



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**Efeito inibitório do Ebselen, do Disseleneto de Difenila  
e do Ditelureto de Difenila sobre a atividade da LDH de  
mamíferos.**

---

**Thiago Henrique Lugokenski**

Santa Maria. RS, Brasil  
2009

**Efeito inibitório do Ebselen, do Disseleneto de Difenila  
e do Ditelureto de Difenila sobre a atividade da LDH de  
mamíferos**

**por**

---

**Thiago Henrique Lugokenski**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação  
de Mestrado

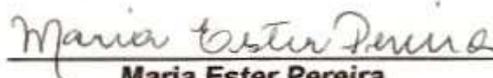
**Efeito inibitório do Ebselen, do Disseleneto de Difenila e do  
Ditelureto de Difenila sobre a atividade da LDH de  
mamíferos**

Elaborada por

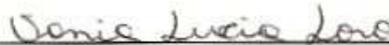
**Thiago Henrique Lugokenski**

como requisito parcial para a obtenção de grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

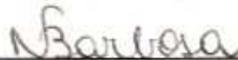
**COMISSÃO ORGANIZADORA:**



**Maria Ester Pereira**  
(Presidente/ Orientador)  
(UFSM)



**Vânia Lucia Loro**  
(UFSM)



**Nilda B. Vargas Barbosa**  
(UFSM)

Santa Maria, 09 de fevereiro de 2009.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda minha família por todo apoio que sempre tive. A minha mãe Vera, ao meu pai Mario e meu irmão Mario Filho os meus mais sinceros agradecimentos por tudo que me ensinaram, por todo amor, respeito e companheirismo. Por sempre acreditarem em mim e me incentivarem na busca de meus objetivos.

Agradeço a Carol por estar sempre do meu lado de forma incondicional, por todo amor e carinho.

Ao professor João meus agradecimentos e admiração. A minha orientadora professora Ester agradeço por toda ajuda, paciência e cooperação.

Ao professor Gilson, a professora Cristina e ao professor Félix por toda ajuda, pela paciência e incentivo.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica que contribuíram de alguma forma para minha formação.

A todos os colegas e amigos do laboratório do professor João: Daniel, Robson, Rafael, Alessandro, Mateus, Alessandra, Romaiana, Jéssie, Danúbia, Cássia, Sally e Cris agradeço pelo companheirismo e por compartilharem seus conhecimentos. Aos que já seguiram outros rumos além de agradecimentos, saudades. E também aos colegas do laboratório do professor Félix: Rômulo, Portella, Gustavo, Priscila, Dirleise, Aline, Nelson, Guilherme, Jéssica, Edovando, Fernando, Luiza e Daia por sua amizade e companheirismo.

Aos colegas do laboratório da professora Cristina e do professor Gilson.

Aos funcionários, Angélica, pelo atendimento e auxílio sempre prestados com boa vontade e simpatia e ao Rinaldo por cuidar dos nossos animais;

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **Efeito inibitório do Ebselen, do Disseleneto de Difenila e do Ditelureto de Difenila sobre a atividade da LDH de mamíferos**

AUTOR: Thiago Henrique Lugokenski  
ORIENTADORA: Maria Ester Pereira  
CO-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

O Ebselen é um composto de selênio o qual tem suas propriedades antioxidantes atribuídas à sua atividade mimética da tioredoxina e tiol-peroxidase: ele decompõe peróxidos à custa de tióis reduzidos. Contudo, a oxidação excessiva de tióis pode ser potencialmente tóxica quando não esta associada com a degradação de peróxidos. Assim, este trabalho investiga se a LDH pode ser um possível alvo à toxicidade do ebselen, em comparação com o disseleneto de difenila e o ditelureto de difenila, dois organocalcogênios antioxidantes que podem facilmente interagir com grupos tiol. A inibição da LDH foi testada em homogeneizados de fígado e coração de ratos, e em LDH purificada de músculo de coelhos. O Ebselen foi o mais potente inibidor da LDH. O seu efeito inibitório máximo foi obtido com 2  $\mu\text{M}$  para a LDH purificada e 20  $\mu\text{M}$  para a LDH de homogeneizados de fígado e coração de ratos. Além disso, o disseleneto de difenila, seguido do ditelureto de difenila, também apresentaram efeito inibitório significativo sobre a atividade da LDH. Em adição, observou-se que o DTT foi capaz de reverter a inibição da LDH induzida pelos compostos testados, confirmando o envolvimento de grupos tiol essenciais da LDH no processo de inibição pelos organocalcogênios. Em conclusão, estes resultados mostram que a LDH de fígado e coração pode ser um possível alvo para a toxicologia de organocalcogênios a doses

relativamente baixas. Nossos resultados também indicam que o uso da LDH como um marcador de viabilidade celular pode ser mascarada por um efeito inibitório direto do ebselen, ou outros calcogênios, sobre a LDH, resultando em uma falsa proteção em um sistema *in vitro*.

**Palavras-chaves: Organocalcogênios, Lactato desidrogenase, Reagentes Ligantes de Grupamentos Sulfidril, Selênio, Telúrio.**

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Inhibitory effect of ebselen, diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride on LDH activity from mammals**

AUTHOR: Thiago Henrique Lugokenski  
ADVISOR: Maria Ester Pereira  
CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

Ebselen is a seleno compound whose antioxidant properties have been attributed to its thiol-peroxidase and thioredoxin-like activity: it decomposes peroxides at the expense of reduced thiols. However, the excessive oxidation of thiols can be potentially toxic when it is not associated with peroxides degradation. Thus, this work investigated if LDH can be a possible *in vitro* target to toxicity of ebselen in comparison with diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride, two antioxidant organochalcogens that can easily interact with thiol in exchange reaction. LDH inhibition was tested in homogenates from rat liver and heart, and in purified LDH from rabbit muscle. Ebselen was the most potent inhibitor of LDH. A maximal inhibitory effect was obtained at 2  $\mu\text{M}$  to LDH purified and at 20  $\mu\text{M}$  to LDH from heart and liver homogenates. Moreover, diphenyl diselenide followed by diphenyl ditelluride also presented a significant inhibitory effect on LDH activity. In addition, we observe that DTT was able to revert the inhibition of LDH induced by all compounds tested, confirming the involvement of essential thiol groups on LDH inhibition by organochalcogens. In conclusion, our results show that liver and heart LDH may be a possible target for toxicity of organochalcogens at relative low concentrations. However, the protection afforded by substrates may hide this potential molecular target of

organochalcogenides. Our results also indicate that the use of LDH as a marker of cell viability may be biased by a direct inhibitory effect of ebselen or other chalcogenides on LDH, resulting in false protection in *in vitro* system.

