro-escuro” e “tanque novo”). Sendo assim, escolhemos a concentração de 3mg/Kg para ser usada no modelo de hiperglicemia. Os animais receberam a suplementação com disseleneto de difenila por 74 dias. Durante os últimos 14 dias, os animais foram concomitantemente expostos a uma solução de 111 mM de glicose. Após, foram realizadas medidas da glicemia, testes comportamentais bem como análises bioquímicas e moleculares usando o cérebro como tecido alvo. A glicemia dos animais expostos à glicose foi aumentada em torno de 3,5 vezes e a suplementação com DD reduziu parcialmente esse aumento. Através do teste do “claro-escuro” e do “tanque novo” foi possível observar um aumento no comportamento tipo ansiedade dos animais expostos à glicose. Esse comportamento não foi observado nos animais suplementados com DD. Afim de entender os possíveis mecanismos envolvidos no efeito hipoglicêmico bem como na neuroproteção causada pelo DD, ensaios bioquímicos e moleculares foram realizados no cérebro dos peixes. A exposição a glicose causou uma diminuição na expressão dos receptores de insulina (*Insr1*, *Insr2*, *Insr3*, *Insr4*), a qual foi normalizada aos níveis do controle pelo DD. Além disso, DD *per se* aumentou a expressão do transportador de glicose 3 (*GLUT3*). Nos parâmetros de estresse oxidativo, observamos que a exposição à glicose causou aumento nos níveis de peroxidação lipídica (avaliada através da medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)) e oxidação de proteínas no tecido cerebral (avaliada através dos níveis de proteínas carboniladas (CP) e alteração na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)). Esses efeitos foram prevenidos pelo tratamento com DD. A suplementação aumentou *per se* a atividade das enzimas GPx e GST e os níveis de NPSH. Em paralelo, a suplementação com DD normalizou as alterações observadas nos níveis de expressão dos mRNA relativos ao

fator de transcrição Nrf2 e a enzima GPx3A. Os resultados obtidos mostram a eficácia da dieta em melhorar alterações bioquímicas e comportamentais induzidas por hiperglicemia, indentificando e pontuando a participação da sinalização redox e da via da insulina nos mecanismos subjacentes ao efeito hipoglicemiante e neuroprotetor do DD.

Palavras-chave: Diabetes, Hiperglicemia, Disseleneto de difenila, ansiedade, estresse oxidativo, peixe-zebra

ABSTRACT

PhD thesis Degree

Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF THE DIET CONTAINING DIPHENYL DISELENIDE ON BEHAVIORAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR RESPONSES IN A HYPERGLYCEMIA MODEL IN ZEBRAFISH

AUTHOR: Matheus Mülling dos Santos

ADVISER: Nilda B. de Vargas Barbosa

Place and Date of the Defense: Santa Maria, August 06th 2018.

Studies have been demonstrating an increasing number of secondary complications caused by diabetes. Among them are neuropsychiatric diseases such as anxiety and depression. In addition, oxidative stress is known to play a key role in this metabolic disorder. Thus, compounds that have antioxidant activity have been considered as possible therapeutic agents in hyperglycemia models. In this context, we highlight diphenyl diselenide (DD), an organocalcogen with several pharmacological activities, including antioxidant and anxiolytic. In the present work, using zebrafish as a model organism, we investigated the effects of diet containing DD on behavioral, biochemical and molecular parameters in a model of hyperglycemia. Initially, in order to evaluate a possible toxicity of the compound, the fish were supplemented for 74 days with food containing 3 different concentrations of the compound (1, 2 and 3 mg / kg). After the 74 days, mortality rate analyzes as well as locomotor and anxiety-like behavior parameters (through the "light-dark" test and the "novel tank") did not show any alteration caused by supplementation. Therefore, we used the concentration of 3mg / kg in the hyperglycemia model. The animals were supplemented with diphenyl diselenide for 60 days. Then, they were exposed for 14 days to a solution of 111 mM glucose, remaining with the supplementation in that period. After that, blood glucose measurements, behavioral tests as well as biochemical and molecular analyzes were performed on the animals' brains. The glycemia of the animals exposed to glucose was increased around 3.5 times and supplementation with DD was able to partially reduce this increase. Through the "light-dark" test and the "novel tank" test, an increase in the anxiety-like behavior of animals exposed to glucose was observed. However, this effect was not observed in animals supplemented with DD. In order to understand possible mechanisms involved in the hypoglycemic effect as well as in the neuroprotection caused by DD, biochemical and molecular assays were performed in the fish's brain. DD supplementation was able to prevent glucose-induced decrease in insulin receptor expression (*Insra1*, *Insra2*, *Insrb1*, *Insrb2*) in addition to increasing the expression of glucose transporter 3 (*GLUT3*). In the oxidative stress parameters, the diet containing DD partially prevented the decrease of the SOD enzyme activity caused by exposure to glucose and had an effect *per se* increasing the activity of the GPx and GST enzymes and the NPSH levels. In addition, DD

supplementation was able to prevent the decrease caused by exposure to glucose in the expression of GPx3A and the transcription factor Nrf2. Finally, we evaluated lipid oxidation parameters (through the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)) and protein oxidation (through the levels of carbonylated preteins (CP)). The results showed that both parameters were significantly increased by exposure to glucose and that the diet containing DD was effective in preventing this increase. The results of this work highlight the promising role of DD, in addition to showing for the first time possible mechanisms related to its hypoglycemic and neuroprotective effect.

Keywords: Diabetes, Hyperglycaemia, Diphenyl diselenide, anxiety, oxidative stress, zebrafish

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Esquema proposto para os mecanismos de excreção dos compostos de selênio.....	27
Figura 2 - Estrutura química do disseleneto de difenila.....	28
Figura 3- Mecanismo catalítico do DD para a detoxificação de peróxidos.....	29

ARTIGO

Figura 1 - Body wet weight of fish fed with DD and control diets.....	38
Figura 2 - Effect of dietary DD on brain cellular viability.	39
Figura 3 - Effects of dietary DD on locomotor and exploratory parameters in the novel tank diving test	40
Figura 4 - Effects of dietary DD on anxiety-like behavior in the light-dark test	40
Figura 5 - Brain Se content fish fed with DD and control diet.....	41
Figura 6 - Effects of glucose exposure and DD diet intake on fasting blood glucose levels...	41
Figura 7 - Effects of glucose exposure and DD diet intake on locomotor and exploratory parameters of fish evaluated by novel tank diving test.....	41
Figura 8 - Effects of glucose exposure and DD diet intake on anxiety-like behavior of fish evaluated by light-dark test.....	42

MANUSCRITO

Figura 1 - Effect of glucose exposure and dietary DD on fasting blood glucose levels in zebrafish..... 64

Figura 2 - Effect of glucose exposure and dietary DD on mRNA expression of insulin responsive genes.....65

Figura 3 - Effect of glucose exposure and dietary DD on oxidative biomarkers in brain of zebrafish.....66

Figura 4 - Effect of glucose exposure and dietary DD on brain antioxidant enzymes of zebrafish67

Figura 5 - Effect of glucose exposure and dietary DD on mRNA expression of redox responsive genes.....68

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1 - Primer sequences for RT-qPCR experiments	69
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação Americana do Diabetes
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CP	Proteínas carboniladas
Cu	Cobre
DAG	Diacilglicerol
DD	Disseleneto de difenila
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DT2	Diabetes tipo 2
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina
Fe	Ferro
FOXO	Forkhead box protein
GLUT3	Transportador de glicose 3
GLUTs	Transportadores de glicose
GPx	Glutationa peroxidase
GPx3A	Glutationa peroxidase 3A
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDF	Federação Internacional do Diabetes
Insr1	Receptor de insulina a1
Insr2	Receptor de insulina a2
Insr1	Receptor de insulina b1
Insr2	Receptor de insulina b1
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
L [•]	Radical lipídico
LDH	Lactato desidrogenase

LOO [•]	Radical peroxila
MDA	Malondialdeído
MnSOD	Manganês Superóxido dismutase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de sódio-potássio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO [•]	Óxido nítrico
NPSH	Tióis não-protéicos
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 - relativo ao fator 2
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO [•]	Peroxinitrito
ONOOH	Radical nitrosila
PEPCK	Fosfoenolpiruvado carboxiquinase
PKC	Proteína c quinase
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RI	Receptores de insulina
mRNA	RNA mensageiro
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
S	Enxofre
Se	Selênio
Se-H	Selenol
Se-OH	Ácido selenínico
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Espécies Reativas ao ácido tiobarbitúrico
UCP	Proteínas desacopladoras
δ-ALA-D	Ácido delta-aminolevulínico-desidratase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Diabetes Mellitus	18
2.2	Diabetes Mellitus e Sistema Nervoso Central	20
2.3	Estresse Oxidativo	21
2.4	Diabetes Mellitus e Estresse Oxidativo	23
2.5	Selênio	25
2.6	Disseleneto de Difenila	28
2.7	Peixe-zebra.....	30
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5	ARTIGOS CIENTÍFICOS	34
5.1	ARTIGO	35
5.2	MANUSCRITO	44
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	74
8	PERSPECTIVAS	75
9	REFERÊNCIAS	76

APRESENTAÇÃO

Esta tese está dividida em alguns itens. No item **INTRODUÇÃO** é apresentado um referencial teórico sucinto sobre os principais temas abordados no trabalho. No item **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** é apresentada uma revisão da literatura sobre os temas abordados e relacionados à tese. Após, são apresentados uma **JUSTIFICATIVA** para a realização desta pesquisa bem como os **OBJETIVOS**, tanto gerais quanto específicos da mesma.

A metodologia utilizada e os resultados obtidos estão expostos na forma de um artigo científico e um manuscrito, os quais se encontram no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS**. Tanto o artigo quanto o manuscrito estão subdivididos nas seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, que compõem a parte final da tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo e o manuscrito contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** se referem somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**. As demais referências bibliográficas estão presentes tanto no artigo quanto no manuscrito.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por um quadro crônico de hiperglicemia, o qual pode ocorrer tanto por deficiência como também por resistência à insulina (BROWNLEE, 2001). Mudanças no estilo de vida estão diretamente relacionadas com o rápido aumento no número de casos de diabetes nas últimas décadas (LEE et al., 2012; WHO, 2012). Atualmente, mais de 382 milhões de pessoas são afetadas pelo diabetes tipo 2 (DT2) e cerca de 14 mil pessoas morrem a cada dia em decorrência de alguma complicação relacionada à doença. A previsão é de que no ano de 2035, cerca de 592 milhões de pessoas apresentem DT2 (IDF, 2015). Vários estudos vêm demonstrando a associação entre a hiperglicemia e complicações secundárias, tais como: doenças cardiovasculares, disfunções renais, câncer, neuropatias, entre outras (KOH et al., 2012). Outra gama de estudos tem relacionado a hiperglicemia com complicações neuropsiquiátricas como ansiedade e depressão (COLLINS et al., 2009). Na literatura, já está bem estabelecido que a hiperglicemia causa prejuízos na cognição, transmissão sináptica, bem como na plasticidade neural (KODL e SEAQUIST, 2008). Nesse cenário, estudos mostram que cerca de 40% dos pacientes diabéticos desenvolvem algum sintoma relacionado à ansiedade (CLAVIJO et al., 2006). Há bastante tempo, diversos modelos de ansiedade vêm sendo descritos, utilizando principalmente roedores como organismo alvo (BHATTACHARYA, 1995; HILBER e CHAPILLON, 2005; FATURI et al., 2010; TYREE et al., 2016). No entanto, o peixe-zebra (*Danio rerio*) vem recebendo destaque como um novo organismo modelo em estudos relacionados com desordens neurológicas, incluindo ansiedade (CHAMPAGNE et al., 2010; BLASER et al., 2010; ROSEMBERG et al., 2011; STEWART et al., 2012). Vários testes comportamentais de modelos de ansiedade utilizando roedores já foram adaptados para o peixe-zebra com resultados bastante semelhantes (LEVIN et al., 2007; MAXIMINO et al., 2010a,b; GAIKWAD et al., 2011). O teste do “tanque novo” bem como o “claro-escuro” são dois dos protocolos mais utilizados para avaliar o comportamento tipo ansiedade em peixe-zebra (STEWART et al., 2012). O primeiro baseia-se no extinto natural de proteção em um ambiente desconhecido, onde o animal sob tal condição de estresse tem preferência pela parte de baixo do tanque (LEVIN et al., 2007; CACHAT et al., 2010). Já o teste “claro-escuro”, leva em consideração o extinto de camuflagem, no qual o animal tende a preferir a parte escura do aparato (MAXIMINO et al., 2010a). Além de modelos relacionados à ansiedade, estudos voltados para diabetes/hiperglicemia e suas complicações vêm adotando o peixe-zebra como organismo modelo (GLEESON et al., 2007; CAPIOTTI et al., 2014a,b;

DORSEMANS et al., 2016; CONNAUGHTON et al., 2016). Diferentes metodologias são usadas para induzir um quadro de hiperglicemia em peixe-zebra. Semelhantemente a roedores, a administração de estreptozotocina ou aloxano pode ser usada para causar a destruição das células beta pancreáticas (MOSS et al., 2009; SHIN et al., 2012). Já outro protocolo de indução de hiperglicemia em peixe-zebra consiste na imersão dos animais em solução de glicose, considerando o fato dos peixes facilmente absorverem moléculas da água (MOYLE e CECH, 2000; GLEESON et al., 2007; CAPIOTTI et al., 2014a). Diversos fatores contribuem para a utilização do peixe-zebra em modelos de hiperglicemia. Por exemplo, Toyoshima et al. (2008) identificou e caracterizou os receptores de insulina do peixe-zebra (insra e insrb), os quais são homólogos aos receptores humanos. Além disso, componentes do metabolismo da glicose como os transportadores de glicose (GLUTs) e a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) foram identificadas em peixe-zebra, possuindo regulação e atividade semelhantes a homólogos de mamíferos (TANIGUCHI et al., 2006; ELO et al., 2007). Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na etiologia bem como na progressão do diabetes não estão completamente elucidados. No entanto, sabe-se que o estresse oxidativo desempenha um papel central em muitas das complicações relacionadas ao diabetes (ROCHETTE et al., 2014; RAVASSA et al., 2015; MASON et al., 2016; FARIA e PERSAUD, 2017). Sendo assim, tanto compostos naturais como também sintéticos que possuem potencial antioxidante, vêm sendo investigados como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento dessa desordem metabólica (BARBOSA et al., 2006; CHENG et al., 2013; ECKER et al., 2017). Nesse contexto, destacamos o disseleneto de difenila (DD), um composto orgânico de selênio com diversas propriedades farmacológicas já demonstradas em roedores, incluindo antioxidante (ROSSATO et al., 2002), antinociceptiva (SAVEGNAGO et al., 2007), anti-inflamatória (NOGUEIRA et al., 2003) e neuroprotetora (GLASER et al., 2013). Além disso, já foi demonstrado também que o consumo de dietas contendo DD reduziu danos de cunho oxidativo em ratos diabéticos (BARBOSA et al., 2008). Nesse mesmo estudo, a suplementação com DD reduziu os níveis de glicose dos animais. No entanto, os mecanismos pelos quais o DD exerceu tal efeito permanecem desconhecidos. Estudos do mesmo grupo de pesquisa mostraram que esta mesma dieta contendo DD foi efetiva em reduzir de forma significativa o comportamento tipo depressivo em ratos com hipotireoidismo (DIAS et al., 2014). Particularmente, em peixe-zebra, Ibrahim et al. (2014) demonstrou o efeito ansiolítico do DD após expor os animais à diferentes concentrações do composto na água. Todavia, até então não haviam pesquisas relacionando os efeitos da suplementação com DD em modelos de hiperglicemia em peixe-zebra.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) não se trata de apenas uma doença mas sim de um grupo de distúrbios metabólicos, tendo como principal característica a presença de um quadro de hiperglicemia, a qual pode ocorrer tanto devido a problemas na secreção da insulina, na ação do hormônio, ou ambos (Sharma et al., 2016). De acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF), em 2015, cerca de 415 milhões de pessoas no mundo são acometidas pelo diabetes, sendo que esse número inclui cerca de 193 milhões de casos não diagnosticados, o que corresponde a 46,5% do total de casos. Segundo o mesmo estudo, há a projeção de que esse número chegue a 642 milhões no ano de 2040. O Brasil ocupa a quarta posição entre os países com maior incidência de indivíduos diabéticos, atrás apenas de China, Índia e Estados Unidos. No ano de 2015, cerca de 14,3 milhões de pessoas conviviam com o diabetes no Brasil. Segundo projeções, em 2040 esse número deverá ser em torno de 23,3 milhões (IDF, 2015).

De acordo com a OMS e a Associação Americana de Diabetes (ADA), o DM pode ser classificado como: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional, além de outros tipos específicos de DM. Já o pré-diabetes pode ser definido como sendo uma tolerância diminuída à glicose atuando como fator de risco para o desenvolvimento do DM assim como de doenças cardiovasculares (HIRSHBERG e RAZ, 2011; SCHWARTS et al., 2010).

O DM1, conhecido como insulino-dependente, é responsável por 5-10% de todos os casos de DM. Tem como causa uma reação autoimune do organismo contra as células β pancreáticas, as quais são responsáveis pela produção de insulina, culminando com a deficiência absoluta do hormônio (RICHARDSON et al., 2014). Essa reação imunológica pode ser de origem exclusivamente genética, ou ainda ocorrer devido a algum evento ambiental que cause alterações nas características iminogênicas das células pancreáticas. Além disso, alguns estudos epidemiológicos também sugerem que tal processo autoimune possa ser desencadeado por infecções virais (BACH, 1994). O DM1 é diagnosticado normalmente em crianças e adultos jovens com menos de 30 anos, porém, pode ocorrer em qualquer idade (SZABLEWSKI, 2014).

O DM2, conhecido como não-insulino-dependente, é o tipo mais comum da doença, sendo responsável por 90-95% dos casos. Nesse tipo de diabetes, as células β pancreáticas são capazes de produzir o hormônio insulina, porém, há uma resistência das células alvo à ação do

hormônio (SHARMA et al., 2016). O DM2 pode ser desencadeado por diferentes fatores, tais como: sedentarismo, obesidade, dieta inapropriada, susceptibilidade genética, entre outros. Essa ampla gama de fatores contribui de maneira significativa para o número cada vez maior de indivíduos com DM2 (LEE et al., 2012). Esse tipo de DM pode ocorrer em qualquer idade, porém, normalmente o diagnóstico ocorre em indivíduos após os 40 anos de idade (ARTOLA et al., 2002).

O DM gestacional pode ser definido como qualquer tipo de intolerância a carboidratos que resulte em algum quadro de hiperglicemia, tendo o diagnóstico no período de gestação (BELLAMY et al., 2009). Normalmente ocorre em torno da 24^a semana de gestação, tendo como possível causa o bloqueio na ação da insulina causado pelos hormônios placentários (ARTOLA et al., 2002). No DM gestacional pode ocorrer tanto por um prejuízo na produção de insulina pelas células β pancreáticas, como também pela resistência à ação do hormônio (KÜHL, 1998). Além disso, estudos apontam um maior risco para o desenvolvimento de DM2 em mulheres que foram acometidas pelo DM gestacional (BELLAMY et al., 2009; VEERASWAMY et al., 2012).

Para que haja diminuição dos níveis de glicose sanguínea, é necessária a ação da insulina em conjunto com a sinalização dos receptores de insulina (RI) no tecido adiposo e muscular. Em condições não patológicas, ocorre a depuração do excesso de glicose sanguínea pelo fígado e subsequente armazenamento como glicogênio ou ácidos graxos. Porém, em indivíduos diabéticos há uma incapacidade de que ocorra essa correção dos níveis glicêmicos. Tal situação é definida como resistência à insulina, onde quantidades normais de insulina não são suficientes para estimular as respostas necessárias nos tecidos alvo (BLOOMGARDEN, 2008; MCGARRY, 2002; SESTI, 2006). O metabolismo da glicose é diretamente afetado pela resistência à insulina através dos defeitos na sinalização dos RI (PIROLA et al., 2004; SALTIEL e KAHN, 2001). Quando a insulina se liga ao receptor, ocorre a autofosforilação dos resíduos da tirosina quinase (Tyr) da sua subunidade β e a fosforilação dos substratos de RI 1 a 4 (KIM e FELDMAN, 2012). Então, é realizada a transdução do sinal de três diferentes vias de sinalização, sendo elas: a via dependente da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a qual atua mediando respostas metabólicas tais como o metabolismo da glicose, de proteínas e lipídeos (KANAI et al., 1993); a via CAP/Cbl é necessária para que haja a translocação do GLUT 4; por fim, a via ativada pela proteína ativada por mitógeno (MAP-quinase) que resulta na proliferação e diferenciação celular (PIROLA et al., 2004).

2.2 Diabetes Mellitus e Sistema Nervoso Central

Há bastante tempo, diversos estudos vêm demonstrando relações entre o diabetes e o desenvolvimento de desordens neuropsiquiátricas tais como ansiedade e depressão (Moulton et al., 2015; Purewal and Fisher, 2018). Tanto o DM1 quanto o DM2 podem afetar o sistema nervoso central (SNC) (COLE et al., 2007; LEE et al., 2014; TONOLI et al., 2014). Os mecanismos envolvidos nessas alterações causadas no cérebro de indivíduos diabéticos ainda não estão totalmente elucidados, porém, estudos sugerem que a hiperglicemia assim como a resistência à insulina desempenhem um significativo papel nesses processos (KODL e SEAQUIST, 2008).

Um quadro de hiperglicemia crônica é capaz de alterar os níveis cerebrais de insulina, assim como a atividade dos RI no cérebro. Além disso, a hiperglicemia crônica é capaz de promover o aumento da oligomerização β -amilóide e induzir a hiperfosforilação da proteína Tau (GASPARINI e XU, 2003; WATSON e CRAFT, 2004). Outra consequência da resistência à insulina no SNC é a aceleração do processo de envelhecimento biológico, com a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), bem como de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SMITH et al., 2003). Todos esses mecanismos parecem estar diretamente relacionados à disfunção no SNC observada em indivíduos diabéticos (REAGAN, 2012).

A insulina presente no SNC é oriunda das células β pancreáticas e chega ao cérebro através do fluido cérebro-espinhal (BURNS et al., 2007; SALKOVIC-PETRISIC e HOYER, 2007; EROL, 2008). A insulina atravessa a barreira hematoencefálica e então é transportada até o encéfalo através de um transportador regulável, mediado por saturação e sensível à temperatura (BURNS et. al., 2007; SALKOVIC-PETRISIC e HOYER, 2007). Esse processo é limitado por um sistema de barreiras que é formado pelas junções de oclusão entre as células endoteliais (SCHULINGKAMP et. al., 2000).

Além do transporte de glicose e do metabolismo periférico, outras ações da insulina já foram descritas, mostrando que o hormônio está diretamente envolvido também na integração dos sinais periféricos hormonais e nutricionais, os quais são mediados pelos chamados neurônios glicosensíveis, que são um grupo de neurônios especializados do núcleo arqueado do hipotálamo. Tais neurônios respondem a sinais periféricos que controlam o comportamento de ingesta alimentar assim como a energia basal (PORTE et al., 2005). A insulina é capaz de provocar uma resposta do eixo hipotálamo-fígado para que haja a regulação da produção de glicose hepática. Além disso, outras importantes funções são atribuídas à insulina no cérebro,

tais como o suporte à função neuronal, remodelação sináptica, além da participação na modulação dos níveis de neurotransmissores (CRAFT et al., 2012).

A desordem neuropsiquiátrica associada ao diabetes mais estudada é a depressão. Estudos indicam que a depressão é diagnosticada com uma incidência duas vezes maior em pacientes diabéticos em comparação aos não-diabéticos (ANDERSON et al., 2001). Por outro lado, poucas pesquisas tem investigado a associação do diabetes com a ansiedade. Os estudos abordando tal relação demonstram que os pacientes diabéticos que apresentam quadros de ansiedade, costumam ter também alterações nos sintomas relacionados ao diabetes, tais como: aumento de dor (COLLINS et al., 2009), aumento da glicemia (LUDMAN et al., 2006; ANDERSON et al., 2002), diminuição na qualidade de vida (CHYUN et al., 2006), aumento da depressão (TRENTO et al., 2011), aumento do índice de massa corpóreo (IMC) (BALHARA e SAGAR, 2011). Em um artigo de revisão, Grigsby et al. (2002) demonstraram que 40% dos pacientes com diabetes apresentam sintomas de ansiedade elevados e que a prevalência geral de transtornos de ansiedade relatados é de 14%.