**Keywords:** Organochalcogens, Lactate dehydrogenase, Sulfhydryl-binding reagents, Selenium, Tellurium.

# LISTA DE FIGURAS E TABELAS

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1.</b> Diagrama do sítio de ligação da LDH ligada ao NADH e ao piruvato.....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Ilustração dos elementos essenciais à hipótese da lançadeira de lactato intracelular.....	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Ilustração da lançadeira de lactato peroxissomal.....	<b>9</b>
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do disseleneto de difenila.....	<b>11</b>
<b>Figura 5.</b> Esquema da atividade mimética da glutatona peroxidase por compostos orgânicos de selênio.....	<b>12</b>
<b>Figura 6.</b> Possível mecanismo de interação de organodisselenetos com tióis protéicos.....	<b>13</b>
<b>Figura 7.</b> Estrutura química do ebselen.....	<b>14</b>
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do ditelureto de difenila.....	<b>16</b>

## RESULTADOS

<b>Figure 1.</b> Compounds structures.....	<b>31</b>
<b>Figure 2.</b> Inhibitory effect of diphenyl diselenide ((PhSe) <sub>2</sub> ), diphenyl ditelluride ((PhTe) <sub>2</sub> ) and ebselen on purified LDH activity from rabbit muscle..	<b>32</b>
<b>Figure 3.</b> Inhibitory effect of diphenyl diselenide ((PhSe) <sub>2</sub> ), diphenylditelluride ((PhTe) <sub>2</sub> ) and ebselen on LDH from rat heart homogenized.....	<b>34</b>
<b>Figure 4.</b> Inhibitory effect of diphenyl diselenide ((PhSe) <sub>2</sub> ), diphenyl ditelluride ((PhTe) <sub>2</sub> ) and ebselen on LDH from rat liver homogenized.....	<b>36</b>

**Figure 5** Inhibitory effect of diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>) on piruvate→lactate reaction of purified LDH activity from rabbit muscle.....**38**

**Figure 6** Effect of DTT (1 mM) on diphenyl disselenide-induced LDH inhibition.....**38**

**Figura 7.** Effect of DTT (1 mM) on diphenyl ditelluride-induced LDH inhibition.....**40**

**Figure 8.** Effect of DTT (1 mM) on ebselen-induced LDH inhibition.....**42**

## LISTA DE ABREVIACÕES

(PhSe)<sub>2</sub> – Disseleneto de difenila

(PhTe)<sub>2</sub> – Ditelureto de difenila

δ-ALA-D – δ-Aminolevulinato desidratase

DTT – 1,4 Ditiotreitól

FADH<sub>2</sub> - Flavina adenina dinucleotídeo

GSH - Glutaciona

GPx – Glutaciona peroxidase

LDH – Lactato desidrogenase

MCT1 – Transportador monocarboxílico tipo 1

MCT2 – Transportador monocarboxílico tipo 2

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

PHGPx – Glutaciona peroxidase de hidroperóxidos lipídicos

Prx – Peroxirredoxina

Tpx – Tiol-peroxidase

Trx - Tiorredoxina

TrxR – Tiorredoxina Redutase

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>XI</b>
<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 Lactato desidrogenase.....	4
3.2 Organocalcogênios.....	9
3.3 Disseleneto de difenila.....	10
3.4 Ebselen.....	13
3.5 Ditelureto de difenila.....	14
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
4.1 MANUSCRITO:.....	18

Inhibitory effect of Ebselen, an antioxidant seleno compound, on LDH activity from mammals: A comparative study with diphenyl deselenide and diphenyl ditelluride

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo.

Os itens, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontradas no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO** desta dissertação.

## 1 - INTRODUÇÃO

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima regulatória que ocorre em vertebrados principalmente na sua forma tetramérica como cinco isoenzimas diferentes (M4, M3H, M2H2, MH3, e H4), as quais catalisam a redução de piruvato à lactato ou a oxidação de lactato à piruvato (Le Bras e cols, 1991; Vinals e cols, 1995). As duas subunidades diferentes (M e H) que compõem essa enzima favorecem reações distintas: a isoenzima M4 favorece a rápida redução de baixas concentrações de piruvato à lactato em músculo esquelético, e a isoenzima H4 tende a favorecer a rápida oxidação de lactato à piruvato em músculo cardíaco (Phillips e cols, 1981). Neste estudo serão avaliadas as atividades de enzimas de diferentes fontes, a purificada de músculo esquelético de coelhos, como um padrão de inibição enzimática livre de interferências, e a de homogeneizado de coração e fígado de ratos, as quais são caracterizadas por apresentarem principalmente as isoformas H e M, respectivamente (Phillips e cols., 1981).

Desidrogenases contendo zinco como um componente funcional no sítio ativo, tal como a LDH, podem ser inibidas por reagentes ligantes de grupamentos sulfidril, tal como p-cloromercuribenzoato (Zheng e cols., 2003). É bem conhecido que resíduos de cisteína são essenciais para a atividade da LDH, porém estudos mostram que o grupo sulfidril desses resíduos de cisteína não interage com o substrato (Abad-Zapatero e cols, 1987; Vinals e cols, 1995). Modificações nestes grupos por p-cloromercuribenzoato levam a inativação e mudanças conformacionais na LDH (Zheng e cols., 2003). Além disso, trabalhos indicam que a ligação do cofator (NAD[H]) pode induzir modificações estruturais sobre o sítio ativo e aumentar a acessibilidade aos

resíduos de cisteína, acelerando sua oxidação e, conseqüentemente, induzindo a perda da atividade enzimática (Pamp e cols, 2005).

Compostos orgânicos de selênio e telúrio têm sido extensivamente estudados devido a exibirem atividade antioxidante em uma variedade de modelos experimentais (Parnham & Graf, 1991; Mugesh e cols, 2000; Arteel e cols, 2001; Nogueira e cols, 2004; Puntel e cols, 2007). A capacidade antioxidante destes compostos, tal como o ebselen e o disseleneto de difenila, tem sido relacionada à sua atividade mimética da glutathione peroxidase (GPx) (Maiorino e cols, 1988; Jacquemin e cols, 1992; Galet e cols, 1994; Sies, 1993; 1995) e mais recentemente a sua atividade mimética da tioredoxina (Trx) (Zhao & Holmgren, 2002; Zhao e cols, 2002). Assim, para reduzir peróxidos, estes compostos precisam primeiro formar intermediários selenol/selenolato, os quais podem ser acoplados via redução da ligação Se-Se por diferentes tipos de tióis (Muller e cols, 1985; Engman e cols, 1994; Cotgreave e cols, 1992; Nogueira e cols, 2004). Recentemente, a atividade antioxidante do composto ebselen tem sido relacionada à formação do intermediário ebselen diseleneto (Zhao & Holmgren, 2002; Zhao e cols, 2002), o que pode indicar que sua atividade antioxidante possui mais similaridade com o diseleneto de difenila que com o ebselen cíclico.

Para o caso de compostos contendo telúrio, a química pode ser mais complexa, devido à extrema instabilidade/reactividade do intermediário telurol. A atividade antioxidante desses compostos tem sido vinculadas às mudanças no estado de oxidação do átomo de Te ( $\text{Te(II)} \leftrightarrow \text{Te(IV)}$ ) (Engman e cols, 1995; Nogueira e cols, 2004).

Embora a atividade tiol peroxidase (Tpx) ou peroxirredoxina (Prx) (Zhao & Holmgren, 2002; Zhao e cols, 2002) tenha significância biológica e terapêutica por modular artificialmente os níveis celulares de peróxidos, a oxidação excessiva de tióis por organocalcogênicos pode ser potencialmente tóxica aos organismos vivos (Nogueira e cols, 2003). Dessa maneira, a toxicologia de diorganiol diselenetos e diteluretos pode ser, ao menos em parte, vinculada a suas atividades tiol-oxidase (Farina e cols, 2003). De acordo com isso, trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que a exposição de roedores e insetos à altas doses de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e ditelureto de difenila (PhTe)<sub>2</sub>, leva a inativação da enzima δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) (Maciel e cols, 2000; Golombieski e cols, 2008) e da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase por oxidar grupos tióis enzimáticos essenciais, tanto em condições *in vitro* (Nogueira e cols, 2003) como *in vivo* (Prigol e cols, 2007).

## **2 - Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral:**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar se a enzima lactato desidrogenase pode ser considerada um alvo molecular toxicológico da atividade tiol-oxidase dos compostos ebselen, (PhSe)<sub>2</sub> e (PhTe)<sub>2</sub>.

### **2.2 Objetivos específicos:**

1 – Determinar, se o ebselen, o (PhSe)<sub>2</sub> e o (PhTe)<sub>2</sub> apresentam seletividade em inibir as diferentes isoformas de LDH *in vitro*;

2 – Determinar se os organocalcogênios testados apresentam diferença inibitória nas diferentes reações catalisadas pela LDH (lactato → piruvato ou piruvato → lactato);

3 – Determinar se a presença do substrato ou do cofator interferem na ação inibitória dos organocalcogênios sobre a atividade da LDH;

4 – Determinar o possível envolvimento da oxidação de grupos tióis enzimáticos no processo inibitório da LDH pelos organocalcogênios, pela adição do agente redutor ditioneitol (DTT).

5 – Avaliar a atividade inibitória dos organocalcogênios sobre a atividade da LDH em um meio livre de interferências, utilizando LDH purificada.

### **3 Revisão Bibliográfica**

#### **3.1 Lactato desidrogenase**

A lactato desidrogenase é uma enzima regulatória que ocorre em tecidos de vertebrados principalmente sob a forma de cinco isoenzimas (M4, M3H, M2H2, MH3 e H4) que catalisam a redução de piruvato à lactato ou a oxidação de lactato à piruvato (Le Bras e cols, 1991; Vinals e cols, 1995). As duas diferentes subunidades (M e H) favorecem reações distintas: a isoenzima M4 favorece a rápida redução de baixas concentrações de piruvato à lactato em músculo esquelético, e a isoenzima H4 tende a favorecer a rápida oxidação de lactato à piruvato em músculo cardíaco (Phillips e cols, 1981). Embora um terceiro tipo de subunidade seja conhecido (tipo X) em vertebrados, esta

subunidade está presente em somente um, ou no máximo poucos tecidos (Goldberg, 1963; Shaklee e cols, 1973).

A LDH tem dois domínios principais: o domínio de ligação da coenzima (NAD<sup>+</sup> ou NADH) e o domínio de ligação do substrato (piruvato ou lactato) (Le Bras e cols, 1991). A figura 1 ilustra ambos os sítios da LDH ligados à NADH e piruvato, mostrando pontes de hidrogênio entre o substrato e resíduos enzimáticos chave. Brevemente, o evento catalítico da LDH envolve a transferência de um hidrido do carbono C4 do NADH do lado *pro-R* do anel nicotinamida reduzido para o carbono C2 do piruvato e transferência de um grupo imidazol do resíduo His-195 para o cetoxigênio do piruvato (Gullota e cols., 2002).

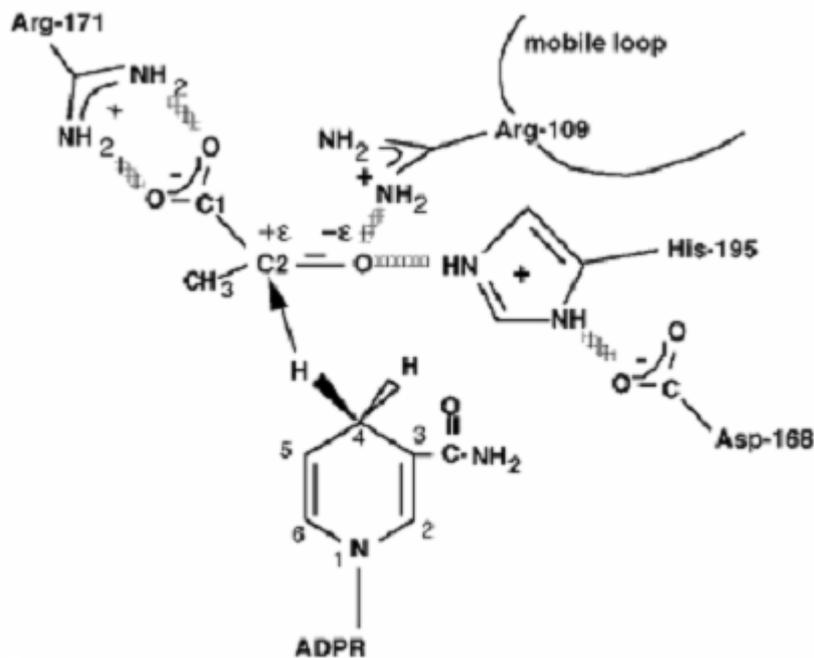


Figura 1 – Diagrama do sítio de ligação da LDH ligada ao NADH e ao piruvato (Gullota e cols., 2002)

A LDH é uma desidrogenase contendo zinco como um componente do sítio ativo, e pode ser inibida por reagentes ligantes de grupos sulfidril, tal como p-cloromercuribenzoato (Zheng e cols, 2003). É bem conhecido que resíduos de cisteína são essenciais para a atividade da LDH, porém estudos mostram que o grupo sulfidril de cisteínas não se liga ao substrato (Abad-Zapatero e cols, 1987). Modificações desses grupos sulfidril por p-cloromercuribenzoato levam a inativação e mudanças conformacionais da enzima (Zheng e cols, 2003). Além disso, dados da literatura indicam que a ligação de NAD(H) pode induzir modificações estruturais no sítio ativo da LDH que facilitam o acesso aos resíduos de cisteína, acelerando sua oxidação e, conseqüentemente, induzindo a perda da atividade da enzima (Pamp e cols, 2005).