2.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como o evento no qual há um desequilíbrio entre a produção de espécies pró-oxidantes e a ação dos mecanismos de defesa do organismo contra essas espécies. Dentre essas espécies pró-oxidantes podem ser destacadas os radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) (WESTERBLAD e ALLEN, 2011). Os radicais livres podem ser denominados como sendo espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons não pareados em seu orbital mais externo. Essa característica torna essas espécies altamente reativas, uma vez que acabam reagindo com outras espécies para que haja um emparelhamento de elétrons nesse orbital (HALLIWELL, 2006). Um bom exemplo é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é produzido quando há uma redução incompleta da molécula de oxigênio, recebendo um elétron ao invés de dois. O $O_2^{\cdot-}$ tem a capacidade de causar danos a sistemas biológicos principalmente devido à sua participação na chamada reação de Fenton, onde há a formação do radical hidroxila (OH^{\cdot}), oriundo da reação entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os metais Fe^{2+} e Cu^{2+} (YALFANI et al., 2011). Além dessas reações, o $O_2^{\cdot-}$ pode ainda reagir com o óxido nítrico (NO^{\cdot}), culminando na formação do peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), o qual pode dar origem ao radical nitrosila ($ONOOH$), o qual com sua decomposição é capaz de elevar os níveis do radical OH^{\cdot} (HUGHES, 1999; KAHN et al., 2000).

Para se estabilizarem, as espécies reativas acabam interagindo facilmente com biomoléculas tais como ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e proteínas, culminando na oxidação das mesmas. Quando essa oxidação ocorre em lipídeos, ocorre uma reação em cadeia denominada peroxidação lipídica. Nesse tipo de reação, ocorrem os processos de iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, a espécie reativa sequestra um átomo de um ácido graxo poliinsaturado resultando na formação de um radical lipídico (L^{\bullet}). Na etapa de propagação, o L^{\bullet} reage rapidamente com O_2 formando o radical peroxila (LOO^{\bullet}). Este por sua vez, acaba por sequestrar um novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente L^{\bullet} . A etapa de terminação ocorrerá quando os radicais (L^{\bullet} e LOO^{\bullet}) produzidos anteriormente propagam-se até se autodestruírem. As reações de peroxidação lipídica dão origem a hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos, os quais podem ser detectados em amostras biológicas, sendo eles bastante utilizados para avaliar o estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A membrana plasmática assim como as membranas das organelas contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, sendo por tanto bastante suscetíveis à peroxidação lipídica. Como consequências desse processo, pode haver alterações na estrutura bem como na permeabilidade das membranas. Sendo assim, pode ocorrer a perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas além da formação de produtos citotóxicos, podendo culminar na morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Outro alvo biológico das espécies reativas que também merece atenção são as proteínas. Uma das consequências do ataque de espécies reativas às proteínas é a formação das chamadas proteínas carboniladas, sendo estas consideradas importantes biomarcadores de estresse oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2006; YAO e RAHMAN, 2011). As espécies reativas reagem com os aminoácidos das proteínas gerando produtos como aldeídos, cetonas e lactamas. Por exemplo, a oxidação da prolina assim como da arginina, dará origem ao glutamato 5-semialdeído, ao passo que a oxidação do triptofano gera pelo menos sete produtos diferentes (MOLLER et al., 2011).

Para combater os danos causados pelos radicais livres, ERO, bem como ERN, as células possuem um mecanismo de defesa antioxidante, o qual pode ser enzimático ou não-enzimático. Nos mecanismos de defesa enzimáticos podemos destacar as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A enzima SOD atua catalizando a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , o qual possui menor reatividade comparado ao $O_2^{\bullet-}$. Já a CAT atua sobre o H_2O_2 , catalizando sua conversão em H_2O . Semelhantemente à CAT, a enzima GPx

também atua na conversão do H_2O_2 em H_2O , porém, com um mecanismo diferente, o qual envolve a utilização da glutathiona reduzida (GSH) atuando paralelamente com a glutathiona redutase (GR). Quanto ao sistema de defesa antioxidante não-enzimáticos, alguns exemplos são a vitamina C, vitamina E, flavonóides, betacaroteno, entre outros (HELMUT et al., 2017).

2.4 Diabetes Mellitus e Estresse Oxidativo

Na literatura, diversos estudos vêm demonstrando que pacientes diabéticos estão mais propensos a apresentar quadros de estresse oxidativo em comparação a indivíduos saudáveis (BLOCH-DAMTI e BASHAN, 2005; JAIN et al., 1990). Esses estudos revelam que pacientes diabéticos possuem um aumento na produção de ERO e marcadores de estresse oxidativo acompanhado por uma diminuição das defesas antioxidantes. Dessa forma, a contribuição da hiperglicemia na indução de estresse oxidativo ocorre tanto pela produção direta de ERO, como também pela alteração no equilíbrio redox. Alguns mecanismos envolvidos na relação entre a hiperglicemia e o estresse oxidativo já estão bem estabelecidos, tais como: o aumento do fluxo na via dos polióis, aumento da formação intracelular de produtos finais de glicação avançada (AGEs), ativação da proteína C quinase (PKC) e a superprodução de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela cadeia transportadora de elétrons (AHMAD et al., 2005; BROWNLEE, 2001).

Na via dos polióis, a glicose é reduzida a sorbitol pela ação da enzima aldose redutase, dependente de NADPH. O sorbitol formado é então oxidado a frutose, reação catalizada pela sorbitol desidrogenase, com redução de NAD^+ a NADH. Em condições normais, a aldose redutase apresenta baixa afinidade pela glicose sendo que apenas um pequeno percentual de glicose é convertida em sorbitol. Contudo, em condições hiperglicêmicas há um aumento na atividade enzimática, o que acaba resultando em uma diminuição do conteúdo de NADPH. A NADPH é um cofator essencial para a síntese de GSH, o principal antioxidante intracelular. Dessa forma, o aumento do fluxo da via dos polióis não causa produção direta de ROS, porém, contribui com um desequilíbrio no status redox da célula, diminuindo a síntese e consequentemente a quantidade de GSH na célula (AHMAD et al., 2005; BROWNLEE, 2001).

Outro importante mecanismo pelo qual a hiperglicemia pode desencadear o estresse oxidativo é o aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (AHMAD et al., 2005; BROWNLEE, 2001; WRIGHT et al., 2006). A formação dos AGEs envolve inicialmente ligações covalentes de grupos aldeído ou cetona de açúcares redutores com grupamentos amino de proteínas, formando as chamadas bases de Schiff. Essas bases de Schiff

sofrem rearranjos espontâneos formando os produtos de Amadori, os quais são cetoaminas mais estáveis. Os produtos de Amadori podem por sua vez ser convertidos diretamente a AGEs, ou então, sofrerem auto-oxidação dando origem a intermediários carbonílicos reativos tais como o glioxal e o metilglioxal, os quais também podem sofrer rearranjos dando origem a AGEs (SATO et al., 2006). A principal contribuição dos AGEs para o estresse oxidativo se dá quando os AGEs ligam-se aos seus receptores, conhecidos como “RAGE”. Essa ligação promove a ativação do sistema NADPH oxidase, com consequente formação de ROS (BASTA et al., 2004).

A ativação da via DAG-PKC também consiste de um importante mecanismo relacionado ao estresse oxidativo oriundo da hiperglicemia (AHMAD et al., 2005; BROWNLEE, 2001). A família PKC consiste em diferentes isoformas da PKC, tendo a maioria o diacilglicerol (DAG) como mensageiro secundário. Na hiperglicemia, há um aumento na produção do intermediário glicolítico diidroxiacetona fosfato, o qual é reduzido a glicerol 3-fosfato, que acaba culminando com um aumento na síntese de novo do DAG. A hiperglicemia pode também induzir indiretamente a ativação da PKC através da ligação entre AGEs e RAGE, além da via dos polióis (AHMAD et al., 2005). Além disso, a PKC ativada contribui diretamente com o estresse oxidativo através da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e do sistema NADPH oxidase, culminando com a produção excessiva de ROS (BROWNLEE, 2001).

Outro mecanismo relacionando hiperglicemia e estresse oxidativo que também merece destaque é a o aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ através da cadeia transportadora de elétrons. Em condições normais, a oxidação da glicose inicia no citosol através da glicólise. Durante as reações da glicólise são gerados piruvato e NADH. O piruvato fornece equivalentes redutores ao ciclo de Krebs, onde também serão formadas moléculas de NADH, além de moléculas de $FADH_2$. Tanto o NADH como também o $FADH_2$ fornecem elétrons aos complexos da cadeia transportadora de elétrons para que haja a síntese de ATP. Nesse processo, elétrons são doados ao O_2 , culminando na formação de $O_2^{\cdot-}$. Em condições normais, as defesas antioxidantes conseguem detoxificar o $O_2^{\cdot-}$ formado, porém, em condições hiperglicêmicas, o fluxo de elétrons é bem maior, culminando em uma produção exacerbada de $O_2^{\cdot-}$ (BROWNLEE, 2001).

A insulina desempenha um importante papel na regulação redox em vários tecidos, o que a confere um caráter antioxidante (WANG et al., 2012). A geração de ROS através da cadeia transportadora de elétrons é atenuada pela insulina através da regulação da expressão de proteínas desacopladoras (UCP). Além disso, a insulina também é capaz de inibir a expressão de enzimas do complexo NADPH oxidase (HAN et al., 2012). A insulina também tem um papel

chave na ativação de fatores de transcrição mediadores de estresse oxidativo, tais como Nrf2 e FOXO (ROCHETE et al., 2014).

O Nrf2 é um fator de transcrição conhecido por ser o principal regulador da resposta antioxidante da célula. É capaz de modular a expressão de centenas de genes, incluindo não apenas aqueles que controlam enzimas antioxidantes, mas também genes que controlam respostas imunes e inflamatórias (HYBERTSON et al., 2011). Em condições onde não há estresse, as concentrações do Nrf2 são baixas e a proteína permanece retida no citoplasma, associada à Keap1. Já quando ocorre estresse oxidativo, o Nrf2 se dissocia da Keap-1 e então é translocado até o núcleo da célula. Uma vez no núcleo, é capaz de regular positivamente a expressão de diversos genes que fazem parte do sistema de defesa antioxidante, os quais na região promotora contém um elemento de resposta antioxidante (ARE) (MAGESH et al., 2012). A via Keap1-Nrf2-ARE responde ao estresse oxidativo expressando uma ampla gama de enzimas antioxidantes, tais como: GPx, SOD e CAT (KOBAYASHI e YAMAMOTO, 2005).

O fator de transcrição FOXO é ativado sob vários estímulos de estresse que ocorrem na célula, tendo um papel crucial como um mediador do estresse oxidativo. O FOXO é capaz de modular funções normais da célula mas também pode atuar em processos patológicos. Esse fator de transcrição também pode ser considerado como um “sensor” de estresse oxidativo, uma vez que sua atividade é regulada pelo H_2O_2 (HYBERTSON et al., 2012). Um aumento nos níveis de ROS intracelular faz com que o FOXO seja translocado para o núcleo, onde ele é ativo. O estresse oxidativo regula a atividade do FOXO através de diferentes modificações pós-translacionais, tais como: fosforilação, acetilação e ubiquitinação. A atuação do FOXO no estresse oxidativo se dá principalmente por modular a expressão de enzimas antioxidantes como a MnSOD e a CAT (ROCHETE et al., 2014)

2.5 Selênio

O selênio (Se) foi descoberto pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius no ano de 1817. Esse elemento pertence ao grupo 16 da tabela periódica fazendo parte da família dos calcogênios. O Se pode apresentar-se em quatro diferentes estados de oxidação, sendo eles: selenato (Se^{6+}), selenito (Se^{4+}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{2-}). Devido à proximidade na tabela periódica, O Se compartilha algumas propriedades físicas e químicas com o elemento enxofre (S). Essa semelhança permite que o Se substitua o S em algumas situações. Porém, as

diferenças físico-químicas existentes entre os elementos constituem a base da especificidade de suas funções biológicas (STADTMAN, 1980).

O Se é considerado um elemento traço essencial. Essa essencialidade nutricional do elemento foi descoberta em ratos no ano de 1957 (SCHWARTZ e FOLTZ, 1957). Antes disso, sabia-se apenas que altos níveis eram capazes de causar toxicidade (LEVANDER e BURK, 1994). Atualmente, sabe-se que uma deficiência de Se está associada diretamente com duas patologias endêmicas existentes em regiões da China e Rússia cujos solos possuem baixa quantidade de Se. Uma das uma das patologias é a doença de Keshan, a qual consiste em um quadro de cardiomiopatia congestiva que afeta normalmente crianças e mulheres em idade fértil. A outra patologia é a doença de Kashin-Beck, caracterizada por uma desordem óssea que acomete normalmente crianças e adolescentes. Nessa doença, ocorre degeneração e necrose na cartilagem articular, bem como na placa epifisiária (ROMAN et al., 2014). Indiretamente, diversos estudos vêm apontando a deficiência de selênio como fator importante no desencadeamento de diferentes patologias, tais como: diabetes, câncer, esclerose, doenças cardiovasculares, entre outras (NAVARRO-ALARCÓN e LÓPEZ-MARTINEZ, 2000; REDDI et al., 2001; ROMAN et al., 2014). Nessas condições patológicas o Se parece atuar principalmente devido a seu potencial antioxidante. O Se na forma de selenocisteína faz parte do sítio ativo de importantes enzimas do sistema de defesa antioxidante, como por exemplo a GPx (URSINI et al., 1985), tioredoxina redutase (HOLMGREN, 1985) e 5' deiodinase (BEHNÉ e KYRIAKOPOULOS, 1990). É importante ressaltar que a dose de Se a ser ingerida é de extrema importância para que o elemento desempenhe esse papel, uma vez que existe uma linha tênue entre a quantidade requerida pelo organismo e a quantidade que já apresenta efeitos tóxicos.

Em mamíferos, o Se parece ser rapidamente absorvido no duodeno, seguido pelo jejuno e íleo. O Se também pode ser absorvido por tecidos cutâneos, assim como por inalação. Essas duas vias são portanto relacionadas com a exposição, bem como com a intoxicação ocupacional causada por compostos de Se. Uma vez absorvido, os níveis mais elevados de Se são encontrados nos eritrócitos, fígado, baço, coração, unha e esmalte dos dentes (MARTIN e GERLACK, 1972). Quando ocorre intoxicação crônica em animais, o Se é depositado principalmente nos rins, fígado, pâncreas, baço e pulmões (WILBER, 1980). Formas inorgânicas de selênio após serem absorvidas são reduzidas ao intermediário seleneto (PARK et al., 2004). Quando há administração de selênio inorgânico na forma de selenito, este é convertido a seleneto nos eritrócitos pela ação da glutatona, sendo então transportado pelo plasma ligado à albumina (SHIOBARA et al., 1998). Já as formas orgânicas de selênio como

os aminoácidos, são transformados em seleneto por vias distintas. A transformação da selenocisteína, por exemplo, ocorre por meio de ligações com a β -ligase. Já a selenometionina passa por reações de transselenação (SPALLHOLZ et al., 2004). O intermediário seleneto é então transportado para diferentes tecidos, principalmente para o fígado para ser utilizado na síntese de selenoproteínas.

Quanto à excreção, o Se pode ser excretado pela urina, fezes e também pelo ar expelido. A excreção urinária pode ser de extrema importância em casos de intoxicação ou de exposição a níveis elevados do elemento (VALENTINE et al., 1978). Em níveis não tóxicos, o selênio é encontrado na urina principalmente na forma de 1 β -metilseleneno-N-acetil-D-galactosamina, conhecido também como seleno-açúcar. Esse seleno-açúcar forma-se a partir da transferência de uma forma ativada do selênio na qual a GSH encontra-se conjugada ao selênio a uma forma ativa de açúcar, para que então seja formado o GSH conjugado ao açúcar (seleno-açúcar A), sendo esse então metilado, culminando na formação do seleno-açúcar urinário (seleno-açúcar B). Porém, em níveis elevados, o seleneto é excretado na forma dos compostos dimetilselenônio e trimetilselenônio (KOBAYASHI et al., 2002; SUZUKY et al., 2006) (Figura 1).

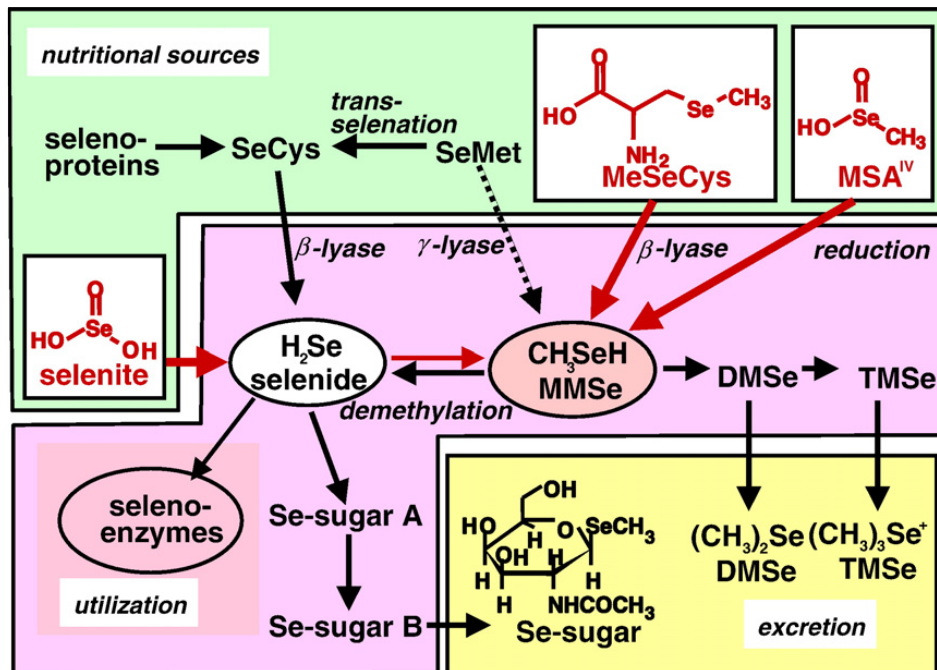


Figura 1: Esquema proposto para os mecanismos de excreção dos compostos de selênio metilselenocisteína (MeSeCys), ácido metil selenínico (MSA^{IV}) e selenito. Abreviações: dimetilseleneto (DMSe), metilselenol (MMSe), selenocisteína (SeCys), selenometionina (SeMet), e trimetilselenônio (TMSe). Fonte: Suzuki et al., 2008.

2.6 Disseleneto de Difenila

Desde a década de 30, os organocalcogênios vêm despertando interesse de maneira crescente por parte dos químicos orgânicos. Tal interesse se deve à descoberta de suas aplicações sintéticas (COMASSETO, 1983), bem como suas propriedades biológicas e farmacológicas (KANDA et al., 1999; NOGUEIRA et al., 2004). O disseleneto de difenila (DD– Figura 2) é um composto orgânico contendo Se, pertencendo portanto à classe dos organocalcogênios, largamente utilizado como intermediário em reações de síntese orgânica (PAULMIER, 1986; BRAGA ET AL., 1996).

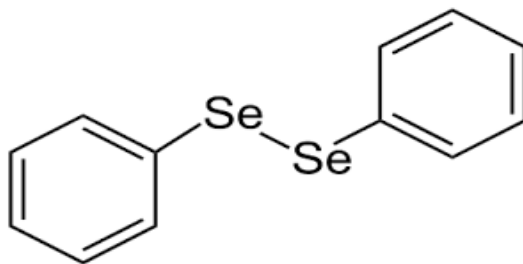


Figura 2: Estrutura química do disseleneto de difenila.

Inúmeras atividades farmacológicas vêm sendo atribuídas ao DD, tais como antioxidante (ROSSATO et al., 2002; MEOTTI et al., 2004), anti-úlceras (SAVEGNAGO et al., 2006, INEU et al., 2008), neuroprotetor (GHISLENI et al., 2003), hepatoprotetor (BORGES et al., 2005), anti-inflamatório e antinociceptivo (SAVEGNAGO et al., 2007), do tipo antidepressiva (SAVEGNAGO et al., 2008; DIAS et al., 2014), do tipo ansiolítica (GHISLENI et al., 2008, ROSA et al., 2016), anti-hiperglicêmico (BARBOSA et al., 2006). Além disso, o DD apresenta efeitos antioxidantes em diversos modelos de toxicidade induzida por estresse oxidativo (MEOTTI et al. 2004; SANTOS et al., 2004, 2005; LUCHESE et al., 2007, PRIGOL et al., 2009). Estudos sugerem que esses efeitos devem estar associados com a capacidade que o DD possui de reagir eficientemente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos, através de reação similar à catalisada pela GPx (Figura 3).

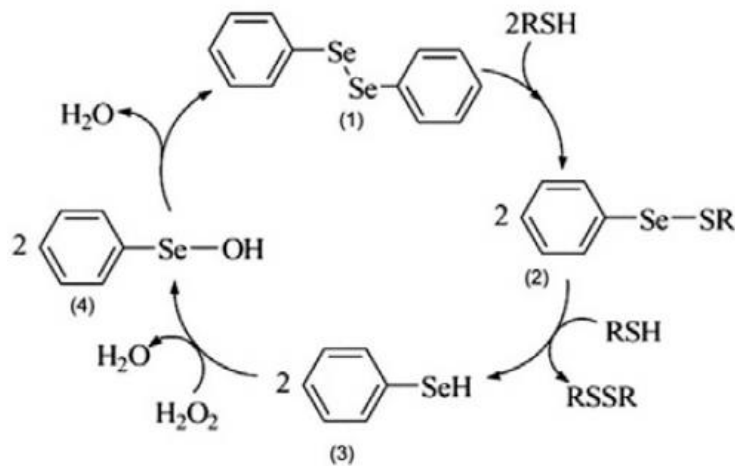


Figura 3: Mecanismo catalítico do DD para a detoxificação de peróxidos. O DD reage com um grupamento tiol (ex. GSH) originando um selenopersulfato, o qual reage com um segundo equivalente de GSH formando um selenol (Se-H). Este selenol por sua vez reduz o peróxido de hidrogênio ou então peróxidos lipídicos, liberando uma molécula de água, dando origem a um ácido selenínico (Se-OH). O Se-OH então libera uma molécula de água, concluindo dessa forma o ciclo catalítico (Adaptado de Nogueira et al., 2004).

Além das inúmeras atividades farmacológicas, alguns efeitos tóxicos também são atribuídos ao DD. Estudos demonstraram que o DD pode causar efeitos nocivos para proteínas ou enzimas em diferentes tecidos de mamíferos, tais como a enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (BARBOSA et al., 1998; FARINA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2003b), Na^+ , K^+ -ATPase (BORGES et al., 2005), bem como a lactato desidrogenase (KADE et al., 2009). Além disso, o composto causou toxicidade renal (MEOTTI et al., 2003) em roedores adultos. A exposição prolongada a doses altas do DD também foi capaz de induzir neurotoxicidade em roedores (NOGUEIRA et al., 2003). Estudos em camundongos demonstraram que, devido a sua lipofilicidade, o DD atravessa facilmente a barreira hematoencefálica após tratamento agudo ou prolongado, aumentando os níveis de selênio no cérebro dos animais (JACQUES SILVA et al., 2001; MACIEL et al., 2003). Dessa forma, esses estudos dão suporte à hipótese que o cérebro é um alvo potencial para as ações farmacológicas bem como também tóxicas do atribuídas ao composto DD.

Com relação à suplementação com o composto DD, ainda há poucos estudos a cerca das atividades farmacológicas do composto nessa via de administração. Em ratos, a ingestão prolongada de uma dieta contendo DD foi capaz de reduzir alteração bioquímicas bem como danos oxidativos provocados pela exposição ao agente carcinogênico N-nitroso-metil-uréia e

ao agente diabetogênico estroptozotocina, sem causar nenhum sinal de toxicidade. Além disso, a suplementação reduziu temporariamente a hiperglicemia provocada pela exposição à estreptozotocina. Todos esses efeitos foram observados sem que o composto apresentasse nenhum sinal de toxicidade (BARBOSA et al., 2006; 2008). Em ratas expostas a um modelo de hipotireoidismo, Dias et al. (2014) demonstraram que a suplementação com DD foi capaz de reduzir o comportamento tipo depressivo apresentado pelos animais. Em peixes das espécies *Rhamdia quelen* e *Cyprinus carpio*, a dieta contendo DD foi capaz de prevenir danos oxidativos induzidos por diferentes agentes tóxicos (MENEZES et. al., 2014a,b; 2016).

2.7 Peixe-zebra

O peixe-zebra, (*Danio rerio*), também conhecido como “paulistinha”, é um pequeno teleosteo de 3-4 cm de comprimento, de água doce pertencente à família Cyprinidae. O gênero *Danio* possui 44 espécies descritas, as quais fazem parte da subfamília Raborinae e apresentam um padrão de coloração com listras horizontais claras e escuras alternadas (SPENCE et al., 2008). Na natureza, o peixe-zebra é encontrado no sul e sudeste da Ásia, principalmente na Índia, Bangladesh e Nepal.

Diversas características favoráveis contribuem para que o peixe-zebra venha se consolidando como um modelo experimental amplamente utilizado em pesquisas nas mais diversas áreas. Algumas dessas características são: fácil manipulação, baixo custo, pouco espaço para manutenção, comportamento facilmente observado em um ambiente controlado e rápido desenvolvimento e ciclo biológico, e (SHIN e FISHMAN, 2002; LIESCHKE e CURRIE, 2007).