Trabalhos recentes têm mostrado novas funções regulatórias da LDH no metabolismo, em especial a hipótese de uma lançadeira de lactato de célula para célula, que foi inicialmente proposta por Brooks (1985). Desde sua introdução, uma série de trabalhos têm suportado essa hipótese em uma variedade de modelos experimentais (Pellerin & Magistretti, 1994, 2003; Brooks, 1998, 2000, 2000a, 2000b; Magistretti & Pellerin, 1999; Magistretti e cols., 1999; Bouzier-Sore e cols., 2002; Pellerin, 2003; Gladden 2005). Eles propõem que a formação de lactato e sua subseqüente distribuição através do corpo é um mecanismo maior, pelo qual a coordenação do metabolismo intermediário nos diferentes tecidos e células dentro desses tecidos, podem ser acoplada (Gladden, 2005).

Além disso, trabalhos interessantes têm proposto uma lançadeira de lactato intracelular (figura 2), que foi proposto inicialmente por Brooks (1998). Essa hipótese se baseia no fato que o ácido láctico é produto da glicólise,

particularmente durante períodos de taxa metabólica alta, devido a alta  $V_{max}$  da LDH e a  $K_{eq}$  para a reação piruvato - lactato ser maior que para a reação inversa (Brooks, 1998, 2000). Algumas evidências de elementos chave da bomba de lactato intracelular têm sido obtidas (Brooks e cols 1999 a,b) e incluem: (1) a captação direta e oxidação de lactato por mitocôndrias isoladas sem conversão prévia de lactato à piruvato extracelular; (2) presença de um “pool” intramitocondrial de LDH; (3) presença de transportadores de lactato, MCT1, na mitocôndria.

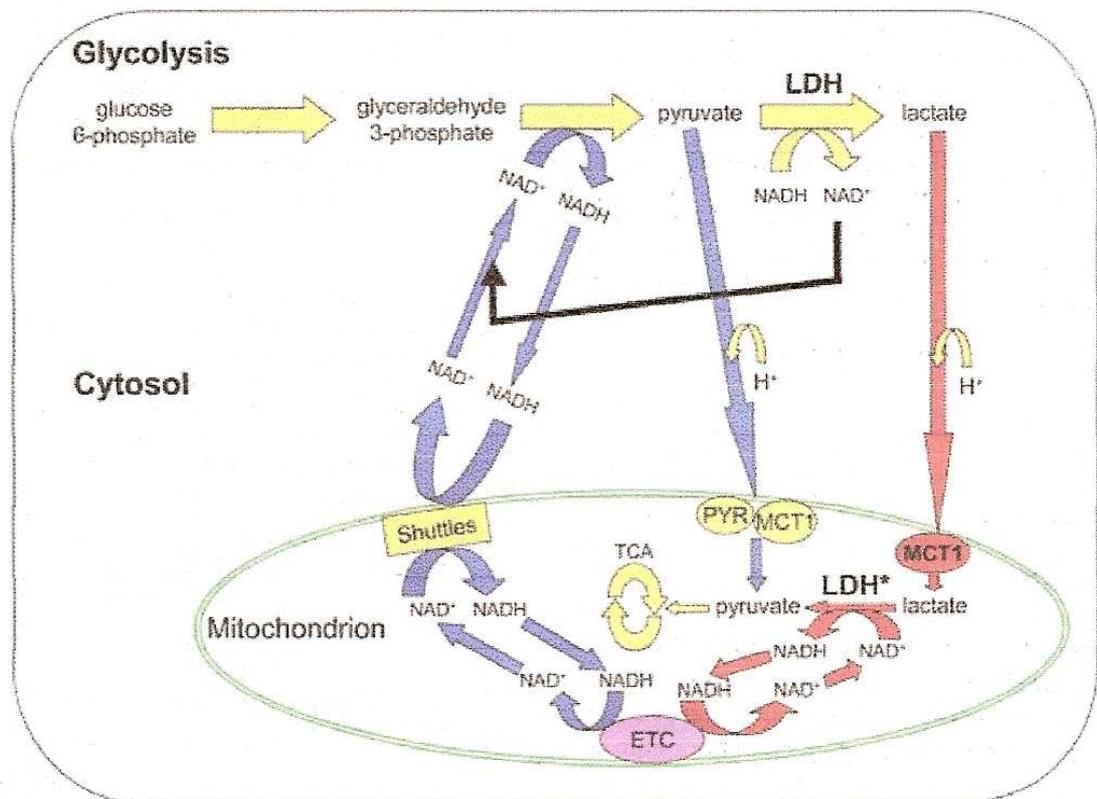


Figura 2 – Ilustração dos elementos essenciais à hipótese da lançadeira de lactato intracelular (Gladden, 2001).

Além disso, outras lançadeiras de lactato intracelular têm sido propostas, tal como a lançadeira de lactato peroxissomal, ilustrada na figura 3. Brevemente, a principal função do peroxissoma é o encurtamento de ácidos

graxos de cadeia muito longa na  $\beta$ -oxidação, em preparação para a subsequente oxidação na mitocôndria (Salway, 1999). Porém, para a  $\beta$ -oxidação continuar, ambos  $\text{FADH}_2$  e  $\text{NADH}$  precisam ser reoxidados. O  $\text{FADH}_2$  que é formado nesse processo é reoxidado por uma transferência direta de elétrons para o  $\text{O}_2$  (Mathews, 2000).