O peixe-zebra apresenta grande sensibilidade a fármacos, além de um rápido metabolismo, bem como genes evolutivamente conservados que apresentam um alto grau de similaridade com os genes humanos e de camundongos (BARBAZUK et al., 2000; GOLDSMITH, 2004). O sequenciamento completo dos genes do peixe-zebra revelou que 70% dos genes deste teleosteo têm um ortólogo humano, o que contribui ainda mais pra utilização dessa espécie em estudos nas mais diversas áreas (HOWE et al., 2013).

Dentre os mais diversos campos de pesquisa, o peixe-zebra vem se destacando como um importante modelo para estudos neurológicos e comportamentais (EGAN et al., 2009; PIATO et al., 2011; JONES e NORTON, 2014; STEWART et al., 2014). O SNC do peixe-zebra apresenta bastante semelhanças com o de mamíferos, contendo: organização geral, células neuronais especializadas, células gliais, mielina e circuitos neuronais (BANDMANN e

BURTON, 2010; STEWART et al., 2014). Além disso, já foi identificada a presença e os mecanismos dos principais neurotransmissores encontrados em mamíferos, incluindo aminoácidos (GABA, glutamato e glicina), monoaminas (dopamina, histamina, epinefrina, norepinefrina, melatonina e serotonina) bem como acetilcolina, entre outros. (RINKWITZ et al., 2011). Estudos relacionado a diversas doenças humanas também vêm sendo executados utilizando o peixe-zebra, como por exemplo, obesidade, DM e neuropatias (BEST e ALDERTON, 2008; CRAIG e MOON, 2011). Além disso, o peixe-zebra também vem se mostrando como uma ferramenta muito útil para a triagem e descoberta de novos fármacos (CHAKRABARTI e FREEDMAN, 2008).

Muitos estudos vem sendo realizados utilizando o peixe-zebra com o intuito de compreender as bases moleculares da neurobiologia, identificando genes envolvidos na formação de circuitos neuronais, no comportamento, bem como nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese (GUO, 2004). Modelos *knockout* que reproduzem patologias humanas, bem como técnicas para controle da expressão gênica (BANDMANN e BURTON, 2010) e indução de sintomas característicos de doenças metabólicas vem sendo realizados com a utilização do peixe-zebra. Tais estudos vêm demonstrando que o peixe-zebra é um bom modelo para entender mecanismos relacionados a algumas doenças humanas, entre elas: estresse (SIEBEL et al., 2010) hiperargininemia (CAPIOTTI et al., 2013), obesidade (OKA et al., 2010; CRAIG e MOON, 2011) e DM (GLEESON et al., 2007; JORGENS et al., 2012).

No ponto de vista comportamental, o peixe-zebra vem se mostrando como uma ferramenta bastante útil para o estudo de desordens neuropsiquiátricas, tais como a ansiedade (STEWART et al., 2012). Nesses estudos, diferentes protocolos experimentais são utilizados, sendo muitos deles, adaptações de testes já utilizados há muitos anos com roedores, mostrando resultados bastante semelhantes para o peixe-zebra (MAXIMINO et al., 2012). O teste do “tanque-novo” é um dos testes mais utilizados para se avaliar o comportamento tipo ansiedade em peixe-zebra e que também permite avaliar a atividade locomotora, sendo ele considerado como uma adaptação do teste do “campo aberto” utilizado com roedores. No teste do “tanque-novo”, o animal é colocado em um ambiente no qual não está habituado e então seu comportamento é avaliado. Um dos parâmetros avaliados é o deslocamento vertical do animal, uma vez que sob condição de estresse, a tendência é de que o animal tente se proteger buscando ficar na parte de baixo do aparato. A medida que percebe que não há riscos, o animal passa então a explorar também a parte superior do aparato. Substâncias ansiolíticas como a nicotina, fazem com que haja uma diminuição da preferência pela parte inferior do aparato (LEVIN et al., 2007). Outro teste bastante utilizado é o “claro-escuro”, também sendo uma adaptação do

teste já utilizado em roedores. O teste “claro-escuro” baseia-se em um instinto de camuflagem, no qual o peixe-zebra por ter uma coloração mais escura, busca a parte também escura do aparato para tentar se proteger. Quanto menor o comportamento tipo-ansiedade do animal, maior será a exploração da parte clara do aparato (MAXIMINO et al., 2010).

Nos últimos anos, o peixe-zebra também vem se consolidando como um bom modelo experimental para o estudo dos mecanismos envolvidos no DM e suas complicações. Por absorverem facilmente moléculas da água, a imersão em uma solução de glicose vem sendo utilizada como um método eficaz para a indução de uma condição hiperglicêmica em peixe-zebra. Utilizando esse modelo, GLESSON et al. (2007) assim como ALVARES et al. (2010) demonstraram que a imersão em solução de glicose foi capaz de gerar sintomas de retinopatia nos animais, assim como ocorre nas fases iniciais da doença em humanos. Também utilizando esse modelo, CAPIOTTI et al. (2014) demonstrou que a hiperglicemia causou déficits de memória nos animais. Observação que vai de acordo com outros estudos que já mostraram com roedores essa relação entre prejuízos na memória e a hiperglicemia (GOMAR et al., 2014; HASANEIN et al., 2016; MINAZ et al., 2018).

3 JUSTIFICATIVA

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2014 o número de indivíduos diabéticos no mundo era de 422 milhões. Além do número ser bastante elevado, outro fato que merece destaque é de que em 1980 eram 108 milhões de pessoas convivendo com o diabetes. Outro dado alarmante é que, segundo a OMS, em 2030 o diabetes deverá ser a sétima causa de óbitos no mundo. Diversas complicações secundárias são associadas ao diabetes. Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando uma maior propensão do desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos em pacientes diabéticos, principalmente ansiedade e depressão. Consequentemente, é crescente a busca por agentes que possam atuar como terapêuticos. Na maioria dos estudos experimentais, roedores são utilizados para modelar a doença. Neste cenário, o peixe-zebra vem ganhando destaque como organismo modelo para investigação de diversas condições metabólicas. No entanto, ainda são poucos os trabalhos utilizando esse organismo em estudos relacionados ao diabetes. Considerando as similaridades genéticas e homologia de genes com humanos, bem como a diversas vantagens do peixe-zebra em termos de manutenção, custo e reprodutibilidade, este trabalho foi delineado para usar este organismo para modelar diabetes e também para testar potenciais agentes terapêuticos. Aqui,

destacaremos o uso do composto orgânico de selênio (DD) devido às propriedades antioxidante e neuroprotetora já descritas em diversos modelos experimentais de patologias humanas, porém não totalmente conhecidas em termos de mecanismos celulares/moleculares. Assim, o presente trabalho foi delineado para consolidar o peixe-zebra para modelar diabetes e suas complicações; testar a potencialidade do DD como hipoglicemiante e neuroprotetor e ainda investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos encontrados. Com os resultados desse estudo pretendemos fornecer novos subsídios para a compreensão dos efeitos farmacológicos de organocalcogênios e ampliar os conhecimentos na pesquisa voltada para a patogênese do diabetes e suas complicações.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com DD sobre alterações comportamentais, bioquímicas e moleculares induzidas pela hiperglicemia em peixe-zebra, bem como investigar em termos de mecanismos se o possível efeito protetor do composto envolve alvos moleculares de vias de sinalização redox e da insulina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Através de análises bioquímicas e comportamentais, avaliar o efeito de dietas contendo diferentes concentrações de DD
2. Quantificar Se no cérebro dos animais que receberam a suplementação com DD, bem como nos tratados com as rações controle e comercial.
3. Verificar se o modelo de hiperglicemia causa alterações no comportamento tipo ansiedade e quais os efeitos da suplementação com DD sobre essas possíveis alterações.
4. Avaliar os efeitos da suplementação com DD sobre os níveis glicêmicos dos animais expostos ao protocolo de hiperglicemia.
5. Verificar os efeitos da hiperglicemia bem como da suplementação com DD sobre parâmetros de estresse oxidativo no cérebro dos animais.

6. Analisar possíveis alterações na atividade e expressão gênica de enzimas antioxidantes e fatores de transcrição associados ao equilíbrio redox no tecido cerebral dos animais expostos à glicose e suplementados com DD .
7. Investigar se a exposição à glicose e a suplementação com DD afetam a via de sinalização da insulina no cérebro dos animais, especificamente os níveis de expressão gênica de receptores e transportadores de glicose.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados desta tese estão dispostos na forma de um artigo científico publicado na revista “*Progress in Neuro-Psicopharmacology and Biological Psychiatry*” e um manuscrito submetido para publicação na “*Molecular Neurobiology*”. Os itens referentes a materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se nos próprios artigo e manuscrito. O **artigo** está disposto na forma como foi publicado. O **manuscrito** está na forma como foi submetido.

5.1 ARTIGO

HYPERGLYCEMIA ELICITS ANXIETY-LIKE BEHAVIORS IN ZEBRAFISH: PROTECTIVE ROLE OF DIETARY DIPHENYL DISELENIDE

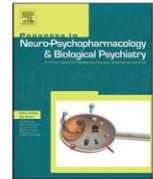
MATHEUS M. DOS SANTOS, GABRIEL T. DE MACEDO, ALESSANDRO S. PRESTES,
VÂNIA L. LORO, GRACIELA M. HEIDRICH, ROCHELE S. PICOLOTO, DENIS B.
ROSEMBERG, NILDA V. BARBOSA

(Artigo publicado na revista “*Progress in Neuro-Psicopharmacology and Biological Psychiatry*”)



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Hyperglycemia elicits anxiety-like behaviors in zebrafish: Protective role of dietary diphenyl diselenide



Matheus M. dos Santos^a, Gabriel T. de Macedo^a, Alessandro S. Prestes^a, Vânia L. Loro^a,
Graciela M. Heidrich^b, Rochele S. Picoloto^b, Denis B. Rosemberg^{a,c,d}, Nilda V. Barbosa^{a,*}

^a Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105–900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105–900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Laboratório de Neuropsicobiologia Experimental, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105–900 Santa Maria, RS, Brazil

^d Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC), 309 Palmer Court, Slidell, LA 70458, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Diabetes mellitus
Zebrafish
Hyperglycemia
Anxiety
Selenium
Diphenyl diselenide

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease that may comorbid with various psychiatric disorders, such as anxiety and depression. The search for effective therapeutics to alleviate hyperglycemia and complications resulting from DM is continuous. Here we investigate the effects of diphenyl diselenide (DD), an organoselenium compound with several pharmacological properties, in a zebrafish model of hyperglycemia. Fish were fed for 74 days with a diet containing 3 mg/Kg DD, a concentration chosen after experiments based in a dose-response curve (DD 1, 2 and 3 mg/Kg) that did not cause overt toxicity (mortality, weight loss and neurobehavioral deficits). In the last 14 days of the experimental period, fish were concomitantly exposed to a glucose solution (111 mM). Afterwards, blood glucose levels, brain selenium (Se) content, and behavioral analysis aiming to assess anxiety-like behaviors and locomotor/exploratory activities were performed. In the novel tank diving test, glucose decreased vertical exploration and fish spent less time in the lit area when tested in the light-dark test, suggesting increased anxiety-like behavior. Moreover, DD decreased blood glucose levels in hyperglycemic fish as well as prevented the development of anxiety-related symptoms. DD diet alone did not change glycemia and behavioral parameters, but increased Se levels in the brain without affecting the cellular viability. Collectively, our findings highlight the growing utility of this zebrafish hyperglycemia model as a valuable strategy for further research in DM field and neuroprotective approaches.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by a chronic hyperglycemic state, which occurs through insulin deficiency or insulin resistance (Öztürk et al., 2017; Sharma et al., 2014). There are approximately 415 million diabetic adults worldwide and this number is projected to increase to 642 million until 2040 (IDF, 2015). Type 2 diabetes (T2D) is the most prevalent form and the number of cases has increased along with people's lifestyle changes (IDF, 2015).

A close association between hyperglycemia and the development of DM chronic complications, such as nephropathy, neuropathy, retinopathy, cardiovascular and cerebrovascular dysfunctions has been postulated (Bannier et al., 2015; Huang et al., 2017). In the brain, chronic hyperglycemia impairs cognition, synaptic transmission, and neural plasticity (Kodl and Seaquist, 2008; Malone, 2016). Moreover, some psychiatric conditions (e.g., depression and anxiety) are highly

prevalent in diabetics (Moulton et al., 2015; Purewal and Fisher, 2018). This association is bidirectional, where diabetic complications may elicit anxiety/depression symptoms as well as these neuropsychiatric disorders may increase the risk of DM onset (Gambeta et al., 2016; Vancampfort et al., 2015). However, the underlying mechanisms involved in the relationship between DM and psychiatric diseases are still poorly understood.

Despite rodent models have been used to assess anxiogenic- and anxiolytic-like behaviors under different experimental conditions (Faturi et al., 2010; Hilber and Chapillon, 2005; Tyree et al., 2016), the zebrafish (*Danio rerio*) emerges as a novel and useful alternative model to evaluate anxiety-like behaviors (Rosemberg et al., 2011; Stewart et al., 2012). Different behavioral paradigms used in rodent models of anxiety have been adapted for zebrafish eliciting similar responses (Maximino et al., 2010; Stewart et al., 2012). Importantly, zebrafish have also been used as a promising organism to study hyperglycemia

* Corresponding author at: Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail address: nvbarbosa@yahoo.com.br (N.V. Barbosa).

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.04.017>

Received 17 January 2018; Received in revised form 27 April 2018; Accepted 29 April 2018

Available online 30 April 2018

0278-5846/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

and its complications (Capiotti et al., 2014a, 2014b; Dorsemans et al., 2017; Gleeson et al., 2007). As occur in rodents, a hyperglycemic state in zebrafish may be induced via destruction of pancreatic beta cells (Moss et al., 2009; Shin et al., 2012). Another protocol involves immersing zebrafish in a glucose solution, based in the conception that fish can easily absorb molecules from the water and regulate their internal water and total solute concentrations (Capiotti et al., 2014a; Gleeson et al., 2007).

Due to the large number of people with DM worldwide and considering the severity of its chronic complications, the search for therapeutic agents to prevent and/or treat this metabolic disorder is necessary. Here, we targeted the organic selenium compound diphenyl diselenide (DD), which chronically diminished the levels of glucose and improved the antioxidant status of diabetic rats (Barbosa et al., 2006). Although the anti-diabetogenic and anxiolytic effects of DD have already been reported in rodents, little is known about the molecular/cellular mechanisms underlying their actions in the central nervous system. Thus, considering the growing utility of zebrafish to investigate the neural basis involved in various metabolic diseases, the neurobehavioral characterization of novel DM/hyperglycemia models will help elucidate how organochalcogens modulate brain functions, thereby fostering future discovery of potential therapeutic agents in translational research. In this report, we aimed to ascertain the relationship between hyperglycemia and anxiety onset, and whether dietary DD could be helpful under these conditions using an alternative hyperglycemia model in zebrafish.

2. Materials and methods

2.1. Animals and housing

Adult male and female (approximately 50:50 ratio) *short-fin* zebrafish (*Danio rerio*) were purchased from a local commercial supplier (Hobby Aquarios, RS, Brazil). Fish were maintained in 40 L aquariums (at a maximum density of 2 fish per liter) for at least 2 weeks before the experiments. Tanks were filled with non-chlorinated water (height: 25 cm) previously treated with AquaSafe™ (2 drops/L). Water was maintained at constant filtration and aeration at a target temperature of 26 ± 2 °C and pH adjusted to 7.0–8.0. Illumination was performed by a 14:10 light-dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 AM). Before the treatments, all animals were fed twice daily with commercially available fish flake food (Alcon Basic™, Alcon, Brasil). Animals were maintained following the recommendations of the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011). A total of 230 animals were used in the study and all experimental protocols were approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (process number: 2649140717/2017).

2.2. Diet preparation

Diet containing DD were made into pellets (5 mm of diameter) and kept at 4 °C until fed as described previously (Menezes et al., 2014). In order to establish a safe concentration of DD in the diet, we firstly tested a curve of dietary DD. Briefly, 70 fish were divided into 5 groups with 14 animals each. Experiments were performed in duplicate, with 7 animals allocated per 3-L aquarium. The aquariums were filled with non-chlorinated water at a height of 14 cm. Water and illumination conditions were similar to those of housing tanks (item 2.1). Group 1 received commercial food; group 2 an unsupplemented DD diet and groups 3 to 5 a diet supplemented with DD at concentrations of 1.0, 2.0 and 3.0 mg/Kg, respectively. Fish were fed twice daily, with the different diets (3% of body mass) for 74 days. Survival rate was measured by a daily count of the number of fish and the wet weight at 0, 15, 30, 45, 60 and 74 day. Afterwards, fish were submitted to the behavioral tests (novel tank diving and light-dark tests) in two consecutive days.

Then, animals were anesthetized with 0.25 g/L tricaine and euthanized by decapitation. Brains were quickly removed, transferred to microtubes and kept at -80 °C for biochemical analysis and Se determination.

2.3. Hyperglycemia induction and DD supplementation

Since dietary DD concentrations tested did not cause apparent signals of toxicity (weight loss, mortality and neurobehavioral deficits), we chose 3.0 mg/Kg DD to use in the hyperglycemia model. Hyperglycemia was induced by maintaining the fish in a glucose solution as previously described by Capiotti et al. (2014a, 2014b). Fish were divided into four groups of 20 animals each, as follows: Group 1 (Control: unsupplemented DD diet), Group 2 (DD 3.0 mg/Kg), Group 3 (Glucose + unsupplemented DD diet), and Group 4 (Glucose + DD 3.0 mg/Kg). Fish were maintained in 3 L aquariums (6–7 fish per aquarium) and fed twice a day for 74 days. Before glucose exposure, the aquarium water (height: 14 cm) was changed once a week. The conditions of water and illumination were maintained as cited in the item 2.1. In the last 14 days, a 111 mM glucose solution was added to the water of groups 3 and 4. Glucose solution was changed every day to avoid a possible contamination.

2.4. Measurement of blood glucose levels

Blood glucose levels were measured after a 12-h fasting period. Before measurement, animals were kept for 15 min in water without glucose to eliminate possible glucose remnants in the fish (Gleeson et al., 2007) and then anesthetized by hypothermia induction to reduce the variability of blood glucose. Afterwards, fish tail was cut and blood glucose measured by placing a glucometer (G-Tech Free 1) directly on the docked tail.

2.5. Brain Selenium quantification by inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS)

For Se quantification, 3 brains of each group were pooled ($n = 4$, total of 12 brains) and digested by microwave assisted acid digestion using a Multiwave 3000 microwave sample preparation system (Anton Paar, Graz, Austria) equipped with eight high-pressure quartz vessels (internal volume of 80 mL, maximum temperature and pressure of 280 °C and 80 bars, respectively). For this procedure, samples were weighted inside of the quartz vessels and 6 mL of 7 mol L^{-1} HNO_3 solution was added. The operational conditions and the heating program used were carried out according to recommendations of the manufacturer. After digestion of samples, selenium was determined by inductively coupled plasma mass spectrometer (PerkinElmer Sciex, Model ELAN DRC II, Thornhill, Canada), equipped with a concentric nebulizer (Meinhard Associates, Golden, USA), a cyclonic spray chamber (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Australia) and a quartz torch with a quartz injector tube (2 mm i.d.). Instrumental performance optimization, including nebulizer gas flow rate, ion lens voltage, and torch alignment, was carried out following the instructions of manufacturer (Perkin Elmer-SCIEX 2003).

2.6. Cell viability measurements

2.6.1. MTT assay

Brain cell viability was evaluated by MTT assay as previously reported (Zenki et al., 2014). The assay is based on the enzymatic reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) to formazan crystals by dehydrogenases from viable cells. Briefly, whole brain ($n = 7$ per group) was immersed in a 0.5 mg/mL MTT solution and placed in a water bath shaker for 20 min at 37 °C. Then, MTT solution was removed and 300 μL of DMSO was added in each sample that was maintained in the dark for 24 h for total

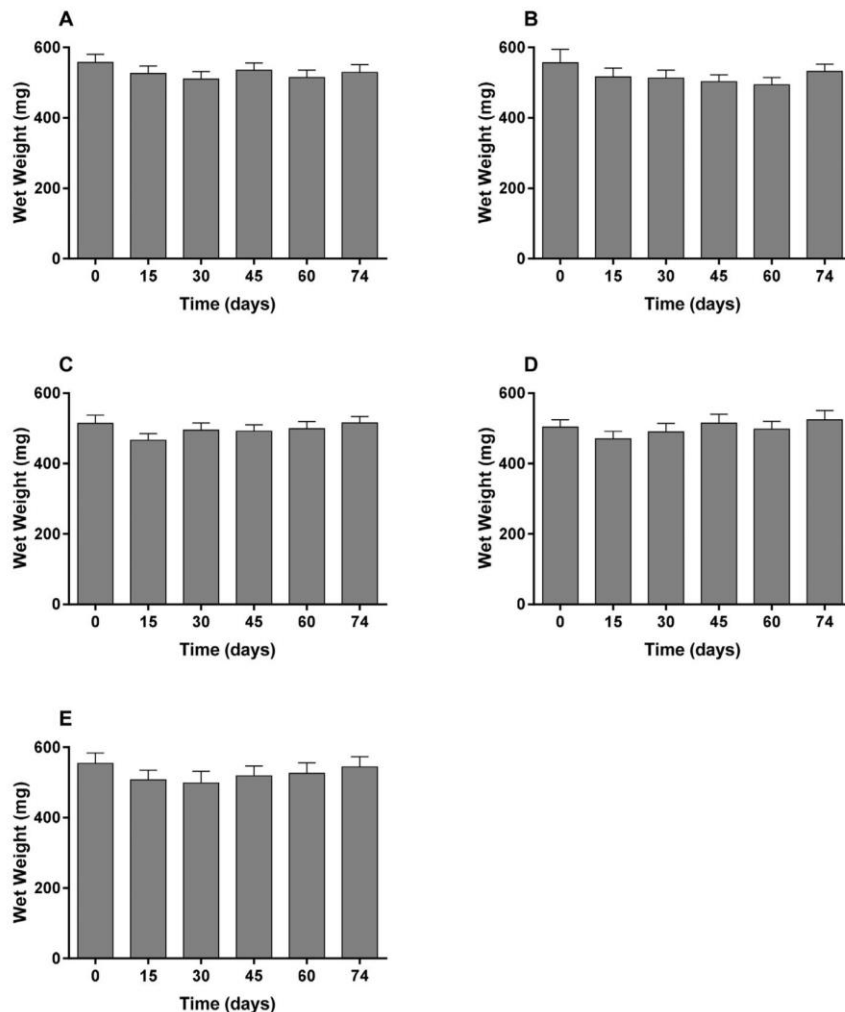


Fig. 1. Body wet weight of fish fed with DD and control diets. Fish were fed with commercial food (A), DD unsupplemented diet (B) and diets containing DD 1, 2 or 3 mg/Kg (C, D, and E, respectively) for 74 days. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM and ($p < .05$, $n = 14$ per group).

solubilization of formazan crystals. Afterwards, 200 μ L aliquots were placed in a 96-well plate and the absorbance was measured in a microplate reader at 560 and 650 nm. Results were expressed as percentage of control.

2.6.2. Lactate dehydrogenase (LDH) activity

LDH activity was performed as described elsewhere (Zenki et al., 2014). Briefly, each whole brain ($n = 7$ per group) was incubated for 10 min at 37 $^{\circ}$ C in a medium containing HBSS buffer (137 mM NaCl; 0.63 mM Na_2HPO_4 ; 3.0 mM NaHCO_3 ; 5.36 mM KCl; 0.44 mM KH_2PO_4 ; 1.26 mM CaCl_2 ; 0.90 mM MgSO_4 ; 5.55 mM glucose). Afterwards, the medium containing the released LDH was removed and 30 μ L was added in a reaction medium containing: 7.5 mM NAD^+ , 260 mM lactate, and 1.6 mM 1,10-phenantroline. The reaction of 1,10-phenantroline with NADH results in the formation of a colored complex with absorption at 490 nm. Independent and untreated brains (2 per group, in duplicate) were mechanically lysed to obtain the total LDH activity. Results were expressed as percentage of total LDH activity per sample.

2.7. Behavioral parameters

Behavioral tests were performed immediately after the treatments in

a same period of the day (11:00 AM to 4:00 PM). All tests were recorded using a webcam (Genius Eye 212 $^{\circ}$). Fish were gently placed in the apparatus using a dip net. Then, the swimming activities were recorded for 6 min as described elsewhere (Mezzomo et al., 2016; Nunes et al., 2016). All experimental sessions were analyzed using appropriate video-tracking software (ANY-maze $^{\circ}$, Stoelting CO., USA) at 30 frames/s. All apparatuses were filled with non-chlorinated water adjusted to the same home tank conditions. Water was substituted after each trial and the aquariums used to assess the different behavioral tasks were similar for all fish.