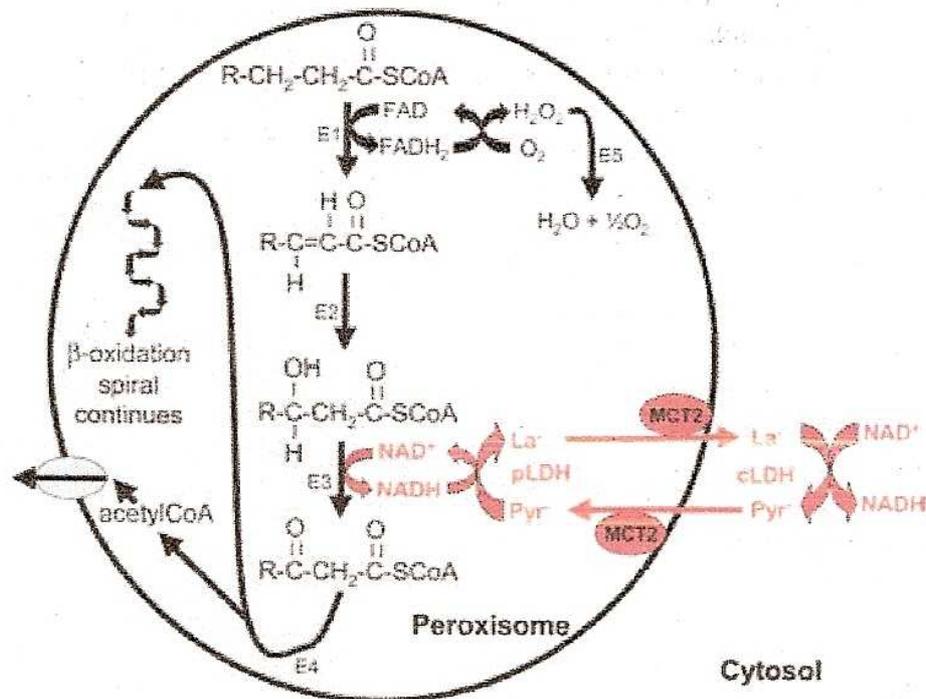


Figura 3 – Ilustração da cadeia de lactato peroxissomal (Waagepetersen e cols., 2000)

Contudo, o mecanismo de reoxidação do  $\text{NADH}$  tem sido ainda estudado. McGroarty (1974) foi o primeiro a sugerir a associação da LDH com peroxissomas de fígado de ratos, mas sua metodologia não permitia uma conclusão firme. Contudo, duas outras descobertas trouxeram de volta à tona essa hipótese do envolvimento da LDH. A primeira delas mostra que a membrana peroxissomal de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* é impermeável a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  *in vivo* (Osmundsen, 1982), o que impossibilita a

hipótese recorrente na época, de que o NADH poderia estar sendo oxidado no citosol. Um segundo estudo mostrou que a adição de piruvato à peroxissomas isolados de fígado estimulou a  $\beta$ -oxidação de palmitoil-CoA *in vitro*, enquanto que a adição de LDH exógena não teve efeito (Osmundsen, 1982). A confirmação da lançadeira de lactato peroxissomal veio com um trabalho de Baumgart e cols. (1996), que demonstrou claramente a presença de LDH na matriz de peroxissomas de fígado de ratos. Estudos adicionais demonstraram o envolvimento direto de LDH peroxissomal na reoxidação de NADH produzido pela  $\beta$ -oxidação de palmitoil-CoA (McClelland e cols., 2003). McClelland e cols. (2003) reportou que as membranas peroxissomais contêm transportadores monocarboxílico dos tipos MCT1 e MCT2, provendo assim um mecanismo para a entrada de piruvato e efluxo de lactato dos peroxissomas.

Além de todas essas evidências, a importância fisiológica da LDH fica clara no estudo de Jeong e colaboradores (2006), que demonstra que a supressão da LDH em cultura de células levou a acidose celular, diminuição da oxidorresistência, apoptose, inibição do contato célula-célula, diminuição do crescimento celular e a geração de proteínas recombinantes. Dessa forma, a LDH pode ser utilizada como um marcador de toxicidade no estudo de uma variedade de compostos usados na farmacologia atual.

### **3.2 Organocalcogênios**

Desde a década de 30, esta classe de compostos têm sido alvo de interesse para a química devido à descoberta de suas aplicações sintéticas (Comasseto, 1983; Petraghani e cols., 1976), como importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese (Paulmier, 1986; Braga e cols., 1996;

1997). Suas propriedades farmacológicas (Rotruck e cols., 1973; Nogueira e cols., 2004) foram evidenciadas a partir da descoberta da presença do elemento selênio, como selenocisteína, no centro ativo de enzimas antioxidantes como a GPx, a glutationa peroxidase de hidroperóxidos lipídicos (PHGPx) (Rotruck e cols., 1973; Nogueira e cols., 2004), a tiorredoxina redutase (TrxR) (Holmgren, 1985), a 5'-deiodinase (Behne & Kyriakopoulos, 1990) e a selenoproteína P (Ursini e cols., 1990). Dentre os compostos mais estudados atualmente destacam-se o ebselen e o  $(\text{PhSe})_2$  como compostos orgânicos de selênio.

O primeiro composto orgânico de telúrio foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840. Porém, apenas a partir de 1970 os compostos orgânicos de telúrio começaram a ser explorados pelos químicos orgânicos, refletindo no crescimento exponencial de artigos publicados desde então (Klaman, 1990). Embora determinados compostos de telúrio exibam propriedades miméticas da GPx *in vitro*, diversos estudos têm demonstrado seu potencial toxicológico (Maciel e cols, 2000; Meotti e cols, 2003; Nogueira e cols, 2003, Nogueira e cols, 2004).

### **3.3 Disseleneto de difenila**

O  $(\text{PhSe})_2$  (figura 4) é um composto orgânico de selênio que apresenta efeitos antiúlcera (Savegnago e cols., 2005), antiinflamatório, antinociceptivo (Nogueira e cols., 2003), hepato-protetor (Borges e cols., 2006) e antioxidante em alguns modelos experimentais para a avaliação de estresse oxidativo (Nogueira e cols., 2004; Santos e cols., 2005; Borges e cols., 2006; Luchese e

cols., 2007). Adicionalmente, o  $(\text{PhSe})_2$  também apresenta atividade quelante em animais expostos ao cádmio (Santos e cols., 2005a) e atividade Tpx (Wilson e cols., 1989). Além disso, o  $(\text{PhSe})_2$  demonstrou ser um bom neuroprotetor (Ghisleni e cols, 2003; Nogueira e cols, 2004), causando efeitos benéficos em modelos de discinesia orofacial induzida por reserpina (Burger e cols, 2004), e também contra discinesia orofacial induzida por tratamento agudo com haloperidol em ratos (Burger e cols, 2006). O  $(\text{PhSe})_2$  também mostrou-se efetivo em proteger o dano hepático induzido por 2-nitropropano (Borges e cols, 2005, 2006).

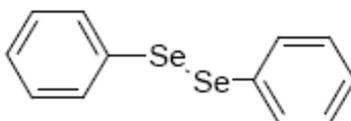


Figura 4 – Estrutura do disseleneto de difenila

O  $(\text{PhSe})_2$  tem sido descrito como um potente agente antioxidante devido sua atividade mimética da GPx (ver figura 5, Mugesh e cols, 2001; Nogueira e cols, 2004). Em doses farmacológicas apresenta baixa toxicidade em ratos e camundongos (Perottoni e cols, 2005; Fachineto e cols, 2006). A  $\text{LD}_{50}$  encontrada para ratos e camundongos injetados via intraperitonal é de 0,65  $\mu\text{mol/kg}$  e 150  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente. Para ratos e camundongos injetados pela via subcutânea a  $\text{LD}_{50}$  foi de 0,9  $\mu\text{mol/kg}$  e >500  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente (Meotti e cols, 2003).