2.7.1. Novel tank diving test

After treatment, fish were placed in the novel tank diving apparatus that consist in a rectangular tank (25 cm length \times 15 cm height \times 6 cm width) filled with 1.5 L of water (12 cm height) in the same conditions of home tank water (Rosemberg et al., 2011). To analyze the swimming activity, the aquarium was virtually divided into three equal horizontal sections (bottom, middle, and top). Then, the following endpoints were evaluated: time spent in the top, transitions to the top area, total distance traveled and absolute turn angle. A total of 80 fish were used in the test ($n = 20$ per group).

2.7.2. Light-dark test

The light-dark test consisted in a rectangular aquarium (30 cm length × 15 cm height × 10 cm width) divided into two equal parts colored by black or white self-adhesive film. The apparatus was filled with 2.5 L of water (8 cm height) at the same conditions of home tank water. During the trial, fluorescent lamps were used for illumination (approximately 250 lx above the tank). All procedures were performed based in a protocol previously described (Maximino et al., 2010). After treatments, fish were removed from the home tank and gently placed in the white side of the apparatus. Then, during a session of 6 min, the following endpoints were determined: latency to enter in the dark area, time spent in lit area, shuttling, and number of risk assessment episodes. Risk assessment was counted when the fish enter in the white side and immediately (< 1 s) return to the dark compartment, or just partially enter in the lit area (Maximino et al., 2011). Here, the number of risk assessment episodes was measured manually by three trained researchers (inter-rater reliability > 0.85). A total of 80 animals were used in the test ($n = 20$ per group).

2.8. Statistical analysis

Data of latency to enter in the dark side were expressed as median ± interquartile range and the statistical analysis was carried out using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post hoc test. All other results were expressed as means ± standard error of mean (S.E.M) and analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Results were analyzed using the Graphpad Prism software (version 7.0) and the significance level was set at $p \leq .05$.

3. Results

3.1. Curve of dietary DD and brain Se quantification

Based on the assessment of some toxicological and behavioral parameters, the first set of experiments was performed to choose an appropriate dietary DD concentration for subsequent tests with hyperglycemic fish. Fish were fed with control diets (commercial food and unsupplemented DD diet) or diets containing DD (1.0, 2.0, and 3.0 mg/Kg) for 74 days. Fig. 1 shows that chronic DD intake did not change the body weight of fish when compared to the groups fed with commercial food and/or unsupplemented DD diet. Diets did not affect the survival rate of fish (data not shown). Moreover, DD did not modify the brain cellular viability analyzed by MTT assay and LDH activity (Fig. 2). Dietary DD did not change the behavior of fish in the novel tank diving (Fig. 3) and in the light-dark (Fig. 4) tasks when compared to control.

Based on these results, we chose the diet containing DD 3 mg/Kg to feed fish in the hyperglycemia protocol. We also quantified Se in brain of fish fed with commercial food, unsupplemented DD and DD 3 mg/Kg diets for 74 days. Fig. 5 shows that the amount of Se found in brain of fish fed with DD 3.0 mg/Kg was approximately 2.5-fold higher than the

content found in fish fed with unsupplemented DD diet and/or commercial food.

3.2. Hyperglycemia protocol

3.2.1. Fasting blood glucose

Continuous exposure to glucose caused a 3.5-fold increase in blood glucose levels of fish when compared to the control. Fish exposed to glucose and fed with DD diet had levels of blood glucose lower than hyperglycemic fish fed with unsupplemented DD diet (± 2.5 -fold). DD diet alone did not affect the glycemia. Statistical analysis also revealed a significant DD × glucose interaction ($F_{1,76} = 16.21, p = .0001$) and a main effect of glucose ($F_{1,76} = 79.54, p < .0001$) and DD supplementation ($F_{1,76} = 9.324, p = .0031$) (Fig. 6).

3.3. Behavioral analysis in hyperglycemic fish

3.3.1. Novel tank diving test

Glucose and dietary DD did not affect the locomotor activity (distance traveled and turn angle) (Fig. 7A and B). Conversely, glucose decreased the time spent in the top, which was prevented by dietary DD. A significant DD × glucose interaction ($F_{1,76} = 5.433, p = 0.0224$) and a main effect of glucose ($F_{1,76} = 21.67, p < .0001$) and DD supplementation ($F_{1,76} = 5.177, p = .0257$) were observed (Fig. 7C). Similarly, the number of transitions to the top area was reduced in fish exposed to glucose. DD diet intake also counteracted this effect induced by hyperglycemia. Statistical analysis of transitions to the top area revealed a significant DD × glucose interaction ($F_{1,76} = 10.19, p = 0.0021$) and a main effect of glucose ($F_{1,76} = 21.11, p < .0001$) and DD supplementation ($F_{1,76} = 10.92, p = .0015$) (Fig. 7D).

3.3.2. Light-dark test

Except for latency to enter in the dark area (Fig. 8B), all other parameters evaluated in the light-dark test were significantly altered by glucose exposure. Fish exposed to glucose spent less time in the lit area. This effect induced by hyperglycemia was counteracted by DD diet intake. Statistical analysis also revealed a significant effect of glucose exposure ($F_{1,76} = 8.23, p = .0053$) and DD supplementation ($F_{1,76} = 5.821, p = .0182$). No significant glucose × DD interaction were observed ($F_{1,76} = 2.742, p = .1019$) (Fig. 8A). Moreover, the number of crossings decreased in fish exposed to glucose. Differently, hyperglycemic fish fed with DD diet did not exhibit changes in this behavior. Here, a significant DD × glucose interaction ($F_{1,76} = 11.75, p = .0010$) and a main effect of DD supplementation ($F_{1,76} = 4.773, p = .0320$) were observed (Fig. 8C).

Glucose exposure caused a marked increase in the number of risk episodes, which was not observed in hyperglycemic fish fed with DD diet. Statistical analysis also revealed a significant DD × glucose interaction ($F_{1,76} = 4.311, p = .0413$) and a main effect of glucose exposure ($F_{1,76} = 4.584, p = .0355$) (Fig. 8D).

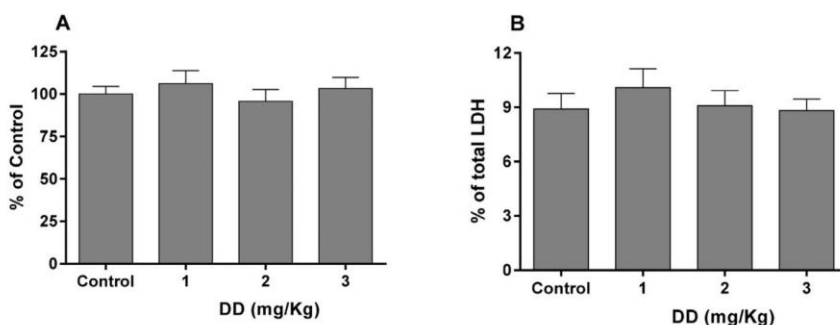


Fig. 2. Effect of dietary DD on brain cellular viability. MTT assay (A) and LDH leakage (B) of brain from fish fed with DD unsupplemented diet or diets containing DD 1, 2 or 3 mg/Kg for 74 days. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean ± SEM and ($p < .05, n = 14$ per group).

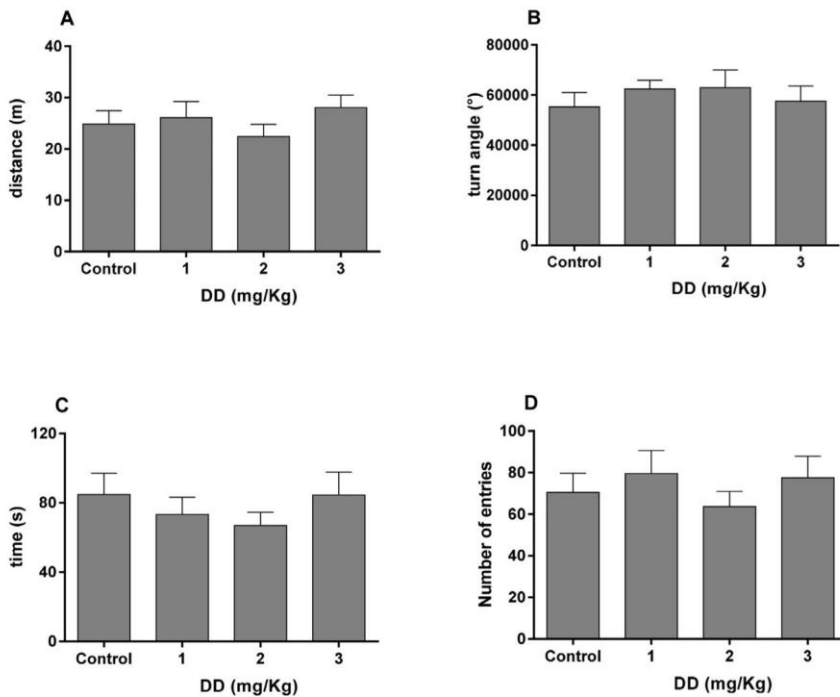


Fig. 3. Effects of dietary DD on locomotor and exploratory parameters in the novel tank diving test. Parameters of distance traveled (A), absolute turn angle (B), time spent in top (C), and transitions to top area (D) from fish groups fed with DD unsupplemented diet or diets containing DD 1, 2 or 3 mg/Kg for 74 days were quantified. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM and ($p < .05$, $n = 14$ per group).

4. Discussion

Various protocols that induce a hyperglycemic state in animal models are considered suitable to assess DM complications and putative therapeutic approaches (Ecker et al., 2017; Ou et al., 2016; Tzschentke et al., 2015). In this scenario, some zebrafish features make it a promising model organism for translational studies in DM field. Zebrafish present endocrine islet tissue, which contains hormone-producing β cells; and the teleost insulin is homologous to human insulin (Gleeson

et al., 2007; Moon, 2001). Zebrafish also has glucose transporters homologous to the human GLUTs and expresses other important proteins involved in insulin-mediated signaling (Jensen et al., 2006; Maures et al., 2002; Pozios et al., 2001).

The relationship between DM and neuropsychiatric conditions, such as depression and anxiety, has been increasingly studied in recent years (Alba-Delgado et al., 2016; Mast et al., 2017; Roy and Lloyd, 2012). There are different anxiety models, mainly with rodents (Almeida-Souza et al., 2015; Hughes and Otto, 2013; Kangussu et al., 2017;

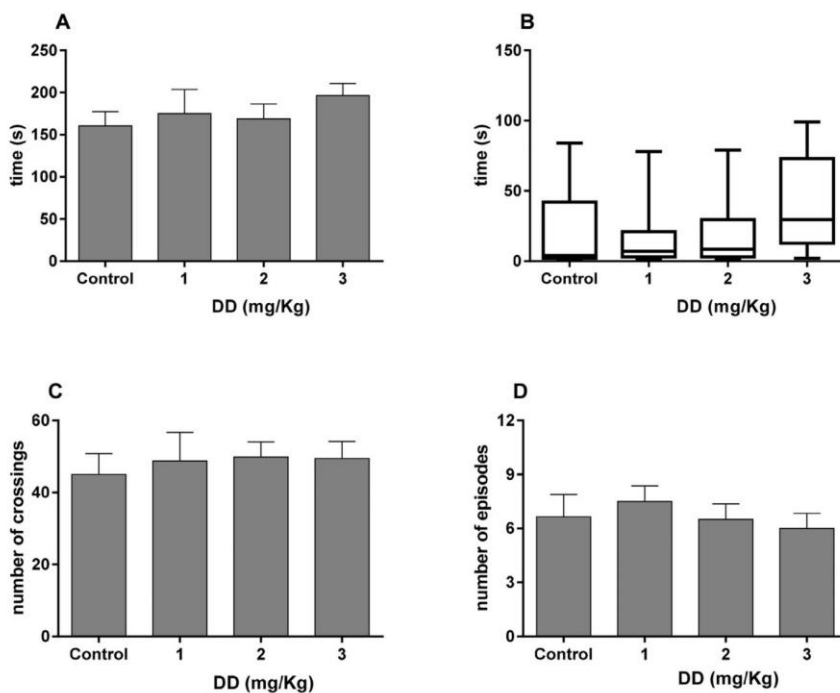


Fig. 4. Effects of dietary DD on anxiety-like behavior in the light-dark test. Parameters of time spent in lit area (A), latency to enter the dark area (B), shuttling (C), and risk assessment (D) from fish groups fed with DD unsupplemented diet or diets containing DD 1, 2 or 3 mg/Kg for 74 days were measured. Latency to enter in dark area was analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post hoc test and expressed as median \pm interquartile range. The other parameters were analyzed by one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM and ($p < .05$, $n = 14$ per group).

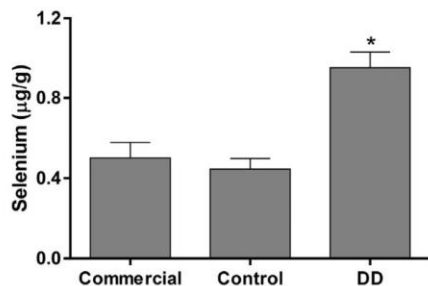


Fig. 5. Brain Se content. Se levels were determined in brain of fish fed with commercial diet, DD unsupplemented diet or DD 3mg/Kg for 74 days. The quantification was performed by ICP-MS. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM. The asterisk indicates statistical differences as compared to the other groups ($p < .05$, $n = 4$ per group).

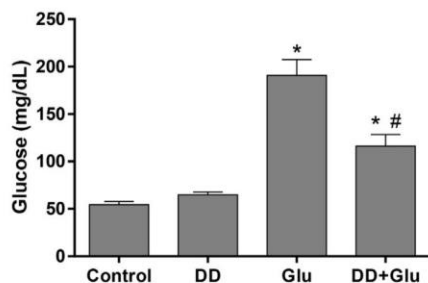


Fig. 6. Effects of glucose exposure and DD diet intake on fasting blood glucose levels. Control (unsupplemented DD diet); DD (DD 3.0 mg/Kg); Glu (glucose) and DD + Glu (DD 3.0 mg/Kg plus glucose). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM. The asterisk indicates statistical differences as compared to the control. The hash indicates statistical differences as compared to glucose group ($p < .05$, $n = 20$ per group).

Oliveira et al., 2014). In zebrafish, the novel tank diving test and light-dark test are two behavioral paradigms to measure anxiety-like

behaviors (Cachat et al., 2010; Egan et al., 2009; Stewart et al., 2012). The novel tank diving test evaluates the exploratory profile of zebrafish, which have a natural tendency to spend more time on the bottom and gradually enter in the top area of the tank when introduced into a novel environment. Moreover, changes in some behavioral endpoints (e.g. time spent in top and number of entries in the upper area) may reflect a reduced anxiety state. The light-dark test assesses the natural preference of zebrafish for dark environments, which is called scototaxis. Fish with increased anxiety-like behavior usually spend more time in the dark compartment (Stewart et al., 2012). Here, the immersion of zebrafish in a glucose solution did not alter locomotion. However, hyperglycemic fish spent less time in the top and showed reduced transitions to top. In the light-dark test, hyperglycemic fish decreased the number of crossings, spent less time in the lit area, and exhibited a higher number of risk assessment episodes. Together, these phenotypes reflect increased anxiety-like behaviors, showing a relationship between increased blood glucose levels and anxiety in a zebrafish hyperglycemia model. A similar protocol, evidenced that fish immersed in glucose solution had increased glycation of proteins from eyes, which could potentially interfere with the behavioral responses measured here (Capiotti et al., 2014a). However, although we did not examine parameters related with retina damage, the increased number of risk assessment episodes by hyperglycemic fish provides a strong indication of their preserved visual acuity and environment perception.

Among the various chemical elements with biological activity, Se exhibits a wide spectrum of physiological effects, fact that makes it target of many studies toward to human diseases (Álvarez-Pérez et al., 2018; Cardoso et al., 2015; Nogueira and Rocha, 2011). Although Se is essential for all vertebrates, there is a narrow window between its essentiality and toxicity (Nogueira and Rocha, 2011; Roman et al., 2014). Se is required for the synthesis of various selenoproteins including antioxidant enzymes, showing a key role in thyroid, brain, reproductive and immune system functions. However, high levels of Se can be toxic to organisms via thiols oxidation and free radicals generation (Barbosa et al., 2017; Cardoso et al., 2015). In this study, we targeted the diphenyl diselenide as therapeutic molecule toward hyperglycemia and related anxiety mainly due previous findings showing the beneficial effects of dietary DD in diabetic rats (Barbosa et al., 2006). In analogy, here the chronic consumption of diet containing DD reduced partially

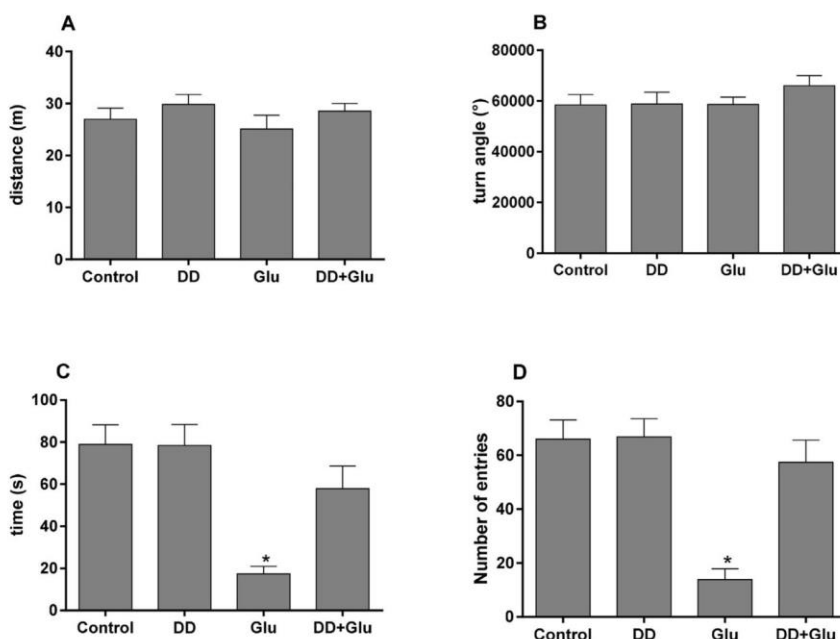


Fig. 7. Effects of glucose exposure and DD diet intake on locomotor and exploratory parameters of fish evaluated by novel tank diving test. Distance traveled (A), absolute turn angle (B), time spent in top (C), and transitions to top area (D). Control (unsupplemented DD diet); DD (DD 3.0 mg/Kg); Glu (glucose) and DD + Glu (DD 3.0 mg/Kg plus glucose). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM and. The asterisk indicates statistical differences as compared to the other groups ($p < .05$, $n = 20$ per group).

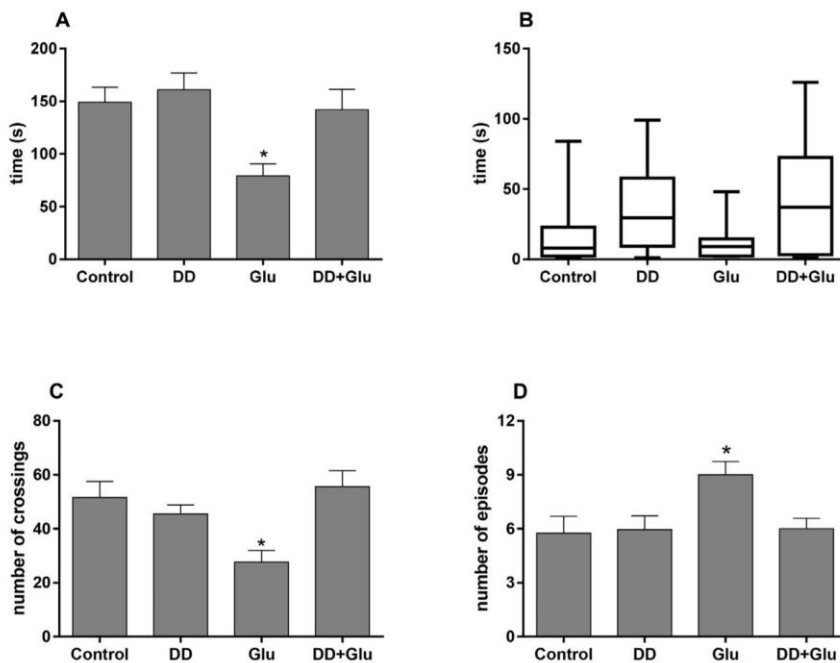


Fig. 8. Effects of glucose exposure and DD diet intake on anxiety-like behavior of fish evaluated by light-dark test. Time spent in lit area (A), latency to enter the dark area (B), shuttling (C), and risk assessment (D). Control (unsupplemented DD diet); DD (DD 3.0 mg/Kg); Glu (glucose) and DD + Glu (DD 3.0 mg/Kg plus glucose). Latency to enter the dark area was analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post hoc test and expressed as median \pm interquartile range. The other parameters were analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM and. The asterisk indicates statistical differences as compared to the other groups ($p < .05$, $n = 20$ per group).

the glycemic levels elevated by glucose exposure without causing toxicity in zebrafish. Although the mechanisms underlying the protective effects of Se have not been properly studied so far, some studies with rodent models have suggested that in addition their antioxidant action in pancreatic β -cells, selenium compounds could alleviate the hyperglycemia by mimicking insulin (Stapleton, 2000).

Mounting evidence has highlighted the importance of Se for normal brain functions, showing that Se deficiency is associated with several neurological disorders (Cardoso et al., 2015; Roman et al., 2014). As a corollary, organic and inorganic forms of Se have been extensively studied and expected as therapeutics (Álvarez-Pérez et al., 2018; Nogueira and Rocha, 2011; Roman et al., 2014; Zheng et al., 2017). In this scenario, diphenyl diselenide has been widely explored as an antioxidant and neuroprotective molecule (Dias et al., 2014; Nogueira and Rocha, 2011). Specifically with zebrafish, the anxiolytic role of DD has been demonstrated after exposing the fish to DD diluted in the aquarium water for a short time period (Ibrahim et al., 2014). Here, the chronic intake of dietary DD increased Se levels in brain and reduced the anxiety-like behavior associated to hyperglycemia, showing positive effects in the zebrafish model.

Se preferentially reaches the brain under conditions of dietary selenium deficiency (Cardoso et al., 2015; Roman et al., 2014). This high demand for Se is critical for synthesis of essential selenoproteins, which are highly expressed and distributed throughout the central nervous system (Roman et al., 2014; Steinbrenner and Sies, 2013; Wrobel et al., 2016). Therefore, we presume that DD diet had provided to zebrafish brain an optimal Se status, important to maintain neurological functions. As dietary DD also attenuated hyperglycemia, the neuroprotective effects of DD might involve both hypoglycemia and anxiolysis.

5. Conclusion

In summary, our results show the relationship of hyperglycemia with anxiety onset in zebrafish. In a pharmacological perspective, we also demonstrated that increased Se in the brain could contribute to the hypoglycemic and anxiolytic effects provided by DD supplementation. Although future studies are necessary to elucidate the molecular mechanisms underlying DD actions in the brain, these findings support the

relevance of zebrafish hyperglycemia model as a suitable strategy for further behavioral and pharmacological studies in DM field.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the financial support and fellowships from FAPERGS/CNPq/PRONEX n° 16/2551-0000 499-4, Pronem, CAPES and CNPq - Brazil. NVB, DBR and VLL are recipients of CNPq fellowships.