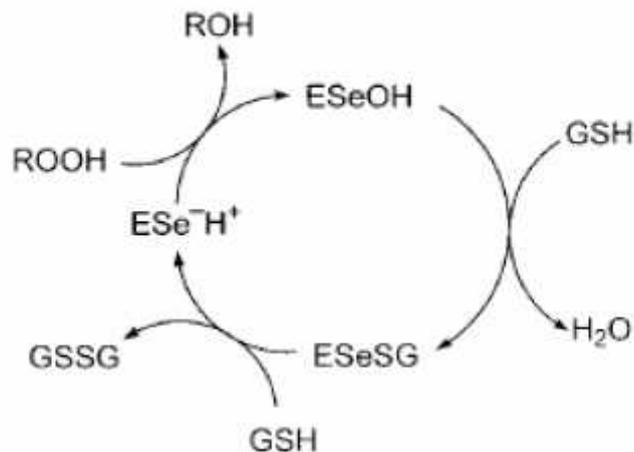


Figura 5 – Esquema da atividade mimética da glutatona peroxidase por compostos orgânicos de selênio (Nogueira e cols., 2004).

Porém, a exposição aguda ou crônica (de 14 à 21 dias) à doses altas de (PhSe)<sub>2</sub> leva à inibição da enzima δ-ALA-D, à diminuição dos níveis de tióis endógenos de baixo peso molecular (Maciel e cols., 2003), e causa danos cerebrais em camundongos (Maciel e cols., 2000). Os danos cerebrais podem ser consequência da ação inibitória sobre a enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase (Borges e cols., 2005) e/ou de alterações no sistema glutamatérgico (Nogueira e cols., 2001) verificados após a exposição a estes compostos. Trabalhos mostram que, embora a atividade Tpx do (PhSe)<sub>2</sub> seja importante para a sua atividade antioxidante, esta característica também pode contribuir para sua atividade tóxica. Isso ocorre devido à oxidação de tióis essenciais de enzimas importantes, levando a sua inativação (Nogueira e cols., 2004). Como exemplo bem caracterizado na literatura, temos a enzima δ-ALA-D que é extremamente sensível a agentes ligantes de grupos tiól (Barbosa e cols., 1998; Folmer e cols., 2002, 2003; Peixoto e cols., 2003, 2004, 2007; Soares e cols., 2003; Santos e cols., 2005), e que apresenta-se inibida quando exposta ao (PhSe)<sub>2</sub> devido a oxidação de resíduos cisteinil essenciais presentes no sítio ativo desta

enzima (Farina e cols., 2002). A figura 6 mostra um mecanismo de ação pelo qual o (PhSe)<sub>2</sub> levaria a formação de uma espécie enzimática inativa (Nogueira e cols., 2004).

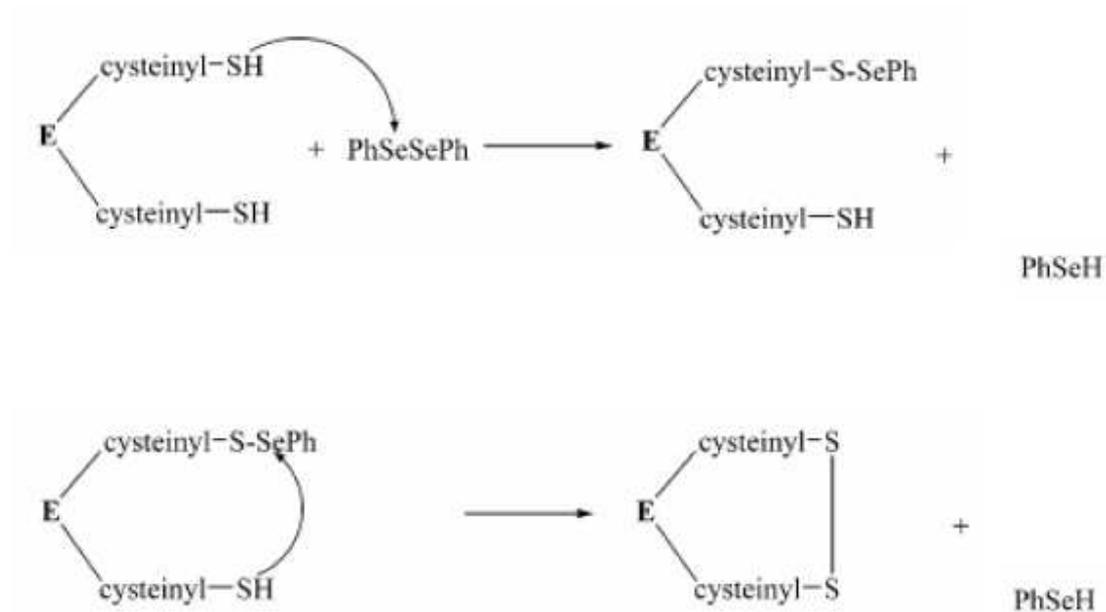


Figura 6 – Possível mecanismo de interação de organodisselenetos com tióis protéicos (Nogueira e cols., 2004).

### 3.4 Ebselen

O ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3[2H]-ona) (figura 7) é um composto orgânico de selênio que tem sido extensivamente estudado na última década. O ebselen possui como interesse particular sua atividade mimética da GPx, especialmente da PHGPx (Wendel e cols., 1984; Müller e cols., 1985; Nogueira e cols., 2002; Klotz e cols., 2003). Este composto reage com grupos tióis, como a glutathiona (GSH) (Ullrich e cols., 1996), e apresenta uma série de propriedades farmacológicas, tal como inibição da peroxidação lipídica (Parnhan & Graf., 1987), inibição da atividade de lipoxigenase (Parnhan &

Graf., 1987), bloqueia a produção do ânion superóxido e desempenha um papel protetor contra o peroxinitrito (Masumoto & Sies, 1996).

Além da atividade antioxidante, o ebselen apresenta propriedades antiinflamatória, antinociceptiva, neuroprotetora e antiúlcera em vários modelos experimentais *ex vivo* (Maiorino e cols., 1992; Nogueira e cols., 2004). Devido à ação neuroprotetora em culturas de neurônios (Tan e cols., 1997), e tem sido usado no tratamento clínico de pacientes com isquemia aguda (Yamaguchi e cols., 1998; Kondoh e cols., 1999). Este composto também demonstra atividade hepatoprotetora, agindo contra o dano hepático induzido por paracetamol, CCl<sub>4</sub>, lipopolissacarídeo e *Propionibacterium acnes*, etanol, e injúria por isquemia-reperfusão (Li e cols., 1994; Ozaki e cols., 1997; Kono e cols., 2001; Koyanagi e cols., 2001; Wasser e cols., 2001).