References

- Alba-Delgado, C., Cebada-Aleu, A., Mico, J.A., Berrocoso, E., 2016. Comorbid anxiety-like behavior and locus coeruleus impairment in diabetic peripheral neuropathy: a comparative study with the chronic constriction injury model. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 71, 45–56.
- Almeida-Souza, T.H., Goes, T.C., Teixeira-Silva, F., 2015. Pharmacological validation of the free-exploratory paradigm in male Wistar rats: a proposed test of trait anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 135, 114–120.
- Álvarez-Pérez, M., Ali, W., Marć, M.A., Handzlik, J., Domínguez-Álvarez, E., 2018. Selenides and Diselenides: a review of their anticancer and chemopreventive activity. *Molecules* 23, E628.
- Bannier, K., Lichtenauer, M., Franz, M., Fritzenwanger, M., Kabisch, B., Figulla, H.R., et al., 2015. Impact of diabetes mellitus and its complications: survival and quality-of-life in critically ill patients. *J. Diabetes Complicat.* 29, 1130–1135.
- Barbosa, N.B., Rocha, J.B., Wondracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2006. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* 163, 230–238.
- Barbosa, N.V., Nogueira, C.W., Nogara, P.A., De Bem, A.F., Aschner, M., Rocha, J.B.T., 2017. Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents. *Metallomics* 9, 1703–1734.
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K.M., et al., 2010. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat. Protoc.* 5, 1786–1799.
- Capiotti, K.M., Antonioli Jr., R., Kist, L.W., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Da Silva, R.S., 2014a. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 171, 58–65.
- Capiotti, K.M., De Moraes, D.A., Menezes, F.P., Kist, L.W., Bogo, M.R., et al., 2014b. Hyperglycemia induces memory impairment linked to increased acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 274, 319–325.
- Cardoso, B.R., Roberts, B.R., Bush, A.I., Hare, D.J., 2015. Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases. *Metallomics* 7, 1213–1228.
- Dias, G.R., De Almeida, T.M., Sudati, J.H., Dobrachinski, F., Pavin, S., Soares, F.A., et al.,

2014. Diphenyl diselenide supplemented diet reduces depressive-like behavior in hypothyroid female rats. *Physiol. Behav.* 124, 116–122.
- Dorsemans, A.C., Soulé, S., Weger, M., Bourdon, E., Lefebvre d'Hellencourt, C., Meilhac, O., et al., 2017. Impaired constitutive and regenerative neurogenesis in adult hyperglycemic zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 525, 442–458.
- Ecker, A., Gonzaga, T.K., Seeger, R.L., Santos, M.M., Loreto, J.S., Boligon, A.A., et al., 2017. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. *Biomed. Pharmacother.* 89, 605–616.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44.
- Faturi, C.B., Leite, J.R., Alves, P.B., Canton, A.C., Teixeira-Silva, F., 2010. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 605–609.
- Gambeta, E., Souza, C.P., Morais, H., Zanolini, J.M., 2016. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. *Metab. Brain Dis.* 31, 563–571.
- Gleeson, M., Connaughton, V., Arneson, L.S., 2007. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetol.* 44, 157–163.
- Hilber, P., Chapillon, P., 2005. Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. *Physiol. Behav.* 86, 164–167.
- Huang, D., Refaat, M., Mohammedi, K., Jayyousi, A., Al Suwaidi, J., Abi Khalil, C., 2017. Macrovascular complications in patients with diabetes and prediabetes. *Biomed. Res. Int.* 2017, 7839101.
- Hughes, R.N., Otto, M.T., 2013. Anxiolytic effects of environmental enrichment attenuate sex-related anxiogenic effects of scopolamine in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 40, 252–259.
- Ibrahim, M., Mussulini, B.H., Moro, L., De Assis, A.M., Rosemberg, D.B., De Oliveira, D.L., et al., 2014. Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 54, 187–194.
- IDF, 2015. International Diabetes Federation.** <http://www.idf.org/>
- Jensen, P.J., Gitlin, J.D., Carayannopoulos, M.O., 2006. GLUT1 deficiency links nutrient availability and apoptosis during embryonic development. *J. Biol. Chem.* 281, 13382–13387.
- Kangussu, L.M., Almeida-Santos, A.F., Moreira, F.A., Fontes, M.A.P., Santos, R.A.S., Aguiar, D.C., et al., 2017. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1-7): role of the Mas receptor. *Behav. Brain Res.* 331, 193–198.
- Kodl, C.T., Seaquist, E.R., 2008. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr. Rev.* 29, 494–511.
- Malone, J.I., 2016. Diabetic central neuropathy: CNS damage related to hyperglycemia. *Diabetes* 65, 355–357.
- Mast, R., Rauh, S.P., Groeneveld, L., Koopman, A.D., Beulens, J.W., Jansen, A.P., et al., 2017. The use of antidepressants, anxiolytics, and hypnotics in people with type 2 diabetes and patterns associated with use: the hoorn diabetes care system cohort. *Biomed. Res. Int.* 2017, 5134602.
- Maures, T., Chan, S.J., Xu, B., Sun, H., Ding, J., Duan, C., 2002. Structural, biochemical, and expression analysis of two distinct insulin-like growth factor I receptors and their ligands in zebrafish. *Endocrinology* 143, 1858–1871.
- Maximino, C., De Brito, T.M., Da Silva Batista, A.W., Herculano, A.M., Morato, S., Gouveia Jr., A., 2010. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav. Brain Res.* 214, 157–171.
- Maximino, C., Araujo, J., Leão, L.K., Grisolia, A.B., Oliveira, K.R., Lima, M.G., et al., 2011. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 727–734.
- Menezes, C., Leitemperger, J., Santi, A., Dias, G., Pedron, F.A., Neto, J.R., Salman, S.M., Barbosa, N.V., Loro, V.L., 2014. Evaluation of the effects induced by dietary diphenyl diselenide on common carp *Cyprinus carpio*. *Fish Physiol. Biochem.* 40, 141–149.
- Mezzomo, N.J., Silveira, A., Giuliani, G.S., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B., 2016. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: a comparative study using the novel tank and the light/dark tasks. *Neurosci. Lett.* 613, 19–24.
- Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 243–249.
- Moss, J.B., Koustubhan, P., Greenman, M., Parsons, M.J., Walter, I., Moss, L.G., 2009. Regeneration of the pancreas in adult zebrafish. *Diabetes* 58, 1844–1851.
- Moulton, C.D., Pickup, J.C., Ismail, K., 2015. The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 3, 461–471.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th edition. National Academies Press (US, Washington (DC).
- Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85, 1313–1359.
- Nunes, M.E., Müller, T.E., Braga, M.M., Fontana, B.D., Quadros, V.A., Marins, A., Rodrigues, C., Menezes, C., et al., 2016. Chronic treatment with paraquat induces brain injury, changes in antioxidant defenses system, and modulates behavioral functions in zebrafish. *Mol. Neurobiol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9919-x>.
- Oliveira, D.R., Goes, T.C., Teixeira-Silva, F., 2014. The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in female rats: test-retest reliability. *Neurosci. Lett.* 580, 137–141.
- Ou, Y., Ren, Z., Wang, J., Yang, X., 2016. Phycocyanin ameliorates alloxan-induced diabetes mellitus in mice: involved in insulin signaling pathway and GK expression. *Chem. Biol. Interact.* 247, 49–54.
- Öztürk, E., Arslan, A.K.K., Yerer, M.B., Bishayee, A., 2017. Resveratrol and diabetes: a critical review of clinical studies. *Biomed. Pharmacother.* 95, 230–234.
- Pozios, K.C., Ding, J., Degger, B., Upton, Z., Duan, C., 2001. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 280, R1230–9.
- Purewal, R., Fisher, P.L., 2018. The contribution of illness perceptions and metacognitive beliefs to anxiety and depression in adults with diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 136, 16–22.
- Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C., 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 6, 25–54.
- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Mussulini, B.H.M., Piato, A.L., Calcagnotto, M.E., Bonan, C.D., et al., 2011. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One* 6, e19397.
- Roy, T., Lloyd, C.E., 2012. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *J. Affect. Disord.* 142, S8–21.
- Sharma, A.N., Bauer, I.E., Sanches, M., Galvez, J.F., Zunta-Soares, G.B., Quevedo, J., et al., 2014. Common biological mechanisms between bipolar disorder and type 2 diabetes: focus on inflammation. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 54, 289–298.
- Shin, E., Hong, B.N., Kang, T.H., 2012. An optimal establishment of an acute hyperglycemia zebrafish model. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6, 2922–2928.
- Stapleton, S.R., 2000. Selenium: an insulin-mimetic. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1874–1879.
- Steinbrenner, H., Sies, H., 2013. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 152–157.
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A.V., 2012. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 62, 135–143.
- Tyree, S.M., Munn, R.G.K., McNaughton, N., 2016. Anxiolytic-like effects of leptin on fixed interval responding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 148, 15–20.
- Tzschentke, B., Bogatyrev, S., Schellong, K., Rancourt, R.C., Plagemann, A., 2015. Temporary prenatal hyperglycemia leads to postnatal neuronal 'glucose-resistance' in the chicken hypothalamus. *Brain Res.* 1618, 231–240.
- Vancampfort, D., Mitchell, A.J., De Hert, M., Sienaert, P., Probst, M., Buys, R., et al., 2015. Type 2 diabetes in patients with major depressive disorder: a meta-analysis of prevalence estimates and predictors. *Depress. Anxiety* 32, 763–773.
- Wrobel, J.K., Power, R., Toborek, M., 2016. Biological activity of selenium: revisited. *IUBMB Life* 68, 97–105.
- Zenki, K.C., Mussulini, B.H., Rico, E.P., De Oliveira, D.L., Rosemberg, D.B., 2014. Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: an *in vitro* approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters. *Toxicol. In Vitro* 28, 822–828.
- Zheng, R., Zhang, Z., Chen, C., Chen, Y., Jia, S., Liu, Q., et al., 2017. Selenomethionine promoted hippocampal neurogenesis via the PI3K-Akt-GSK3b-Wnt pathway in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485, 6–15.

5.2 MANUSCRITO

REDOX AND INSULIN SIGNALING ARE INVOLVED IN THE ANTI-HYPERGLYCEMIC AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF DIPHENYL DISELENIDE: A STUDY USING ZEBRAFISH AS MODEL ORGANISM

MATHEUS M. DOS SANTOS, GABRIEL T. DE MACEDO, ALESSANDRO S. PRESTES, ASSIS ECKER, TALISE E. MÜLLER, JOSSIELE LEITEMPERGER, BÁRBARA D. FONTANA, DENIS B. ROSEMBERG, NILDA V. BARBOSA

Redox and insulin signaling are involved in the anti-hyperglycemic and neuroprotective effects of diphenyl diselenide: A study using zebrafish as model organism

Matheus M. dos Santos^{a,b}, Gabriel T. de Macedo^a, Alessandro S. Prestes^{a,b}, Assis Ecker^{a,b}, Talise E. Müller^{a,b}, Jossiele Leitemperger^{a,b}, Bárbara D. Fontana^{a,b}, Denis B. Rosemberg^{a,b,c},
Nilda V. Barbosa^{a,b}*

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima, 1000, 97105–900 Santa Maria, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105–900 Santa Maria, RS, Brazil.

^c Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC), 309 Palmer Court, Slidell, LA 70458, USA.

*Corresponding author: Dr^a Nilda Vargas Barbosa, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, 97105-900 Santa Maria - RS – Brazil. Tel.: 55-55-3220-8140 Fax: 55-55-3220-8978, e-mail: nvbarbosa@yahoo.com.br

Abstract

A growing body of evidence highlights the hyperglycemia as a putative contributor to several brain dysfunctions as well as points oxidative stress as a key phenomenon in the pathogenesis of diabetes and its complications. Using zebra fish as model organism, here we investigated the mechanisms underlying the neuroprotective effects of organoselenium diphenyl diselenide (DD) in a model of hyperglycemia, targeting mainly redox and insulin signaling biomarkers. Fish were supplemented with a diet containing DD (3mg/kg) for 74 days. During the last 14 days, they were exposed to a 111 mM glucose solution. In addition to reduction in blood glucose levels, DD normalized the brain mRNA expression of insulin receptors (*Insra1*, *Insra2*, *Insrb1*, *Insrb2*) in hyperglycemic fish. DD *per se* caused an up-regulation in *Insra* receptors and glucose transporter 3 (*GLUT3*) mRNA expression. Dietary DD counteracted the effects of hyperglycemia toward oxidation of lipids, carbonylation of proteins and inhibition of enzyme superoxide dismutase (SOD). Indeed, DD *per se* elevated the content of non-protein thiols (NPSH) and the activity of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) enzymes. Hyperglycemic fish exhibited a reduction in mRNA expression of GPx3A and transcript factors Nrf2 and FOXO3b. Except for FOXO3b, this down-regulation was normalized by DD intake. Indeed, DD caused an up-regulation of mRNA that encode Nrf2. Overall, our findings show that the neuroprotective action of DD is associated with redox and insulin signaling modulation.

Keywords: Diabetes, hyperglycemia, diphenyl diselenide, oxidative stress, neuroprotection, insulin signaling.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder characterized by sustained hyperglycemia which occur as a result of insulin deficiency (DM type 1) or insulin resistance (DM type 2) (Rochete et al., 2014; Sharma et al., 2016). People with DM are at higher risk of developing a number of disabling health complications, among them infections, retinopathy vascular and cardiovascular disorders (Jacobson et al., 2007; Koh et al., 2012). Neurological problems may encompass peripheral and autonomic neuropathies, cerebrovascular stroke, epilepsy, anxiety and depression (Clavijo et al., 2006; Jacobson et al., 2007; Kodl and Seaquist, 2008, dos Santos et al., 2018). Nowadays, DM has been recognized as a potential risk factor for developing Alzheimer's disease and vascular dementia (Strachan et al., 2009; Biessels and Despa; 2018).

DM is one of the largest health problems in most of countries and consequently target of numerous researches. However, the signaling mechanisms involved in the pathogenesis of DM are complex and still not completely understood. Oxidative stress is thought plays a causative role or to be a consequence of several diabetic complications (Rochette et al., 2014; Ravassa et al., 2015; Mason et al., 2016; Faria and Persaud, 2017). Hyperglycemia leads to the formation of advanced glycation end-products (AGE) formation, defects in the polyol pathway and mitochondrial dysfunctions, phenomena that culminate with cell redox dyshomeostasis and death (Giacco e Brownlee, 2010). Indeed to lipid peroxidation, DNA damage and protein carbonylation, the reactive species of oxygen and nitrogen (ROS/RNS) from these events may modulate directly or indirectly the activation of kinase signaling pathways and also transcription factors that manage the expression of genes whose protein products are involved in glucose homeostasis, antioxidant activity, DNA repair, immune and inflammatory responses (Rains et al., 2011; Styskal et al., 2012).

Given the participation of oxidative stress in the comorbidities arising from DM, antioxidants have been extensively explored as therapeutics in this field. Diphenyl diselenide (DD) is an organoselenium compound that has been widely studied by our research group, including toward DM. The molecule is a powerful antioxidant and exhibited anti-hyperglycemic and neuroprotective effects in experimental models of DM (Barbosa et al., 2006; Nogueira e Rocha; 2010; Santos et al., 2018). In our first studies with diabetic rats, we verified that the chronic consumption of a diet containing the compound decreased the hyperglycemia, mortality rate and restored the redox balance in different tissues of animals (Barbosa et al., 2006; 2008). Likewise, dietary DD along with the reduction in glycemia prevented anxiety-like behavior induced by hyperglycemia in zebrafish (Santos et al., 2018). Although we have demonstrated the beneficial role of supplementation in different model organism in DM protocols, the mechanisms underlying the protective effects of DD still need to be identified at the cellular and molecular levels. So, using zebrafish (*Danio rerio*) as alternative model organism, herein we performed a battery of tests to explore the participation of redox status and insulin signaling on DD neuroprotection in DM, identifying molecular targets involved in these events

In addition to recognized importance as a valuable tool for investigating a wide variety of brain diseases, zebrafish has been highlighted as an emerging organism alternative for modeling hyperglycemia/DM (Gleeson et al., 2007; Capiotti et al., 2014a, b; Dorsemans et al., 2017; Connaughton et al., 2016; Kalueff et al., 2015; Panula et al., 2010; Rico et al., 2011). As mammals, zebrafish has similar pancreatic and β -cell development and function (Xiang-Hui Meng et al., 2017). Besides, the fish expresses two isoforms of insulin receptor (*insra* and *insrb*), which exhibit high homology to the human receptors (Yuka Toyoshima et al., 2008). Four insulin-like growth factors (IGFs) that encode functional insulin-like peptides are also present in zebrafish (Zou et al., 2009). DM type 2 has been developed by immersing fish in water

supplemented with glucose while DM type 1 by intraperitoneal administration of drugs as streptozotocin or alloxan (Moss et al., 2009; Shin et al., 2012).

In this scenario, our results showing that the neuroprotection offered by dietary DD may encompasses the modulation of mRNA expression of antioxidant and insulin signaling responsive genes disrupted by hyperglycemia contribute to a mechanistic overview on the pharmacology of compound.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Glucose was purchased from Nuclear™ (São Paulo, Brazil). DD was synthesized according to the literature methods (Paulier, 1986). Malondialdehyde (MDA) and 2-thiobarbituric acid (TBA) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical reagent grade and purchased from Merck (Rio de Janeiro, Brazil).

2.2 Animals

Adult zebrafish (*Danio rerio*, 4 to 6 months old) of both sex (approximately 50:50 male: female ratio) from a heterogeneous wild type stock (short-fin phenotype) were purchased from a local commercial distributor (Hobby Aquários, RS, Brazil). The fish were housed in 40 L aquariums for 2 weeks before the start of the experiments. The maximum density was 2 fish per liter. All aquariums were filled with non-chlorinated water previously treated with AquaSafe™ (2 drops/L). Water was maintained at constant filtration and aeration at temperature of 26 ± 2 °C and pH adjusted to 7.0-8.0. The room illumination was performed by a 14:10 light-dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 am). Before DD supplementation, animals were fed twice daily with commercially available fish flake food (Alcon Basic™, Alcon, Brasil). The animals were maintained following the recommendations of the National Institute of Health Guide for

the Care and Use of Laboratory Animals (2011). For this study, a total of 80 animals were used and all procedures performed with the subjects were approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (process number: 2649140717/2017).

2.3 DD Supplementation and Hyperglycemia Induction

Standard diet or supplemented 3 mg/Kg DD diet were made into pellets (5 mm of diameter) and stored at 4 °C before and during the treatment, following the methodology previously described (Menezes et al., 2014). After acclimatization period, fish were transferred to 3 L aquariums (6-7 animals per aquarium). The animals were randomly divided in 4 experimental groups (n= 20): Group 1 (Control); Group 2 (DD); Group 3 (Glucose) and Group 4 (Glucose + DD). Groups 1 and 3 were fed with the standard diet, whereas groups 2 and 4 with 3.0 mg/Kg DD supplemented diet. Fish were fed with the diets twice a day (3% of body mass) for 74 days. In the last 14 days, the animals of the groups 3 and 4 were submitted to the hyperglycemia model based in the addition of a 111 mM glucose solution to the tank water, as previously described (Capiotti et al., 2014a). Glucose solution was changed every day to avoid a possible contamination.

2.4 Fasting Blood Glucose Measurements

At the end of treatment, blood glucose was determined after a 12h fasting period. Prior the measurements, fish were placed during 15 minutes in water without glucose to eliminate possible residual glucose in the body (Gleeson et al., 2007). Afterwards, the animals were anesthetized by hypothermia induction in order to reduce the fluctuations in the blood glucose (Eames et al., 2010). Then, fish tail was cut and blood glucose measured by placing a glucometer (G-Tech Free 1) directly on the docked tail.

2.5 Biochemical and Molecular Analysis

2.5.1. Tissue Preparation

After blood glucose measurement, the fish were euthanized by decapitation and the brains were quickly removed, transferred to microtubes and kept at -80 °C. For the biochemical analysis, brains were homogenized in the proportion of 1 brain to 150 µL Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 buffer. The homogenate was centrifuged at 3.000 g for 10 min at -4 °C to yield the low-speed supernatant fraction (S1) that was used for the biochemical assays.

2.5.2. Lipid Peroxidation Assay

Brain lipid peroxidation was evaluated by the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). For this, 80 µL of brain homogenate was mixed with 160 µL of 10% TCA and centrifuged for 10 min at 10.000 g. Then, 100 µL of S1 was mixed with 100 µL of 0.67% thiobarbituric acid (TBA) and heated at 100 °C for 30 min. TBARS levels were measured spectrophotometrically at 532 nm using a microplate reader. Malondialdehyde (MDA) was used as standard. Results were expressed as nmol MDA/mg of protein (Draper and Hadley, 1990).

2.5.3. Carbonylated Proteins

The degree of protein oxidation was evaluated by measuring the levels of carbonylated proteins (CP) as previously described by Yan et al. (1995). Soluble protein (200 µL) was added to 10 mM DNPH in 2 N hydrochloric acid. The mixture was incubated for 1h in the dark at room temperature and then, 150 µL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing SDS 3.0%), 500 µL of heptanes (99.5%), and 500 µL of ethanol (99.8%) were added sequentially in the medium, maintained in continuous agitation for 40 s. After the centrifugation for 15 min at 3.000 g, isolated proteins were washed twice by resuspension with ethanol/ethyl

acetate (1:1) solution and then suspended in 250 μL of denaturing buffer. CP levels were measured spectrophotometrically at 370 nm using a microplate reader. Results were expressed as nmol carbonyl/mg of protein.

2.5.4. Non-protein thiols (NPSH) Levels

NPSH levels were quantified as previously described by Ellman (1959) with same modifications. The homogenate (100 μL) was mixed with 100 μL of 10% TCA and centrifuged at 3.000 g for 10 min at 4 °C). Then, S1 (60-80 μg of protein) was mixed with 0.01 M DTNB (5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid). After 1 h, NPSH amount was measured spectrophotometrically at 412 nm. Results were expressed as nmol SH/mg of protein.

2.5.5. Antioxidant Enzymes Activity

2.5.5.1. Catalase (CAT)

CAT activity was measured spectrophotometrically by evaluating the decrease in the H_2O_2 decomposition at 240 nm as previously described (Aebi, 1984). The reaction was initiated by adding 10 μL of homogenate (20-30 μg of protein) in a medium containing 1 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and 50 μL H_2O_2 . One unit of CAT was considered as the amount of enzyme which decomposes 1 μmol H_2O_2 / minute at pH 7.0 at 25°C. Results were expressed as μmol H_2O_2 /min/mg of protein.

2.5.5.2. Superoxide dismutase (SOD)

SOD activity was determined spectrophotometrically according to the method proposed by Misra e Fridovich (1972), based in ability of enzyme in inhibiting the adrenalin oxidation by the radical superoxide. The medium contained glycine NaOH (50 mM, pH 10), adrenaline (1 mM), and homogenate (20-30 μg of protein) and the reaction was monitored by measuring the speed of adenochrome formation at 480 nm. The assay was made using a microplate reader and the results were expressed as unit SOD/mg of protein.

2.5.5.3. *Glutathione peroxidase (GPx)*

The activity of GPx was measured following the rate of NADPH oxidation by the coupled reaction with glutathione reductase (Paglia and Valentine, 1967). Briefly, 20 μ L of homogenate (40-60 μ g of protein) were mixed with 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM NaN_3 , 1 mM reduced glutathione, and 0.15 mM NADPH. The reaction was initiated after the addition of 30 μ L 0.4 mM H_2O_2 . The reaction mixture contained a final volume of 300 μ L. GPx activity was assessed spectrophotometrically at 340 nm using a microplate reader. Results were expressed as nmol NADPH/min/mg of protein.

2.5.5.4. *Glutathione S-transferase (GST)*

The enzyme activity was assessed according to the method described by Habig et al. (1974), based on the principle that GST catalyzes the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) to reduced glutathione (GSH), originating a thioether (S-2, 4-dinitrophenyl glutathione). The reaction medium contained 1 mM CDNB in ethanol, 10 mM reduced glutathione, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), and 20 μ L of homogenate (40-60 μ g of protein). The activity was monitored by the changes in absorbance at 340 nm in a microplate reader using the molar extinction coefficient of 9.6 mM/cm. One unit of GST was defined as the amount of enzyme required to catalyzes the conjugation of 1 mol CDNB with GSH/min at 25 ° C. GST activity was expressed as nmol GS-DNB/min/mg of protein.

2.5.6. *Analysis of mRNA expression by quantitative real time PCR (q-RT-PCR)*

Total RNA was extracted from a pool of 3 brains using Trizol Reagent (Invitrogen[®], Brazil). Table 1 shows the primer sequences used in this work. After quantification, the total RNA was treated with DNase I (invitrogen), and the cDNA was synthesized with M-MLV reverse transcriptase enzyme and random primers using the manufacturer's protocol (Invitrogen). q-RT-PCR was performed in in 20 μ l reaction volumes in 96-well plates with 1 μ l RT product

(cDNAs) as template, 1x PCR buffer, 25 mM dNTPs, 0.2 μ M of each primer of interest, 1.5-3.0 mM MgCl₂, 0.1x SYBR Green I (molecular probes), and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Threshold and baselines were manually determined using the StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, NY) and the CT (cycle threshold) value for each sample was calculated and recorded using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Each well was analyzed in triplicate, and the ΔCT value was obtained by subtracting the β -actin CT value from the CT value of the gene of interest. Results were expressed as relative mRNA expression. Gene specific primer sequences were based on published sequences in GenBank Overview (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) designed with Primer3 program version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) and custom made by Invitrogen®. The primers used in the present study are listed in Table 1.

2.5.7. Protein Determination

Protein content was quantified by the Coomassie blue method measuring the absorbance of samples at 595 nm. Bovine serum albumin was used as standard (Bradford, 1976).

2.5.8 Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard error of mean (S.E.M) and analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Results were analyzed using the Graphpad Prism software (version 7.0) and the significance level was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Fasting blood glucose levels

Exposure to glucose for 14 days caused a significant increase (approximately 3.5-fold) in the fasting blood glucose levels of fish when compared to the control group (**Fig. 1**). As previously

observed in this protocol for inducing hyperglycemia, dietary DD attenuated the hyperglycemia induced by continuous glucose exposure. The chronic intake of DD diet did not provoke any alteration in the glycemia of animals. Statistical analysis revealed a significant DD X glucose interaction ($F_{1,76} = 13.82$, $p = 0.0004$) and a main effect of glucose ($F_{1,76} = 65.05$, $p < 0.0001$) and DD ($F_{1,76} = 13.14$, $p = 0.0005$).