De particular interesse, esse composto não libera o elemento selênio de sua molécula no decorrer do seu metabolismo (Parnhan & Graf, 1987), o que pode ser responsável por sua baixa toxicidade. Esta característica foi também demonstrada por Wendel e cols. (1992), que suplementaram animais deficientes em selênio e com atividade da GPx baixa com ebselen, e observaram que a atividade da enzima não foi restaurada.

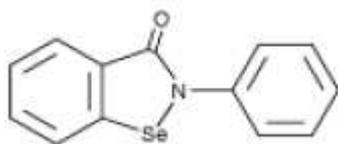


Figura 7 – Estrutura química do ebselen

### 3.5 Ditelureto de difenila

Compostos inorgânicos de telúrio são encontrados na forma de sais. Já em 1899 o Manual da Merck indicava o telurato de potássio como antihidrótico.

O telurato de sódio era também usado como antiséptico, antipirético e no tratamento de úlcera gástrica, de reumatismos e da febre tifóide. Entretanto, mais recentemente, tem-se verificado que os compostos de telúrio inorgânico apresentam características tóxicas afetando uma série de órgãos (; Agnew & Curry 1972; D'gregório & Miller, 1988; Toews e cols., 1991; Taylor, 1996).

Os compostos orgânicos de telúrio, tal qual o telúrio elementar, são muito tóxicos, e a intensidade desta toxicidade depende da estrutura do composto, da dose administrada e do tipo de animal testado (Nogueira e cols, 2004). O mecanismo de toxicidade destes compostos se deve principalmente a sua atividade tiol-oxidase, que pode levar a inibição de uma série de enzimas com tióis essenciais em sua estrutura (Blais e cols, 1972; Deuticke e cols, 1992). Como exemplo, temos a enzima sulfidrídica  $\delta$ -ALA-D, que é uma enzima que possui dois resíduos cisteinil essenciais em seu sítio ativo, e que é inibida, tanto *in vitro* como *in vivo*, por compostos orgânicos de telúrio, devido à oxidação de seus grupos tióis (Maciel e cols, 2000; Meotti e cols, 2003; Nogueira e cols, 2003). De fato, quando a  $\delta$ -ALA-D inibida é exposta ao ditioneitol (DTT), um composto dissulfidrídico doador de grupamentos tiólicos, a enzima é reativada, devido a redução das pontes S-S, restaurando assim a atividade enzimática (Perottoni e cols; 2005).

No caso específico do  $(\text{PhTe})_2$  (figura 8), este composto inibe a enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase por oxidar seus grupos tióis *in vitro* (Nogueira e cols, 2003) e *in vivo* (Prigol e cols, 2007), e inibe a atividade da  $\delta$ -ALA-D de fígado de ratos, apresentando  $\text{IC}_{50}$  de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  (Barbosa e cols, 1998). Porém, o  $(\text{PhTe})_2$  não altera a atividade  $\delta$ -ALA-D de folhas de pepino, provavelmente devido ao fato desta apresentar apenas um resíduo de cisteína em sua

estrutura, enquanto que a  $\delta$ -ALA-D animal, possui dois resíduos de cisteína essenciais em sua estrutura. Isto reforça ainda mais a importância da oxidação de grupos tiólicos como mecanismo envolvido na toxicidade deste composto (Farina e cols, 2002).

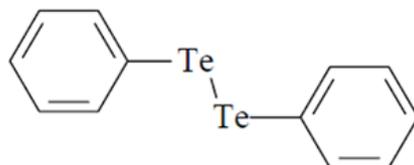


Figura 8: Estrutura química do ditelureto de difenila.

O  $(\text{PhTe})_2$  também apresenta ação citotóxica, interferindo nos sistemas de fosforilação e desfosforilação de proteínas celulares, e alterando a organização e a estrutura celular (Moretto e cols, 2005). Iwase e cols. (2004) também demonstraram que este composto induz a ativação de caspases à baixas concentrações, levando a morte celular.

O  $(\text{PhTe})_2$  também é neurotóxico. E um dos possíveis mecanismos de neurotoxicidade deste composto está ligado a sua atividade inibitória sobre a enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase. Esta enzima, presente na membrana celular e responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio nas células, especialmente nas do sistema nervoso central (Doucet, 1998; Jorgensen, 1986), é inibida pelo  $(\text{PhTe})_2$  tanto *in vitro* (Borges e cols., 2005) como *in vivo* (Prigol e cols., 2007).

As propriedades toxicológicas do  $(\text{PhTe})_2$  podem ser usadas com finalidade farmacológica. Este composto possui também atividade inibitória sobre a enzima TrxR, que é responsável por fornecer equivalentes redutores (tiorredoxina - TRX-SH) às redutases de ribonucleotídeos, tendo sua expressão gênica aumentada nas células tumorais e auxiliando no seu crescimento

(Grogan e cols., 2000). Sua inibição pode levar a uma diminuição da taxa mitótica das células tumorais. Trabalhos de Engman e cols. (2000a,b) mostram que compostos análogos ao  $(\text{PhTe})_2$  são bons inibidores da TrxR, e portanto bastante eficientes contra culturas de células de câncer de cólon.

#### **4. RESULTADOS**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo. O manuscrito está disposto na forma que foi submetido ao periódico *Archives of Toxicology*.

## 4.1 Manuscrito

Editorial Manager(tm) for Archives of Toxicology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Inhibitory effect of Ebselen, an antioxidant seleno compound, on LDH activity from mammals: A comparative study with diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride

Article Type: Original Article

Corresponding Author: Dr. Maria Ester Pereira, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Thiago H Lugokenski, master

Order of Authors: Thiago H Lugokenski, master; Liz G Muller, graduate; Paulo S Taube, Master; João B Rocha, PhD; Maria Ester Pereira, PhD

Abstract: The effects of ebselen, a seleno compound with confirmed antioxidant properties, on LDH activity from different sources, was compared with two other organochalcogens, diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride, that can easily interact with thiol in exchange reaction. The effects of compounds were tested on homogenates from rat liver and heart, and in purified LDH from rabbit muscle. Ebselen was the most potent inhibitor of LDH (maximal inhibition at 2  $\mu$ M to purified and at 20  $\mu$ M to LDH from heart and liver). Diphenyl diselenide followed by diphenyl ditelluride also inhibited the LDH activity. In addition, the DTT reverted the inhibition of LDH induced by all compounds tested, confirming the involvement of essential thiol groups on LDH inhibition by organochalcogens. In conclusion, our results show that liver and heart LDH may be a possible target for toxicity of organochalcogens at relative low concentrations, and indicate that the use of LDH as a marker of cell viability may be biased by a direct inhibitory effect of ebselen or other chalcogenides on LDH, resulting in false protection in in vitro system.