3.2. mRNA expression of insulin responsive genes

In this set of experiment, we evaluated the transcript levels of mRNA that encode insulin transporter and receptors in brain of zebrafish. Similar effects were observed on mRNA expression of insulin receptor isoforms (**Fig. 2A-D**). Glucose exposure decreased markedly the mRNA expression of *Insra1* (~1.49-fold), *Inra2* (~1,54-fold), *Insrb1* (~1.77-fold) and *Inrb2* (~1.71-fold) when compared to the control. This down-regulation caused by hyperglycemic condition was completely counteracted by DD treatment. Interestingly, *Insra* subtypes were up-regulated in normoglycemic fish supplemented with DD (~1,44-fold for *Insra1* and ~1,37-fold for *Insra2*) (Fig 2A and 2B). For *Insra1* and *Insra2*, two-way ANOVA revealed a significant effect of glucose ($F_{1,36} = 13.92$, $p = 0.0007$ for *Insra1* and $F_{1,46} = 17.8$, $p = 0.0001$ for *insra2*) and DD ($F_{1,36} = 10.59$, $p = 0.0025$ for *Insra1* and $F_{1,46} = 10.74$, $p = 0.0020$ for *insra2*). For *Insrb1*, statistical analysis showed a DD × glucose interaction ($F_{1,30} = 4.777$, $p = 0.0368$), and a main effect of DD ($F_{1,30} = 4.71$, $p = 0.0380$). A main effect of glucose ($F_{1,26} = 7.251$, $p = 0.0122$) and DD ($F_{1,26} = 15.05$, $p < 0.0006$) was observed on *Insrb2* expression. The same effect profile *per se* of DD was verified toward GLUT3 mRNA expression, which was not modified by glucose exposure (**Fig. 2E**). Here, Two-way ANOVA showed a significant main effect of DD ($F_{1,30} = 17.64$, $p < 0.0002$).

3.3. Redox balance Parameters

3.3.1. Thiol depletion, Lipid and protein oxidation

Hyperglycemia induced a significant increase in the levels of lipid peroxidation and protein carbonylated of fish. These effects were not accompanied by thiol depletion, parameter evaluated by content of NPSH (**Fig. 3A, 3B and 3C**, respectively). Dietary DD counteracted the effects of hyperglycemia toward oxidation of lipids and proteins and also elevated *per se* the content of brain NPSH when compared to the control group. For lipid peroxidation, Two-way ANOVA revealed a significant DD \times glucose interaction ($F_{1,20} = 11.09, p = 0.0033$) and a main effect of glucose ($F_{1,20} = 20.5, p = 0.0002$), and DD ($F_{1,20} = 6.932, p = 0.0160$). Statistical analysis also yielded a significant DD \times glucose interaction ($F_{1,20} = 26.64, p < 0.0001$) and main effect of glucose ($F_{1,20} = 14.62, p = 0.0011$) and DD ($F_{1,20} = 10.4, p = 0.0042$) on protein carbonilatyon. A main effect of DD was verified for thiol content ($F_{1,20} = 18.4, p = 0.0004$).

3.3.2 Activity of antioxidant enzymes

The set of data regarding the activity of antioxidant enzymes shows that only SOD activity was affected by glucose exposure, which caused a significant inhibition (Fig 4A). Two way analysis revealed a main effect of glucose ($F_{1,20} = 37.33, p < 0.0001$). Besides mitigating this effect, dietary DD *per se* enhanced the activity of GPx and GST enzymes (Fig 4A, 4C and 4D). Here, Two-way ANOVA yielded a significant main effect of DD for GPx ($F_{1,20} = 26.69, p < 0.0001$) and GST ($F_{1,20} = 4.72, p = 0.0420$). Catalase activity was not modified by both glucose or DD ($p > 0.05$) (Fig 4B).

3.3.3 mRNA expression of redox responsive genes

The mRNA expression of redox responsive genes analyzed here were down-regulated by glucose exposure (**Fig 5**). The brain mRNA expression of GPx3A and transcript factors Nrf2 and FOXO3b from hyperglycemic fish decreased ~ 1.46 and 1,64-fold, respectively in relation to the control (Fig 5A, 5B and 5C). Dietary DD was effective in normalizing the mRNA levels of GPx3 and Nrf2 without affecting the transcript levels of FOXO3b. Indeed, DD caused an

up-regulation on the levels of mRNA that encode Nrf2. Statistical analysis revealed a main effect of glucose ($F_{1,45} = 9.754$, $p = 0.0031$) and DD ($F_{1,45} = 11.22$, $p < 0.0016$) for GPx3A. Similarly, a significant main effect of glucose ($F_{1,48} = 14.45$, $p = 0.0004$), and DD ($F_{1,48} = 29.88$, $p < 0.0001$) was found for Nrf2. For mRNA gene expression of FOXO3b, statistical analysis indicated a main effect of glucose ($F_{1,47} = 16.94$, $p = 0.0002$).

4. Discussion

In the current work, we explored whether the protective effects elicited by DD under hyperglycemic condition could be related with the modulation of redox and insulin signaling, identifying some targets associated with these pathways in zebrafish. Our results indicate, for the first time at molecular level, that the hypoglycemic and neuroprotective action of DD on diabetes may be related with the transcriptional control of insulin receptors and transcript factors that provide a responsive defense against oxidative stress.

The hypoglycemic activity of dietary DD was firstly demonstrated by Barbosa et al. (2008) in a model using rodents. The authors evidenced that diabetic rats fed with diet had a reduction on blood glucose levels. Continuing this line of research with alternative model, we recently showed that dietary DD was also effective in decreasing the hyperglycemia in zebrafish as well as the related anxiety-like behavior (Santos et al., 2018). However, in both studies, the mechanisms involved in the hypoglycemic and/or neuroprotective effects of selenium compound was not explored in detail. So, here we analyzed the mRNA expression of some responsive genes for insulin signaling pathway in the zebrafish's brain exposed to glucose and treated with DD. Insulin receptors (*Insra1*, *Insra2*, *Insrb1*, *Insrb2*) expression were significantly reduced by glucose exposure. These results are in contrast to those observed by Capiotti et al. (2014a), where the same protocol of hyperglycemia did not induce any change on the mRNA expression of these insulin receptors. In this set of experiment, DD diet normalized the

expression of all receptor isoforms and also increase *per se* the mRNA expression of GLUT3, which was not modified by glucose exposure. In accordance, Capiotti et al. (2014a) did not find in GLUT3 mRNA expression. These set of results suggest that the insulin receptors are “molecular targets” of DD and consequently involved in its hypoglycemic/neuroprotective action.

The chronic hyperglycemia is linked with exacerbated ROS production, species that damage biomolecules such as lipids, proteins and DNA (Cadenas et al., 2000, Rochette et al., 2014). Due to the high oxygen consumption, high content of polyunsaturated fatty acids and lower antioxidant activity, brain is more susceptible to oxidative stress than other organs/tissues (Halliwell, 1992; Steinbrenner and Sies, 2009). In accordance, herein we evidenced that the hyperglycemia increased markedly the levels of lipid peroxidation and carbonylated proteins in brain as well as caused disruption in the action and expression of some antioxidant enzymes.

Selenium is an essential micronutrient recognized by its important antioxidant role in the in the biological systems (Pillai et al., 2014; Rayman et al., 2000; Steinbrenner and Sies, 2009). Selenium deficiency has been associated with enhanced brain susceptibility to oxidative stress and an increased risk for developing neurodegenerative diseases (Chen and Berry, 2003; Frank et al., 2013; Sharma and Amin, 2013). The biological importance of selenium is attributed mainly to the role played by selenoproteins, including the GPx family (Cardoso et al., 2015). The activation of genes encoding GPx isoforms and other antioxidant enzymes is thinly managed by the transcription factor nuclear erythroid-related factor 2 (Nrf2) (Kobayashi and Yamamoto, 2005). FOXO is another transcript factor important in regulating cellular stress responses. In addition, FOXO controls functions as glucose metabolism, cell cycle arrest and cell death (Huang and Tindall, 2007; Xie et. al., 2011). In this scenario, we observe that DD diet protected the cerebral tissue of oxidative damage induced by hyperglycemia. It plausible suppose that this effect involves the molecular machinery triggered by Nrf2, since the Nrf2 and

GPx3 mRNA expression were positively modulated by DD under hyperglycemic condition. In accordance, there is evidence that organochalcogens such as ebselen and DD activate the Keap1/Nrf2 signaling pathway, improving the cellular antioxidant capacity of cells (Barbosa et al., 2017).

In addition to cell antioxidant machinery, the results obtained here include the insulin signaling in the network of mechanisms underlying to the neuroprotective/hypoglycemic properties of DD. However, we emphasize that more molecular targets from these pathways need to be evaluated.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the financial support and fellowships from FAPERGS/CNPq/PRONEX n° 16/2551-0000 499-4, Pronem, CAPES and CNPq - Brazil. NVB, DBR and VLL are recipients of CNPq fellowships.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Barbosa NB, Oliveira C, Araldi D, Folmer V, Rocha JB, Nogueira CW (2008) Acute diphenyl diselenide treatment reduces hyperglycemia but does not change delta-aminolevulinate dehydratase activity in alloxan-induced diabetes in rats. *Biol Pharm Bull* 31:2200-2204
- Barbosa NB, Rocha JB, Wondracek DC, Perottoni J, Zeni G, Nogueira CW (2006) Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chem Biol Interact* 163:230-238
- Barbosa NV, Nogueira CW, Nogara PA, de Bem AF, Aschner M, Rocha JBT (2017) Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents. *Metallomics* 9:1703-1734
- Biessels GJ, Despa F (2018) Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*. doi: 10.1038/s41574-018-0048-7
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cadenas E, Josl J, Antunes F, Boveris A (2000) Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Rad Res* 33:747–756
- Capiotti KM, Antonioli R Jr, Kist LW, Bogo MR, Bonan CD, Da Silva RS (2014a) Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 171:58-65
- Cardoso R, Roberts BR, Bush AI, Hare DJ (2015) Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases. *Metallomics*. doi:10.1039/C5MT00075K
- Chen J, Berry MJ (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 86:1–12
- Clavijo M, Carvalho JJ, Rios M, de Oliveira IR (2006) Psychiatric disorders in patients with diabetes type 2 at medical care and training district of Rio Branco-Acre, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 64:807-813
- Connaughton VP, Baker C, Fonde L, Gerardi E, Slack C. (2016) Alternate immersion in an external glucose solution differentially affects blood sugar values in older versus younger zebrafish adults. *Zebrafish* 13:87-94
- Dorseman AC, Soulé S, Weger M, Bourdon E, Lefebvre d'Hellencourt C, Meilhac O, Diotel N (2017) Impaired constitutive and regenerative neurogenesis in adult hyperglycemic zebrafish. *J Comp Neurol* 525:442-458
- Dos Santos MM, de Macedo GT, Prestes AS, Loro VL, Heidrich GM, Picoloto RS, Rosemberg DB, Barbosa NV (2018) Hyperglycemia elicits anxiety-like behaviors in zebrafish: Protective role of dietary diphenyl diselenide. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 85:128-135
- Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421–431

- Eames SC, Philipson LH, Prince VE, Kinkel MD (2010) Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. *Zebrafish* 7:205-213
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77
- Faria A, Persaud SJ (2017) Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 172:50-62
- Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107:1058-1070
- Gleeson M, Connaughton V, Arneson LS (2007) Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetol* 44:157-163
- Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609–1623
- Huang H, Tindall DJ (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 120:2479-2487
- Jacobson AM, Musen G, Ryan CM, Silvers N, Cleary P, Waberski B, Burwood A, Weinger K, et al. (2007) Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med*. 356:1842-1852
- Kalueff AV, Echevarria DJ, Homechaudhuri S, Stewart AM, Collier AD, Kaluyeva AA, Li S, Liu Yet al (2015) Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. *Aquat Toxicol*. doi:10.1016/j.aquatox.2015.08.007
- Kobayashi M, Yamamoto M (2005) Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 7:385-394
- Kodl CT, Seaquist ER (2008) Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29:494-511
- Koh GC, Peacock SJ, van der Poll T, Wiersinga WJ (2012) The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *Eur Clin Microbiol Infect Dis* 31:379-388
- Livak KJ, Schmittgen TD (2011) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25:402–408.
- Menezes C, Leitemperger J, Santi A, Dias G, Pedron FA, Neto JR, Salman SM, Barbosa NV, Loro VL (2014) Evaluation of the effects induced by dietary diphenyl diselenide on common carp *Cyprinus carpio*. *Fish Physiol Biochem* 40:141-149
- Meng X, Chen B, Zhang J (2017) Intracellular Insulin and Impaired Autophagy in a Zebrafish model and a Cell Model of Type 2 diabetes. *Int J Biol Sci* 13:985–995
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175
- Moss JB, Koustubhan P, Greenman M, Parsons MJ, Walter I, Moss LG (2009) Regeneration of the pancreas in adult zebrafish. *Diabetes* 1844-1851
- Nogueira CW, Rocha JBT (2010) Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. *J Braz Chem Soc* 21:2055-2071

- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158–169
- Panula P, Chen Y, Priyadarshini M, Semenova S, Sundevik M, Salinnen V (2010) The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis* 40:46–57
- Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP (2014) Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life* 66:229–239
- Rains JL, Jain SK (2011) Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50:567–575
- Ravassa S, Beaumont J, Huerta A, Barba J, Coma-Canella I, González A, López B, Díez J (2015) Association of low GLP-1 with oxidative stress is related to cardiac disease and outcome in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *Free Radic Biol Med* 81:1–12
- Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* 356:233–241
- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Silva RSD, Bonan CD (2011) Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol* 33:608–617
- Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C (2014) Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 1840:2709–2729
- Sharma AK, Amin S (2013) Post SELECT: selenium on trial. *Future Med Chem* 5:163–174
- Sharma M, Petersen I, Nazareth I, Coton SJ (2016) An algorithm for identification and classification of individuals with type 1 and type 2 diabetes mellitus in a large primary care database. *Clin Epidemiol* 8:373–380
- Shin E, Hong BN, Kang TH (2012) An optimal establishment of an acute hyperglycemia zebrafish model. *Afr J Pharm Pharmacol* 2922–2928
- Steinbrenner H, Sies H (2009) Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1790:1478–1485
- Strachan MWJ, Reynolds RM, Frier BM, Mitchell RJ, Price JF (2009) The role of metabolic derangements and glucocorticoid excess in the aetiology of cognitive impairment in type 2 diabetes. Implications for future therapeutic strategies. *Diabetes Obes Metab*. doi:10.1111/j.1463-1326.2008.00963.x.
- Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB (2012) Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med* 52:46–58
- Toyoshima Y, Monson C, Duan C, Wu Y, Gao C, Yakar S, Sadler KC, LeRoith D (2008) The Role of Insulin Receptor Signaling in Zebrafish Embryogenesis. *Endocrinology* 149:5996–6005
- Xie XW, Liu JX, Hu B, Xiao W (2011) Zebrafish foxo3b Negatively Regulates Canonical Wnt Signaling to Affect Early Embryogenesis. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0024469
- Yan LJ, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low density lipoproteins. *Analytical Biochemical* 228:349–351

Zou S, Kamei H, Modi Z, Duan C (2009) Zebrafish IGF Genes: Gene Duplication, Conservation and Divergence, and Novel Roles in Midline and Notochord Development. PLOS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0007026

FIGURES

Figure 1

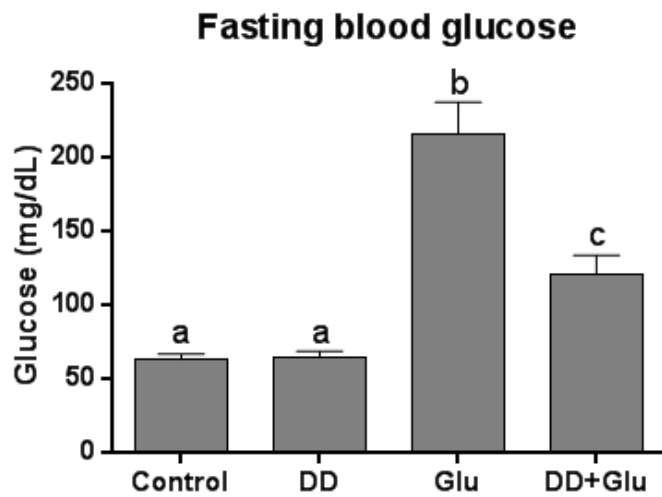


Fig. 1 Effect of glucose exposure and dietary DD on fasting blood glucose levels in zebrafish. Control (unsupplemented DD diet); DD (diphenyl diselenide 3.0 mg/Kg); Glu (glucose) and DD+Glu (DD 3.0 mg/Kg plus glucose). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, $n = 20$ per group).

Figure 2

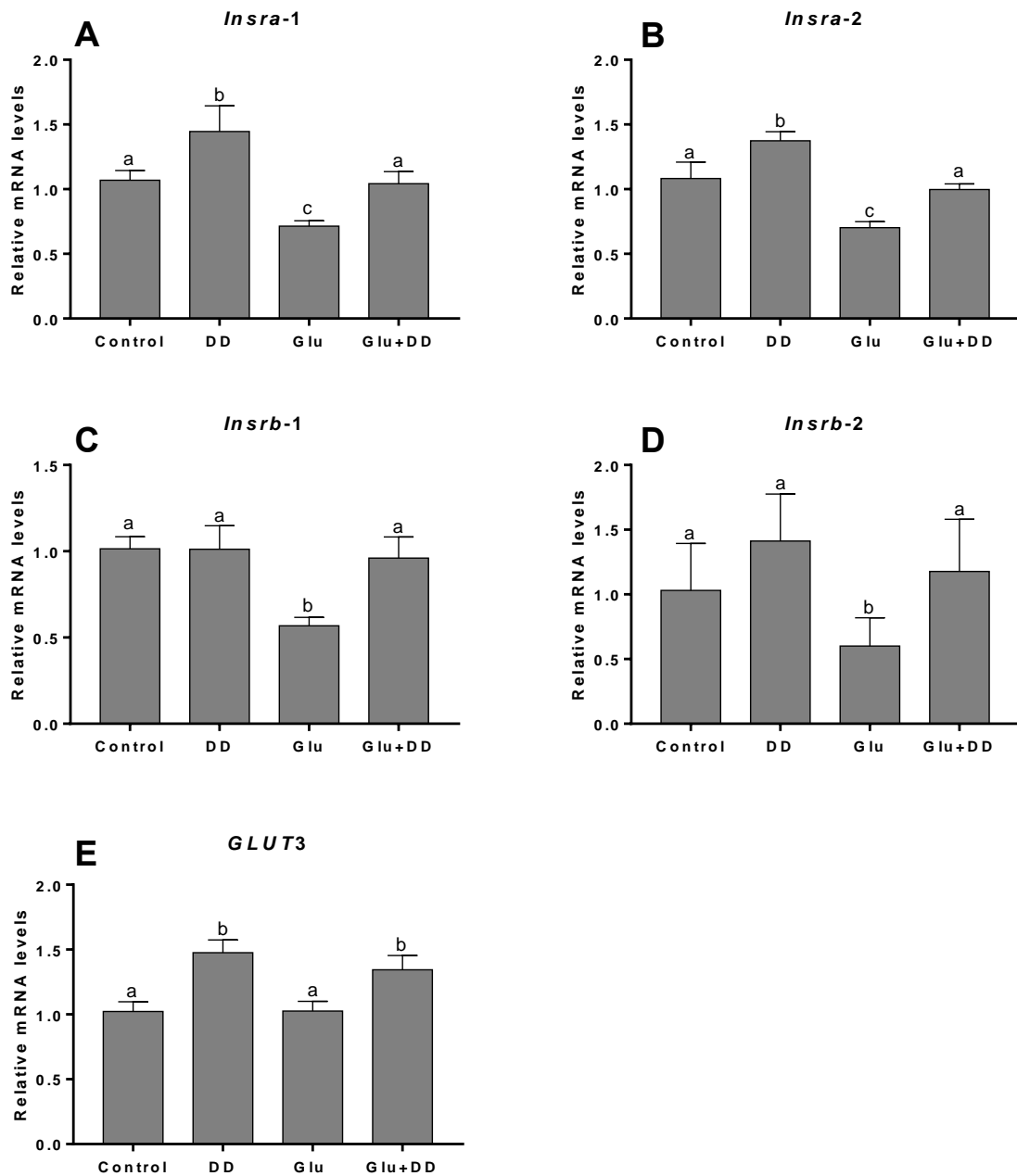


Fig. 2 Effect of glucose exposure and dietary DD on mRNA expression of insulin responsive genes. (A) insulin receptor *Insra1*, (B) insulin receptor *Insra2*, (C) insulin receptor *Insrb1*, (D) insulin receptor *Insrb2*, and (E) glucose transporter *GLUT3*. Control (unsupplemented DD diet); DD (diphenyl diselenide 3.0 mg/Kg); Glu (glucose) and DD+Glu (DD 3.0 mg/Kg plus glucose). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, $n = 6-10$ per group).

Figure 3

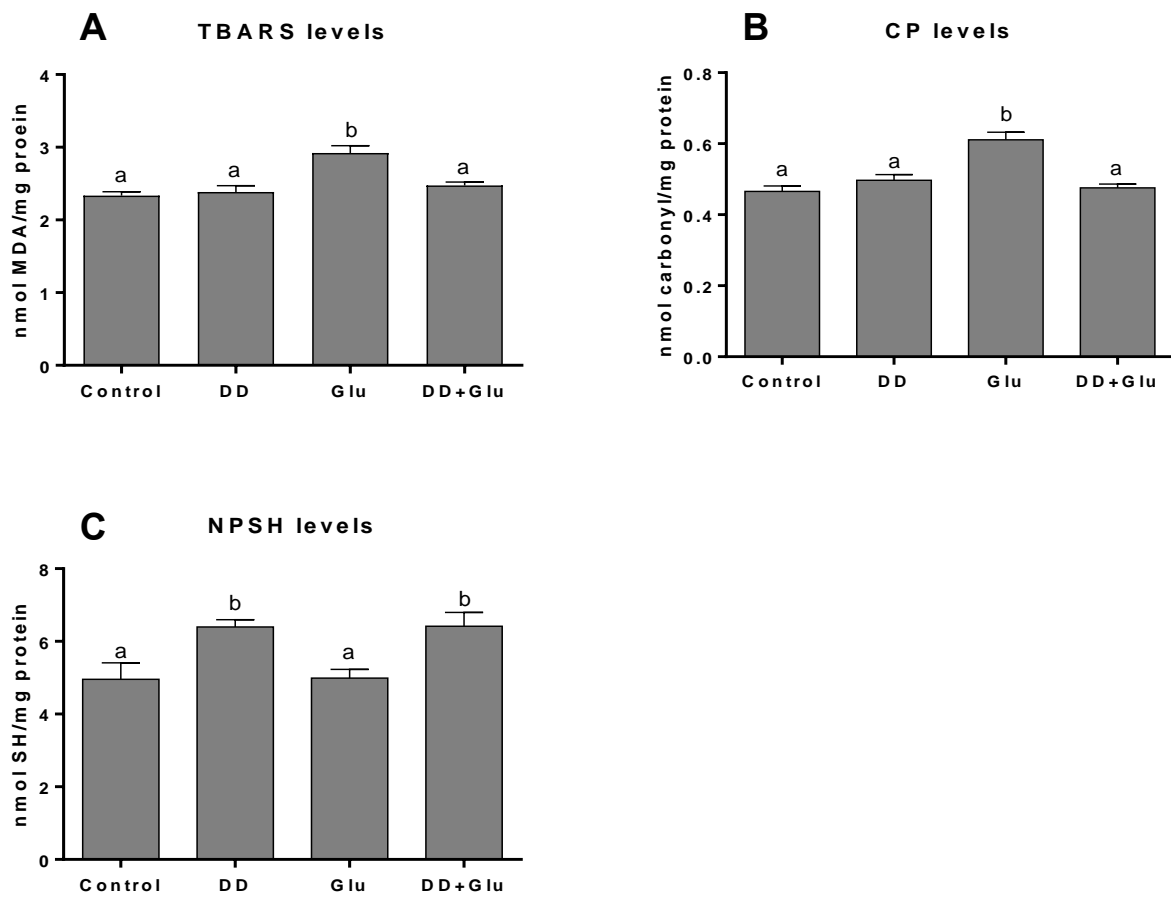


Fig. 3 Effect of glucose exposure and dietary DD on oxidative biomarkers in brain of zebrafish. (A) TBARS, (B) CP and (C) NPSH levels. Control (unsupplemented DD diet); DD (diphenyl diselenide 3.0 mg/Kg); Glu (glucose) and DD+Glu (DD 3.0 mg/Kg plus glucose). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, $n = 6$ per group).

Figure 4

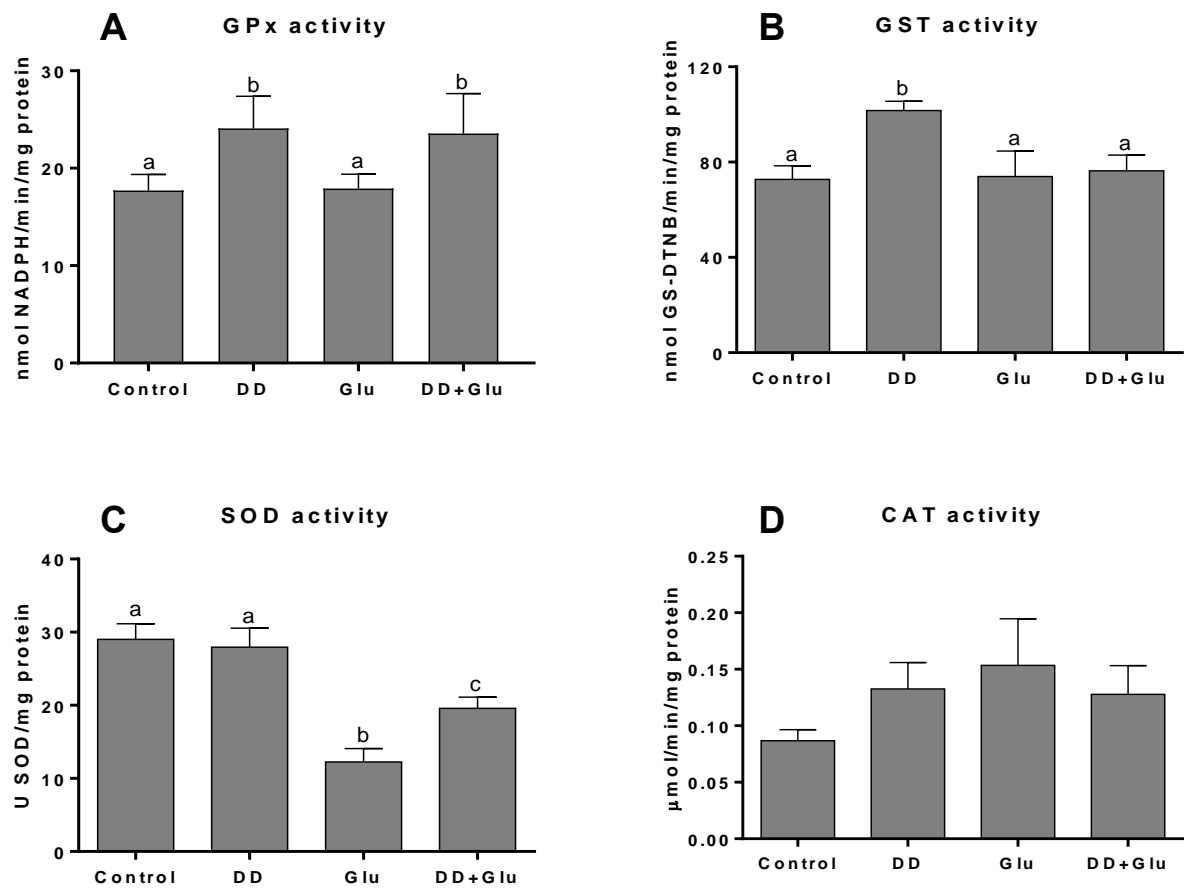


Fig. 4 Effect of glucose exposure and dietary DD on brain antioxidant enzymes of zebrafish. (A) SOD, (B) CAT, (C) GPx and (D) GST activity. Control (unsupplemented DD diet); DD (diphenyl diselenide 3.0 mg/Kg); Glu (glucose) and DD+Glu (DD 3.0 mg/Kg plus glucose). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, $n = 6$ per group).

Figure 5

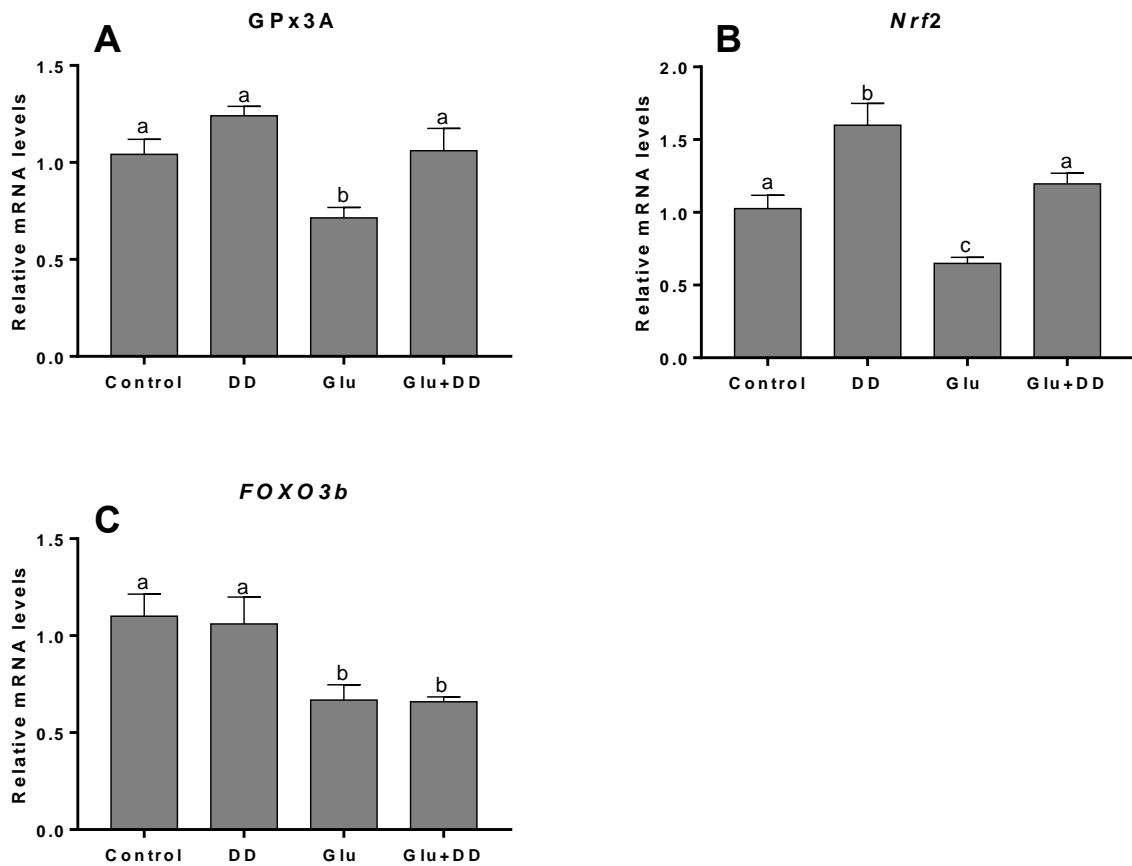


Fig. 5 Effect of glucose exposure and dietary DD on mRNA expression of redox responsive genes. (A) GPx3A, (B) Nrf2, and (C) FOXO3b. Control (unsupplemented DD diet); DD (diphenyl diselenide 3.0 mg/Kg); Glu (glucose) and DD+Glu (DD 3.0 mg/Kg plus glucose). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate and expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, $n = 6-10$ per group).

TABLE**Table 1.** Primer sequences for RT-qPCR experiments

Sequence	Forward	Reverse
β -actin	5'- GATGATGAATTGCCGCACTG-3'	5'- ACCAACCATGACACCCTGATGT-3'
<i>Insr1</i>	5'- CAACATGCCCCCTCACCCT-3'	5'- CGACACACATGTTGTTGTG-3'
<i>Insr2</i>	5'- GGAGCCCCACTCGTCTAACAAA-3'	5'- CGCCGTTGTGAATGACGTATTC-3'
<i>Insr3</i>	5'- GACTGATTACTATCGCAAGGG-3'	5'- TCCAGGTATCCTCCGTCCAT-3'
<i>Insr4</i>	5'- CCACCGCCAACCCTAAAGGA-3'	5'- TTGCGATAGTAATCAGTC TCGTAAAT-3'
<i>Glut3</i>	5'-TCGTCAATGTCTTGGCTCTG-3'	5'- CAACATACATTGGCGTGAGG-3'
<i>GPx3A</i>	5'- CTGGACCTCTGTTGTGCTTCT-3'	5'- GAGTTACAGGCCTGGGTGTTG-3'
<i>Nrf2</i>	5'- CCAAGCCAACAGGACATGGA-3'	5'- TGAAGTCGAACACCTCACGG-3'
<i>FOXO3b</i>	5'- ATGAATGGGAGGAGAGGTGTTAAT-3'	5'-AGATAGGCAGTGGGATGCG-3'

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nessa tese de doutorado mostram pela primeira vez alterações comportamentais do tipo ansiedade provocadas pela hiperglicemia em um modelo utilizando o peixe-zebra. Além disso, também pela primeira vez foram evidenciadas alterações em parâmetros de estresse oxidativo mediadas pela condição hiperglicêmica nesse mesmo modelo. Em termos de proteção, foi possível constatar a eficácia do DD via suplementação como hipoglicemiante e neuroprotetor, bem como indicar que tais efeitos envolvem alvos moleculares/celulares de vias de sinalização redox e da insulina.

Alguns estudos em outros organismos modelos mostram que o DD pode ser tóxico dependendo da dose e da via de administração (GOLOMBIESKI et al., 2008; PRIGOL et al., 2009). Assim, inicialmente nós avaliamos se a suplementação crônica com dietas contendo DD poderia causar toxicidade, uma vez que não havia outros estudos na literatura com esta dieta em peixe-zebra. A escolha das concentrações testadas foram baseadas em um estudo realizado por MENEZES et al. (2014). Neste, peixes teleósteos da espécie *Cyprinus carpio* foram suplementados com DD nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 mg/Kg. Os resultados demonstraram que a concentração mais alta foi tóxica, aumentando a peroxidação lipídica hepática e diminuindo a atividade da enzima acetilcolinesterase dos animais. Por outro lado, a suplementação com DD na concentração de 3 mg/Kg não causou nenhum sinal de toxicidade e ainda aumentou a atividade da enzima SOD, o conteúdo de NPSH e ácido ascórbico. Com base nesses dados, optamos por testar em peixe-zebra o efeito do consumo crônico de dietas contendo DD nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg/Kg. O peso corpóreo dos animais foi o primeiro parâmetro avaliado, uma vez que a perda de peso constitui um dos principais sinais em termos de toxicidade (JÚNIOR et al., 2012). Comparados aos animais suplementados com as rações controles, observamos que nenhuma das concentrações de DD suplementadas por 74 dias causou alteração significativa no peso dos animais.

Ainda na investigação de possíveis efeitos tóxicos causados pela suplementação com DD, avaliamos a viabilidade celular no cérebro dos animais tratados. Tanto o MTT quanto a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) são parâmetros já bem consolidados para a investigação deste parâmetro (DE ALMEIDA et al., 2008; WANG et al., 2012). Os resultados demonstraram que nenhuma das concentrações de DD testadas induziu alterações condizentes com perda de viabilidade celular.

Para finalizar este set de triagem de concentração, foi verificado se suplementação com as diferentes dietas poderia induzir fenótipos relacionados com comportamento do tipo ansiedade, tendo em vista que este seria um dos focos do estudo com modelo hiperglicemia. Através do teste do “tanque-novo” e do “claro-escuro”, constatamos que nenhuma das concentrações de DD modificou o comportamento normal dos peixes nesses testes. Desta forma, a dieta contendo DD 3 mg/Kg foi escolhida como terapêutico para ser usada nos protocolos de hiperglicemia.

Estudos apontam que o DD, devido a sua lipofilicidade, pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica. Camundongos expostos a um tratamento agudo ou crônico com DD exibiram aumentos significativos nos níveis cerebrais de Se (JAQUES SILVA et al., 2001; MACIEL et al., 2003). Com o intuito de verificar se a suplementação com DD poderia aumentar os níveis de selênio cerebral, tecido alvo do estudo, realizamos a quantificação nos grupos suplementados com a ração controle, ração comercial e a ração contendo 3 mg/Kg de DD. Os níveis de selênio foram cerca de 2 vezes maiores no grupo suplementado com 3 mg/Kg de DD quando comparado aos grupos controle e comercial. Esses dados indicam que como em roedores, o DD parece também atravessar facilmente a barreira hematoencefálica em peixes-zebra.

A hiperglicemia em peixe-zebra também pode ser induzida com a utilização de agentes que causam a destruição das células β -pancreáticas tais como o aloxano e a estreptozotocina (MOSS et al., 2009; SHIN et al., 2012). Contudo, o protocolo utilizado nos trabalhos da presente tese consistiu na imersão dos peixes durante 14 dias em uma solução 111 mM de glicose, o qual se baseia na facilidade que os peixes possuem para absorver moléculas presentes na água (MOYLE and CECH, 2000; GLEESON et al., 2007; CAPIOTTI et al., 2014a). A contínua exposição à solução de glicose aumentou cerca de 3,5 vezes os níveis de glicose sanguínea dos animais quando comparado aos normoglicêmicos. A suplementação com DD causou uma redução nesses níveis, resultados que apontam a potencialidade anti-hiperglicemiante da dieta assim como observado em roedores (BARBOSA et al., 2006, 2008). Na literatura, diversos estudos demonstram efeitos tipo insulina atribuídos a formas orgânicas e inorgânicas de selênio (GHOSE et al., 2001; AYAZ et al., 2004; HWANG et al., 2007).

A relação entre a hiperglicemia e desordens neuropsiquiátricas como a ansiedade vem sendo amplamente estudada. Diversos estudos vêm tentando elucidar os mecanismos envolvidos no desencadeamento dessas desordens em pacientes diabéticos (CLAVIJO et al., 2006; GAMBETA et al., 2016; VANCAMPFORT et al., 2015). Através dos testes do “novo-tanque”

e do “claro-escuro”, demonstramos pela primeira vez alterações comportamentais do tipo ansiedade provocadas pela hiperglicemia em peixe-zebra. No “tanque-novo”, a exposição à glicose diminuiu o tempo no topo, assim como o número de entradas no topo do aparato. Ambos os parâmetros estão diretamente relacionados a um comportamento tipo ansiedade (LEVIN et al., 2007; MAXIMINO et al., 2012). Já no teste “claro-escuro”, a exposição à glicose causou diminuição no tempo gasto na parte clara, diminuição no número de cruzamentos entre as duas partes e aumento no número de episódios do chamado comportamento de risco. Assim como observado no “tanque-novo”, todas as alterações provocadas pela exposição à glicose no “claro-escuro” também estão diretamente relacionadas com o comportamento tipo ansiedade (MAXIMINO et al., 2012). Estas alterações comportamentais foram prevenidas pela suplementação com DD, resultados que indicam o potencial ansiolítico frente ao comportamento tipo ansiedade induzido pela hiperglicemia.

Tanto o efeito hipoglicêmico, assim como o potencial ansiolítico do DD já foram previamente descritos em outros organismos modelo (BARBOSA et al., 2006; 2008; PRIGOL et al., 2011). No entanto, nenhum dos estudos encontrados identificou mecanismos moleculares/celulares associados a tais efeitos. Com este intuito, investigamos se o efeito neuroprotetor e hipoglicêmico observados, poderiam estar associados com a modulação de alvos específicos envolvidos na sinalização redox do tecido cerebral e com via de sinalização da insulina. Neste set de experimentos, avaliamos especificamente os níveis de expressão gênica, através do RT-qPCR, dos receptores de insulina: *Insra1*, *Insra2*, *Insrb1* e *Insrb2*, e também do transportador de glicose *GLUT3*. A condição hiperglicêmica dos animais causou uma diminuição na expressão de todas as isoformas dos receptores de insulina testados. Diferentemente, Capiotti et al. (2014) utilizando o mesmo modelo de hiperglicemia não observaram nenhuma alteração na expressão dos mesmos receptores. Como aqui, os autores também não observaram alterações na expressão do *GLUT3*. De especial importância, a suplementação com DD restaurou aos níveis basais a expressão de todos os receptores e aumentou *per se* a expressão do transportador *GLUT3* e dos receptores *Insra1* e *Insra2*. Esses dados, mostram pela primeira vez, a participação de componentes da via de sinalização da insulina nos efeitos mediados por DD, resposta que pode estar associada com ambas propriedades do composto: ação hipoglicemiante e neuroprotetora.

Tendo em vista a já estabelecida relação entre a hiperglicemia e o estresse oxidativo, avaliamos parâmetros de danos oxidativos e defesas antioxidantes nos cérebros dos animais expostos à glicose e suplementados com DD. Uma das principais consequências do estresse

oxidativo é a oxidação de biomoléculas como lipídeos e proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; YAO e RAHMAN, 2011). De acordo, aqui nós também encontramos uma associação da hiperglicemia com níveis aumentados de TBARS e de CP. Além disso, encontramos uma diminuição na atividade da enzima SOD, a qual promove a dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 , que é uma espécie menos reativa (BROWNLIE, 2001). Diferentemente da SOD, as atividades das enzimas GPx e GST e os níveis de tióis totais não foram alterados pela exposição à glicose, porém, foram aumentados nos peixes normoglicêmicos suplementados com DD. Embora não tenha alterado a atividade da GPx, a exposição à glicose diminui a expressão da enzima GPx3a, efeito que também foi prevenido por DD. A GPx é uma selenoenzima contendo selenocisteína no seu sítio ativo. Dessa forma, a modulação causada pelo DD na atividade e expressão da enzima pode estar diretamente relacionada com um maior conteúdo de Se disponível na célula. Intimamente relacionado com a regulação do ambiente redox, está a função do fator de transcrição Nrf2, que em nosso protocolo teve a expressão diminuída pela hiperglicemia e restaurada por DD. O Nrf2 é um importante fator de transcrição que responde a alterações no sistema redox, ativando vias que culminam com a síntese de enzimas antioxidantes como GPx, SOD e catalase (KOBAYASHI e YAMAMOTO, 2005). O aumento na atividade bem como na expressão dessas enzimas causado por DD pode então estar relacionado com a modulação desse fator de transcrição. Corroborando nossos achados, estudos recentes mostram que a ação antioxidante de organocalcogênios como ebselen e DD envolve em termos de mecanismos moleculares a ativação da via Keap1/Nrf2. Esses estudos sugerem que o DD pode interagir diretamente com a Keap1 causando a oxidação de resíduos de cisteína presentes na proteína, permitindo assim a translocação do Nrf2 até o núcleo e consequente ativação de enzimas antioxidantes (BARBOSA et al., 2017).

O conjunto de resultados desta tese nos permite inferir que o DD é um agente promissor para estudos translacionais em diabetes e suas complicações, e também identifica importantes alvos moleculares envolvidos nos efeitos protetores do composto. Enfatiza-se a possível ativação do fator de transcrição Nrf2 e potencial antioxidante da molécula, bem como a modulação de receptores de insulina com o potencial hipoglicêmico. Cabe salientar aqui que ambos mecanismos podem ainda contribuir de forma independente ou sinérgica, direta ou indiretamente para o efeito neuroprotetor do composto. Concomitantemente, nosso trabalho contribui para a consolidação do peixe-zebra como um organismo modelo para o estudo de doenças metabólicas, incluindo diabetes mellitus e suas complicações.

7 CONCLUSÕES

1. A suplementação crônica com DD não causou sinais de toxicidade nos animais.
2. A imersão em solução de glicose aumentou consideravelmente a glicemia dos animais e esse aumento foi atenuado pela consumo de dieta contendo DD.
3. O consumo da dieta contendo DD preveniu o aparecimento de comportamento tipo-ansiedade induzido por hiperglicemia.
4. A suplementação com DD foi efetiva em reduzir danos de cunho oxidativo no cérebro dos animais hiperglicêmicos.
5. O efeito hipoglicemiante, antioxidante e neuroprotetor do DD pode envolver alvos moleculares de vias de sinalização redox e da via de sinalização de insulina.

8 PERSPECTIVAS

Tendo concluído esse trabalho, pretendemos em estudos futuros:

1. Investigar o efeito da suplementação com DD sobre a expressão de outras alvos moleculares nas vias aqui estudadas.
2. Verificar o efeito da suplementação com DD nas complicações associadas com modelo de hiperglicemia associado ao diabetes tipo 1.
3. Avaliar os efeitos da dieta contendo DD sobre alterações em parâmetros de memória e cognição relacionados à hiperglicemia.

9 REFERÊNCIAS

- AHMED, R.G. The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. **Med J Islamic World Acad Sci**, v. 15, p. 31-42, 2005.
- ALVAREZ Y, CHEN K, REYNOLDS AL, WAGHORNE N, O'CONNOR JJ, KENNEDY BN. Predominant cone photoreceptor dysfunction in a hyperglycaemic model of non-proliferative diabetic retinopathy. **Dis Model Mech**, v. 3, p. 236–245, 2010.
- ARTOLA A, KAMAL A, RAMAKERS GMJ, GARDONI F, DI LUCA M, BIESSELS GJ, CATTABENI F, GISPEN WH. Synaptic plasticity in the diabetic brain: Advanced aging? **Prog Brain Res**, p. 305–314, 2002.
- AYAZ M, CAN B, OZDEMIR S AND TURAN B. Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations. **Biol Trace Elem Res**, v. 89, p. 215–226, 2002.
- BACH JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocr Rev**, v. 15, p. 516-542, 1994.
- BANDMANN O, BURTON EA. Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. **Neurobiol Dis**, p. 58–65, 2010.
- BARBAZUK WB, KORF I, KADAVI C, HEYEN J, TATE S, WUN E, BEDELL JA, MCPHERSON JD, JOHNSON SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Res**, p. 1351–1358, 2000.
- BARBOSA NB, ROCHA JB, ZENI G, EMANUELLI T, BEQUE MC, BRAGA AL. Effect of organic forms of selenium on delta-Aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 149, p. 243-253, 1998.
- BARBOSA NB, OLIVEIRA C, ARALDI D, FOLMER V, ROCHA JB, NOGUEIRA CW. Acute diphenyl diselenide treatment reduces hyperglycemia but does not change deltaaminolevulinatase dehydratase activity in alloxan-induced diabetes in rats. **Biol Pharm Bull**, v. 31, p. 2200-2204, 2008.
- BARBOSA NB, ROCHA JB, WONDRACEK DC, PEROTTONI J, ZENI G, NOGUEIRA CW. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chem Biol Interact**, v. 163, p. 230-238, 2006.
- BARBOSA NV, NOGUEIRA CW, NOGARA PA, DE BEM AF, ASCHNER M, ROCHA JBT. Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents. **Metallomics**, v. 9, p. 1703-1734, 2017.
- BASTA G, SCHMIDT AM, CATERINA R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovasc Res**, v. 63, p. 582-592, 2004.
- BEHNE D, KYRIAKOPOULOS A. Identification of type I iodothyronine 5'- deiodinase as a selenoenzyme. **Biochem Biophys Res Co**, v. 173, p. 1143 – 1149, 1990.

- BELLAMY L, CASAS J-P, HINGORANI AD, WILLIAMS D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 373, p.1773–1779, 2009.
- BEST JD, ALDERTON WK. Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. **Neuropsychiatr Dis Treat**, p. 567–576, 2008.
- BHATTACHARYA SK. Anxiogenic activity of centrally administered scorpion (*Mesobuthus tamulus*) venom in rats. **Toxicon**, v. 33, p. 1491-1499, 1995.
- BLASER RE, CHADWICK L, MCGINNIS GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res**, v. 208, p. 56-62, 2010.
- BLOCH-DAMTI A, BASHAN N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, p. 1553-1567, 2005.
- BLOOMGARDEN ZT. Cardiovascular disease in diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, p. 1260–1266.
- BORGES LP, BORGES VC, MORO AV, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW, ZENI G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, v. 210, p. 1-8, 2005.
- BRAGA AL, RUBIN MA, ROCHA JBT. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochem Res**, v. 27, p. 297-303, 2002.
- BRAGA AL, SILVEIRA CC, ZENI G, SEVERO WA, STEFANI HA. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J Chem Res**, v. 15, p. 206-207, 1996.
- BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813–820. 2001.
- BURNS JM, DONNELLY JE, ANDERSON HS, MAYO MS, SPENCER-GARDNER L, THOMAS G, CRONK BB, HADDAD Z, KLIMA D, HANSEN D, BROOKS WM. Peripheral insulin and brain structure in early Alzheimer disease. **Neurology**, v. 69, p. 1094–1104, 2007.
- CACHAT J, STEWART A, GROSSMAN L, GAIKWAD S, KADRI F, CHUNG KM, WU N, WONG K, ROY S, SUCIU C, GOODSPEED J, ELEGANTE M, BARTELS B, ELKHAYAT S, TIEN D, TAN J, DENMARK A, GILDER T, KYZAR E, DILEO J, FRANK K, CHANG K, UTTERBACK E, HART P, KALUEff AV. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nat Prot**, v. 5, p. 1786-1799, 2010.
- CAPIOTTI KM, ANTONIOLI R JR, KIST LW, BOGO MR, BONAN CD, DA SILVA RS. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 171, p. 58-65, 2014a.
- CAPIOTTI KM, DE MORAES DA, MENEZES FP, KIST LW, BOGO MR, DA SILVA RS. Hyperglycemia induces memory impairment linked to increased acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res**, v. 274, p. 319-325, 2014b.
- CAPIOTTI KM, FAZENDA L, NAZARIO LR, MENEZES FP, KIST LW, BOGO MR, DA SILVA RS, WYSE AT, BONAN CD. Arginine exposure alters ectonucleotidase activities and morphology of zebrafish larvae (*Danio rerio*). **Int J Dev Neurosci**, v. 31, p. 75–81, 2013

CHAKRABARTI S, FREEDMAN JE. Dipyridamole, cerebrovascular disease, and the vasculature. **Vascul Pharmacol**, 48, p. 143–149, 2008.

CHAMPAGNEA DL, HOEFNAGELS CCM, DE KLOET RE, RICHARDSONA MK. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. **Behav Brain Res**, v. 214, p. 332–342, 2010.

CHENG D, LIANG B, LI Y. Antihyperglycemic effect of Ginkgo biloba extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. **BioMed Res Int**, v. 2013, ID 162724, 2013.

CLAVIJO M, CARVALHO JJ, RIOS M, DE OLIVEIRA IR. Psychiatric disorders in patients with diabetes type 2 at medical care and training district of Rio branco-acre, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 64, p. 807–813, 2006.

COLE AR, ASTELL A, GREEN C, SUTHERLAND C. Molecular connexons between dementia and diabetes. **Neurosci Biobehav Rev**, p. 1046–1063, 2007.

COLLINS MM, CORCORAN P, PERRY IJ Anxiety and depression symptoms in patients with diabetes. **Diabet Med**, v. 26, p. 153–161, 2009.

COMASSETO JV. Vinylic selenides. **J Organ Chem**, v. 253, p. 131–181, 1983

CONNAUGHTON VP, BAKER C, FONDE L, GERARDI E, SLACK C. Alternate immersion in an external glucose solution differentially affects blood sugar values in older versus younger zebrafish adults. **Zebrafish**, v. 13, p. 87–94, 2016.

CRAFT S, CHOLERTON B, BAKER LD. Insulin and Alzheimer's disease: Untangling the web. **Adv Alzheimer's Dis**, p. 263–275, 2012.

CRAIG PM, MOON TW. Fasted Zebrafish Mimic Genetic and Physiological Responses in Mammals: A Model for Obesity and Diabetes? **Zebrafish**, p. 109–117, 2011.

DALLE-DONNE I, ALDINI G, CARINI M, COLOMBO R, ROSSI R, MILZANI A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J Cell Mol Med**, v. 10, p. 389–406, 2006.

DE ALMEIDA LM, LEITE MC, THOMAZI AP, BATTU C, NARDIN P, TORTORELLI LS, ZANOTTO C, POSSER T, et al. Resveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 480, p. 27–32, 2008

DIAS GR, DE ALMEIDA TM, SUDATI JH, DOBRACHINSKI F, PAVIN S, SOARES FA, NOGUEIRA CW, BARBOSA NB. Diphenyl diselenide supplemented diet reduces depressive-like behavior in hypothyroid female rats. **Physiol Behav**, v. 30, p. 116–122, 2014.

ECKER A, GONZAGA TK, SEEGER RL, SANTOS MM, LORETO JS, BOLIGON AA, MEINERZ DF, LUGOKENSKI TH, ROCHA JB, BARBOSA NV. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. **Biomed Pharmacother**, v. 89, p. 605–616, 2017.

EGAN, R.J., BERGNER, C.L., HART, P.C., CACHAT, J.M., CANAVELLO, P.R., ELEGANTE, M.F., ELKHAYAT, S.I., BARTELS, B.K., TIEN, A.K., TIEN, D.H., MOHNOT,

S., BEESON, E., GLASGOW, E., AMRI, H., ZUKOWSKA, Z., KALUEFF, A.V. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav Brain Res**, v. 205, p. 38-44, 2009.

ELO B, VILLANO CM, GOVORKO D, WHITE LA. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. **J Mol Endocrinol**. v. 38, p. 433-40, 2007.

EROL A. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 13, p. 241–253, 2008.

FARIA A, PERSAUD SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. **Pharmacol Ther**, v. 172 p. 50-62, 2017.

FARINA M, BRANDÃO R, LARA FS, SOARES FA, SOUZA DO, ROCHA JBT. Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and delta-aminolevulinate dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride. **Toxicology**, v. 184, p. 179-187, 2003.

FATURI CB, LEITE JR, ALVES PB, CANTON AC, TEIXEIRA-SILVA F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 605–609, 2010.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras**, v.43, p.1-16, 1997.

GAIKWAD S, STEWART A, HART P, WONG K, PIET V, CACHAT J, KALUEFF AV. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: the utility of fish models to study stressmemory interplay. **Behav Process**, v. 87, p. 224-230, 2011.

GAMBETA E, SOUZA CP, MORAIS H, ZANOVELI JM. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. **Metab Brain Dis**, v. 31, p. 563-71, 2016.

GASPARINI L, XU H. Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. **Trends Neurosci**, p. 404–406, 2003.

GHISLENI G, PORCIÚNCULA LO, CIMAROSTI H, ROCHA JBT, SALBEGO CG, GHOSE A, FLEMING J AND HARRISON PR. Selenium and signal transduction: roads to cell death and anti-tumor activity. **Biofactors**, v. 14, p. 127–133, 2001.

GLASER V1, MORITZ B, SCHMITZ A, DAFRÉ AL, NAZARI EM, RAUH MÜLLER YM, FEKSA L, STRALIOTTOA MR, DE BEM AF, FARINA M, DA ROCHA JB, LATINI A. Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity. **Chem Biol Interact**, v. 206, p. 18-26, 2013.

GLEESON M, CONNAUGHTON V, ARNESON LS. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. **Acta Diabetol**, v. 44, p. 157-163, 2007.

GOLDSMITH P. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. **Curr Opin Pharmacol**, p. 504–512, 2004.

GOLOMBIESKI RM¹, GRAICHEN DA, PIVETTA LA, NOGUEIRA CW, LORETO EL, ROCHA JB. Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] inhibits *Drosophila melanogaster* delta-aminolevulinatase (delta-ALA-D) gene transcription and enzyme activity. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 147, p. 142-204, 2008.

GOMAR A, HOSSEINI A, MIRAZI N. Preventive effect of *Rubus fruticosus* on learning and memory impairment in an experimental model of diabetic neuropathy in male rats. **Pharma Nutrition**, v. 2, p. 155-160.

GUO S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? **Genes Brain Behav**, v. 3, p. 63–74, 2004.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, U.K.: **Oxford University Press**, 1999.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem** v. 97, p. 1634-58, 2006.

HASANEIN P, FOLEHGARI Z, EMAMJOMEH A. Preventive effects of *Salvia officinalis* L. against learning memory deficit induced by diabetes in rats: Possible hypoglycemic and antioxidant mechanisms. **Neurosci Lett**, v. 622, p. 72-77.

HELMUT S, CARSTEN B, DEAN PJ. Oxidative stress. **Annual Reviews**, v. 86, p. 715-748, 2017.

HILBER P, PIERRE CHAPILLON P. Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. **Physiology & Behavior**, v. 86, p. 164-167, 2005.

HIRSHBERG B, RAZ I. Impact of the U.S. food and drug administration cardiovascular assessment requirements on the development of novel antidiabetes drugs. **Diabetes Care**, 2011.

HOLMGREN A. Thioredoxin. **Annu Rev Biochem**, v. 54, p. 237 – 271, 1985.

HOWE K, CLARK MD, TORROJA CF, TORRANCE J, BERTHELOT C, MUFFATO M, COLLINS JE, HUMPHRAY S, MCLAREN K, MATTHEWS L, MCLAREN S, SEALY I, CACCAMO M, CHURCHER C, SCOTT C, BARRETT JC, KOCH R. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498–503, 2013.

HUGHES, M.N. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, p. 263-272, 1999.

HWANG D, SEO S, KIM Y, KIM C, SHIM S, JEE S, et al. Selenium acts as an insulin-like molecule for the down-regulation of diabetic symptoms via endoplasmic reticulum stress and insulin signalling proteins in diabetes-induced non-obese diabetic mice. **J Biosci**, v. 32, p. 723–735, 2007

HYBERTSON BM, GAO B, BOSE SK, MCCORD JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Mol Asp Med**, v. 32, p. 234–246, 2011.

IBRAHIM M, MUSSULINI BH, MORO L, DE ASSIS AM, ROSEMBERG DB, DE OLIVEIRA DL, ROCHA JB, SCHWAB RS, SCHNEIDER PH, SOUZA DO, RICO EP. 15

Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 54, p. 187-194, 2014.

IDF. International Diabetes Federation. <http://www.idf.org/2015>

JACQUES-SILVA MC, NOGUEIRA CW, BROCH LC, FLORES EM, ROCHA JBT. Diphenyl diselenide and ascorbic changes deposition of selenium and ascorbic in liver and brain of mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 88, p. 119-125, 2001.

JAIN SK, LEVINE SN, DUETT J, HOLLIER B. Elevated lipis peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **Metabolism**, v. 39, p. 971-975, 1990.

JONES LJ, NORTON WHJ. Using zebrafish to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. **Behav Brain Res**, v. 276, p. 171-180, 2014.

JORGENS K, HILLEBRANDS J-L, HAMMES H-P, KROLL J. Zebrafish: A model for understanding diabetic complications. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 120, p. 186–187, 2012.

JÚNIOR HBP, BORGES LM, SOUSA LAD, CUNHA LC, JÚNIOR RS, MELO DFA, et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, p. 512-519, 2012.

KADE IJ, PAIXÃO MW, RODRIGUES OED, IBUKUNB EO, BRAGA AL, ZENI G, NOGUEIRA CW. Rocha J.B.T. Studies on the antioxidant effect and interaction of diphenyl diselenide and dicholesteroyl diselenide with hepatic delta-aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 14- 20, 2009.

KANAI F, ITO K, TODAKA M, HAYASHI H, KAMOHARA S, ISHII K, OKADA T, HAZEKI O, UI M, EBINA Y. Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 195, p. 762–768, 1993.

KANDA T, ENGMAN L, COTGREAVE IA, POWIS G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **J Org Chem**, v. 64, p. 8161- 8169, 1999.

KHAN, A.U., KOVACIC, D., KOLBANOVSKIY, A., DESAI, M., FRENKEL, K., GEACINTOV, N.E. The decomposition of peroxyxynitrite to nitroxyl anion (NO⁻) and singlet oxygen in aqueous solution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 2984- 2989, 2000.

KIM B, Feldman EL. Insulin resistance in the nervous system. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23: p. 133–141, 2012.

KOBAYASHI M, YAMAMOTO M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 385-394.

KOBAYASHI Y, OGRA Y, ISHIWATA K, TAKAYAMA H, AIMI N, SUZUKI KT. Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.**, v. 99, p. 15932–15936, 2002.

KODL CT, SEAQUIST ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. **Endocr Rev**, v. 29, p. 494–511, 2008.

KOH GC, PEACOCK SJ, VAN DER POLL T, WIERSINGA WJ. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. **Eur Clin Microbiol Infect Dis**. v. 31, p.379–388, 2012

KÜHL C. Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 21 Suppl 2:B19–B26, 1998.

LEE IM, SHIROMA EJ, LOBELO F, PUSKA P, BLAIR SN, KATZMARZYK PT. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **Lancet Physical Activity Series Working G**, v. 380, p. 219–229, 2012.

LEE J-G, KANG DG, YU JR, KIM Y, KIM J, KOH G, LEE D. Changes in Adenosine Deaminase Activity in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Effect of DPP-4 Inhibitor Treatment on ADA Activity. **Diabetes Metab J**, v. 35, p. 149–158, 2011.

LEVANDER, O.A. & BURK, R.F. 1994. Selenium. In: SHILS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M. Modern nutrition in health and disease. **Philadelphia: Lea and Febiger**, p. 242- 251, 1994.

LEVIN ED, BENCAN Z, CERUTTI DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiol Behav**, v. 90, p. 54-58, 2007.

LIESCHKE GJ, CURRIE PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat Rev Genet**, v. 8, p. 353–367, 2007.

LUCHESI C, BRANDAO R, OLIVEIRA R, NOGUEIRA CW, SANTOS FW. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicol Lett**, v. 173, p. 181-190, 2007.

MACIEL EN, FLORES EM, ROCHA JBT Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney and brain of mice. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 70, p. 470-476, 2003.

MAGESH S, CHEN Y, HU L. Small molecule modulators of Keap1–Nrf2–ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. **Med Res Rev**, v. 32, p. 687–726, 2012.

MARTIN JL, GERLACK ML. Selenium metabolism in animals. **Ann NY Acad Sci**, v. 192, p. 193 – 199, 1972.

MAXIMINO C, BENZECRY R, OLIVEIRA KRM, BATISTA EJO, HERCULANO AM, ROSEMBERG DB, OLIVEIRA DL, BLASER R. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, p. 1099-123, 2012.

MAXIMINO C, DE BRITO TM, COLMANETTI R, PONTES AA, DE CASTRO HM, DE LACERDA RI, MORATO S, GOUVEIA A JR. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behav Brain Res**, v. 210, p. 1-7, 2010a.

MAXIMINO C, DE BRITO TM, DA SILVA BATISTA AW, HERCULANO AM, MORATO S, GOUVEIA A JR. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behav Brain Res**, v. 214, p. 157-171, 2010b.

MCGARRY JD. Banting Lecture 2001: Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 7–18, 2002.

MENEZES C, LEITEMPERGER J, SANTI A, DIAS G, PEDRON FA, NETO JR, SALMAN SM, BARBOSA NV, LORO VL. Evaluation of the effects induced by dietary diphenyl diselenide on common carp *Cyprinus carpio*. **Fish Physiol Biochem**, v. 40, p. 141-149, 2014.

MENEZES C, MARINS A, MURUSSI C, PRETTO A, LEITEMPERGER J, LORO VL. Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver catfish. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 231-237, 2016.

MENEZES C, RUIZ-JARABO I, MARTOS-SITCHA JA, LEITEMPERGER J, BALDISSEROTTO B, MANCERA JM, ROSEMBERG DB, LORO VL. Diet with Diphenyl Diselenide Mitigates Quinclorac Toxicity in Silver Catfish (*Rhamdia quelen*). **Plos One**, v. 9, p. e114233, 2014.

MEOTTI FC, STANGHERLIN EC, ZENI G, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environm Res**, v. 94, p. 276-282, 2004.

MINAZ N, RAZDAN R, HAMMOCK B, GOSWAMI SK. An inhibitor of soluble epoxide hydrolase ameliorates diabetes-induced learning and memory impairment in rats. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, V. 136, p. 84-89.

MOLLER IM, ROGOWSKA-WRZESINSKA A, RAO RS. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. **J Proteomics**, v. 74, p. 2228–2242, 2011.

MOSS JB, KOUSTUBHAN P, GREENMAN M, PARSONS MJ, WALTER I, MOSS LG. Regeneration of the pancreas in adult zebrafish. **Diabetes**, v. 58, p. 1844-1851, 2009.

MOYLE P, CECH J. Fishes: An Introduction to Ichthyology. **Prentice Hall**, Upper Saddle River, USA, 2000.

NAVARRO-ALARCÓN ME, LOPES-MARTINEZ MC. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci Tot Environ**, v. 249, p. 347-371, 2000.

NOGUEIRA CW, BORGES VC, ZENI G, ROCHA JBT. Organochalcogens effects on daminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, v. 191, p. 169-178, 2003b.

NOGUEIRA CW, QUINHONES EB, JUNG EAC, ZENI G, ROCHA JBT. Antiinflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm Res**, v. 52, p. 56– 63, 2003a.

NOGUEIRA CW, ZENI G, ROCHA JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, v. 104, p. 6255–6286, 2004.

OKA T, NISHIMURA Y, ZANG L, HIRANO M, SHIMADA Y, WANG Z, UMEMOTO N, KUROYANAGI J, NISHIMURA N, TANAKA T. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC Physiol**, v. 10, p. 21, 2010.

PAULMIER C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, First ed. **Pergamon Press**, Oxford, England, p. 25-51, 1986.

PIATO AL, ROSEMBERG DB, CAPIOTTI KM, SIEBEL AM, HERRMANN AP, GHISLENI G, VIANNA MR, BOGO MR, LARA DR, BONAN CD. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochem Res**, v. 36, p. 1876–1886, 2011.

PORTE D, BASKIN DG, SCHWARTZ MW. *Perspectives in Diabetes*. p. 54, 2005.

PRIGOL M, LUCHESE C, NOGUEIRA CW. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, p. 216-222, 2009.

PRIGOL M, LUCHESE C, PINTON S, FERREIRA M, SANTOS JPA, KARKOW AK, et al. Diphenyl diselenide induces anxiolytic-like and sedative effects on the chick social separation-stress behavior. **Neurosci Lett**, v. 495, p. 140-3, 2011.

RAVASSA S, BEAUMONT J, HUERTA A, BARBA J, COMA-CANELLA I, GONZÁLEZ A, LÓPEZ B, DÍEZ J. Association of low GLP-1 with oxidative stress is related to cardiac disease and outcome in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. **Free Radic Biol Med**, v. 81, p. 1-12, 2015.

REAGAN LP. Diabetes as a chronic metabolic stressor: Causes, consequences and clinical complications. **Exp Neurol**, v. 233, p. 68–78, 2012.

REDDI AS, BOLLINENI JS. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta 1 in normal and diabetic rats. **Kidney Int**, v. 59, p. 1342-1353, 2001.

RICHARDSON SJ, MORGAN NG, FOULIS AK. Pancreatic pathology in type 1 diabetes mellitus. **Endocr Pathol. Humana Press Inc**, p. 80–92, 2014.

RINKWITZ S, MOURRAIN P, BECKER TS. Zebrafish: An integrative system for neurogenomics and neurosciences. **Prog Neurobiol**, p. 231–243, 2011.

ROCHETTE L, ZELLER M, COTTIN Y, VERGELY C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, p. 2709-2729, 2014.

ROMAN M, JITARU P, BARBANTE C. Selenium biochemistry and its role for human health. **Metallomics**, v. 6, p. 25-54, 2014.

ROSEMBERG DB, RICO EP, MUSSULINI BHM, PIATO AL, CALCAGNOTTO ME, BONAN CD, DIAS RD, BLASER RE, SOUZA DO, OLIVEIRA DL. Differences in spatiotemporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS ONE**, v. 6, e19397, 2011.

ROSSATO JI, KETZER LA, CENTURIÃO FB, SILVA SJ, LÜDTKE DS, ZENI G, BRAGA AL, RUBIN MA, ROCHA JB. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochem Res**, v. 27, p. 297–303, 2002.

ROSSATO JI, KETZER LA, CENTURIÃO FB, SILVA SJN, LUDTKE DS, ZENI G, SALKOVIC-PETRISIC M, HOYER S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic

Alzheimer-like pathology: An experimental approach. **J Neural Transm Suppl**, p. 217–233, 2007.

SALTIEL AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799–806, 2001.

SANTOS FW, ORO T, ZENI G, ROCHA JBT, NASCIMENTO PC, NOGUEIRA CW. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol Lett**, v. 152, p. 255-263, 2004.

SAVEGNAGO L, PINTO LG, JESSE CR, ALVES D, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW, ZENI G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidence for the mechanism of action. **Eur J Pharmacol**, v. 555, p. 129–138, 2007.

SAVEGNAGO L, PINTO LG, JESSE CR, BARANCELLI DA, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW, ZENI G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacol Biochem Be**, v. 88, p. 418-426, 2008.

SAVEGNAGO L, TREVISAN M, ALVES D, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW, ZENI G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 21, p. 86–92, 2006.

SCHULINGKAMP R, PAGANO T, HUNG D, RAFFA R. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, p. 855–872, 2000.

SCHWARTZ EA, KOSKA J, MULLIN MP, SYOUFI I, SCHWENKE DC, REAVEN PD. Exenatide suppresses postprandial elevations in lipids and lipoproteins in individuals with impaired glucose tolerance and recent onset type 2 diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 212, p. 217–222, 2010.

SCHWARTZ, K., FOLTSZ, P.J. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J Am Chem Soc**, v. 79, p. 200 – 214, 1957.

SESTI G. Pathophysiology of insulin resistance. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, p. 665–679, 2006.

SHIN E, HONG BN, KANG TH. An optimal establishment of an acute hyperglycemia zebrafish model. **Afr J Pharm Pharmacol**, v. 6, p. 2922-2928, 2012.

SHIN JT, FISHMAN MC. From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, v. 3, p. 311–340, 2002.

SHIOBARA Y, SHIOBARA T, YOSHIDA A, SUZUKI KT. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood and urine. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 152, p. 309-314, 1998.

SIEBEL AM, RICO EP, CAPIOTTI KM, PIATO AL, CUSINATO CT, FRANCO TMA, BOGO MR, BONAN CD. In vitro effects of antiepileptic drugs on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Toxicol Vitr**, v. 24, p. 1279–1284, 2010.

SMITH SR, BAI F, CHARBONNEAU C, JANDEROVÁ L, ARGYROPOULOS G. A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. **Diabetes**, v. 52, p. 1611–1618, 2003.

SOUZA DO. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Research**, v. 986, p. 196-199, 2003.

SPALLHOLZ JE, SHRIVER JE, REID TW. Dimethyldiselenide and methylselenide acid generates superoxide in an in vitro chemiluminescence assay in the presence of glutathione: implications for the anticarcinogenic activity of l-selenomethionine and L-Se-methylselenocysteine. **Nutr Cancer**, v. 40, p. 34-41, 2001.

SPENCE R, GERLACH G, LAWRENCE C, SMITH C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biol Rev**, p. 13–34, 2008.

STADTMAN, T.C. Selenium-dependent enzymes. **Annu Rev Biochem**, v. 49, p. 93 – 110, 1980.

STEWART A, GAIKWAD S, KYZAR E, GREEN J, ROTH A, KALUEFF AV. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 135-143, 2012.

STEWART AM, BRAUBACH O, SPITSBERGEN J, GERLAI R, KALUEFF A V. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends Neurosci**, p. 264–278, 2014

SUZUKI KT, DOI C, SUZUKI N. Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 217, p. 185-195, 2006.

SUZUKI KT, TSUJI Y, SUZUKI, N. Preferential organ distribution of methylselenol source Se-methylselenocysteine relative to methylseleninic acid. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 227, p. 76–83, 2008.

SZABLEWSKI L. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Int Immunopharmacol*. **Elsevier B.V**, v. 22, p. 182–191, 2014.

TANIGUCHI CM, EMANUELLI B, KAHN CR. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin 258 action. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, p. 85-96, 2006.

TONOLI C, HEYMAN E, ROELANDS B, PATTYN N, BUYSE L, PIACENTINI MF, BERTHOIN S, MEEUSEN R. Type 1 diabetes-associated cognitive decline: A meta-analysis and update of the current literature. **J Diabetes**, v. 6, p. 499–513, 2014.

TOYOSHIMA Y, MONSON C, DUAN C, WU Y, GAO C, YAKAR S, SADLER KC, LEROITH D. The role of insulin receptor signaling in zebrafish embryogenesis. **Endocrinology**, v. 149, p. 5996-6005, 2008.

- TYREE SM, MUNN RGK, MCNAUGHTON N. Anxiolytic-like effects of leptin on fixed interval responding. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 148, p. 15–20, 2016.
- URSINI F, BINDOLI A. The role of selenium peroxidase s in the protection against oxidative damage of membranes. **Chem Phys Lipids**, v. 44, p. 255-276, 1982.
- VALENTINE JL, KANG HK, SPIVEY GH. Selenium levels in human blood, urine and hair in response to exposure via drinking water. **Environ Res**, v. 17p. 347 – 355, 1978.
- VANCAMPFORT D, MITCHELL AJ, DE HERT M, SIENAERT P, PROBST M, BUYS R, et al. Type 2 Diabetes in patients with major depressive disorder: a meta-analysis of prevalence estimates and predictors. **Depress Anxiety**, v. 32, p. 763-73, 2015.
- VEERASWAMY S, VIJAYAM B, GUPTA VK, KAPUR A. Gestational diabetes: The public health relevance and approach. **Diabetes Res Clin Pract**, p. 350–358, 2012.
- WANG J, SUN P, BAO Y, DOU B, SONG D, LI Y. Vitamin E renders protection to PC12 cells against oxidative damage and apoptosis induced by single-walled carbon nanotubes. **Toxicol in Vitro**, v. 26, p. 32–41, 2012.
- WATSON GS, CRAFT S. Modulation of memory by insulin and glucose: Neuropsychological observations in Alzheimer’s disease. **Eur. J. Pharmacol**, p. 97–113, 2004.
- WESTERBLAD, H., ALLEN, D.G. 2011. Emerging roles of ROS/RNS in muscle function and fatigue. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, p. 2487-2499, 2011.
- WILBER CG. Toxicology of selenium: a review. **Clin Toxicol**, v. 17, p. 171 – 230, 1980.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/, 2012.
- WRIGHT JR, SCISM-BACON JL, GLASS LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. **Int J Clin Pract**, v. 60, p. 308–314, 2006.
- XIN W, LING T, CHUN XH. Redox-regulating role of insulin: The essence of insulin effect. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 349, p. 111–127, 2012.
- YALFANI, M.S., CONTRERAS, S., MEDINA, F., SUEIRAS, J.E. 2011. Hydrogen substitutes for the in situ generation of H₂O₂: an application in the Fenton reaction. **J Hazard Mater**, v. 192, p. 340-346, 2011.
- YAO H, RAHMAN I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 254, p. 72–85, 2011.