Suggested Reviewers: Marcelo Farina PhD

Professor, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina  
farina@ccb.ufsc.br

Dr. Farina is an expert researcher in toxicology and antioxidant effect of drugs, including organochalcogens.

Iseabail M Macrae PhD

Professor, Wellcome Surgical Institute and Hugh Fraser Neuroscience Laboratories, University of Glasgow

mhairi.macrae@udcf.gla.ac.uk

Professor Macrae is an expert in the antioxidant effect of selenium molecules, including ebselen, on biological systems.

Inhibitory effect of Ebselen, an antioxidant seleno compound, on LDH activity from mammals: A comparative study with diphenyl deselenide and diphenyl ditelluride

*Thiago Henrique Lugokenski<sup>a</sup>, Liz Girardi Müller<sup>b</sup>, Paulo Sérgio Taube<sup>b</sup>, João Batista Teixeira Rocha<sup>a,b</sup>,  
Maria Ester Pereira<sup>a,b\*</sup>*

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica; <sup>b</sup>Departamento de Química; Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Correspondence to:

\*Maria Ester Pereira

Universidade Federal de Santa Maria, CCNE

Departamento de Química, Campus Universitário Camobi

97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Tel/fax: +55 55 32208799

Email: [pereirame@yahoo.com.br](mailto:pereirame@yahoo.com.br)

#### ABSTRACT

The effects of ebselen, a seleno compound with confirmed antioxidant properties, on LDH activity from different sources, was compared with two other organochalcogens, diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride, that can easily interact with thiol in exchange reaction. The effects of compounds were tested on homogenates from rat liver and heart, and in purified LDH from rabbit muscle. Ebselen was the most potent inhibitor of LDH (maximal inhibition at 2  $\mu\text{M}$  to purified and at 20  $\mu\text{M}$  to LDH from heart and liver). Diphenyl diselenide followed by diphenyl ditelluride also inhibited the LDH activity. In addition, the DTT reverted the inhibition of LDH induced by all compounds tested, confirming the involvement of essential thiol groups on LDH inhibition by organochalcogens. In conclusion, our results show that liver and heart LDH may be a possible target for toxicity of organochalcogens at relative low concentrations, and indicate that the use of LDH as a marker of cell viability may be biased by a direct inhibitory effect of ebselen or other chalcogenides on LDH, resulting in false protection in *in vitro* system.

Key words: organochalcogens, lactate dehydrogenase, antioxidant compounds, sulfhydryl-binding reagents.

## INTRODUCTION

Lactate dehydrogenase is a regulatory enzyme that occurs in tissues of vertebrates mainly in five isoenzymes ( $M_4$ ,  $M_3H$ ,  $M_2H_2$ ,  $MH_3$ , and  $H_4$ ) that catalyze the reduction of pyruvate to lactate or the oxidation of lactate to pyruvate (Le Bras and Garel 1991, Vinals et al 1995).

The two different subunits (M and H) favor dissimilar behaviors: the LDH isoenzyme  $M_4$  favors rapid reduction of very low concentrations of pyruvate to lactate in skeletal muscle, and the isoenzyme  $H_4$  tends to favor rapid oxidation of lactate to pyruvate in the cardiac muscle (Phillips et al 1981). Although a third subunit type is known (type X) in vertebrates, this subunit is usually present in only one, or at most a few tissues (Goldberg 1963, Shaklee et al 1973). The LDH have two main domains: the coenzyme ( $NAD^+$  or  $NADH$ ) binding domain and the substrate binding domain (Le Bras and Garel 1991).

Dehydrogenases containing zinc as a functional component on the active site, such as LDH, can be inhibited by sulfhydryl-binding reagents, such as p-chloromercuribenzoate (Zheng et al 2003). It is well known that cysteine residues are essential for the LDH activity, but X-rays of LDH crystals show that the sulfhydryl group of Cys does not combine with substrate (Abad-Zapatero et al 1987, Vinals et al 1995). Modifications of these groups by p-chloromercuribenzoate lead to inactivation, conformational changes and partial unfolding of the enzyme (Zheng et al 2003). Furthermore, literature data indicate that the binding of  $NAD(H)$  can induce structural modifications on the active site and increase the accessibility of cysteine residues to  $Cu(II)$  accelerating their oxidation and, consequently, inducing the enzyme activity loss (Pamp et al 2005).

Organoselenium and organotellurium compounds have been extensively studied because of their potential antioxidant capacity (Parnham and Graf 1991, Mughesh and Singh 2000, Arteel and Sies 2001, Mughesh et al 2001, Ren et al 2001, Nogueira et al 2004, Lv et al 2007, Puntel et al 2007, Prigol et al 2008). In line of this, literature data have indicate that these compounds can afford protective effect against lipid peroxidation induced by various kinds of pro-oxidants (Parnham and Graf 1991, Engman et al 1992, Engman et al 1994, Nogueira et al 2004, Borges et al 2006, Puntel et al 2007, Prigol et al 2008). The antioxidant activity of these organochalcogens has been related to their glutathione-like activity (Maiorino et al 1988, Jacquemin et al 1992, Sies 1993, Galet et al 1994, Sies 1995, Santos et al 2005) and more recently to their thioredoxin reductase-like activity (Zhao and Holmgren 2002, Zhao et al 2002). Thus, in order to reduce peroxides, these compounds must first form selenol/selenolate intermediates which can be accomplished via reduction of the Se moiety by different types of thiols (Wendel et al 1984, Muller et al 1985, Cotgreave et al 1992, Engman et al 1994, Nogueira et al 2004) (scheme 1).

Recently, literature data have proposed that ebselen could act as an antioxidant via formation of ebselen diselenide (Zhao and Holmgren 2002, Zhao et al 2002), which could indicate that its antioxidant activity posses more similarities with diphenyl diselenide ( $(PhSe)_2$ ) than the cyclic ebselen.

For the case of tellurium containing compounds, the chemistry can be more complex due to the extreme instability/reactivity of a tellurol intermediate. It has been postulated that the antioxidant activity of organotellurium compounds is linked to changes in the oxidation state of the Te atom ( $Te(II) \leftrightarrow Te(IV)$ ) (Engman et al 1995, Nogueira et al 2004).

Although the thiol-peroxidase or thioredoxin-thiol-peroxidase (Zhao and Holmgren 2002, Zhao et al 2002) can potentially be of biological and therapeutic significance by modulating artificially the

cellular levels of peroxides, the excessive oxidation of thiols by organochalcogens without a concomitant reduction of peroxides can be potentially toxic to living cells (thiol-oxidase activity, scheme 2) (Nogueira et al 2003).

The toxicology of organoselenium and tellurium compounds is not completely understood, but the thiol oxidase activity may explain part of the toxic effect of diorganoyl diselenides and ditellurides (Goeger and Ganther 1994, Maciel et al 2000, Farina et al 2001).

In line with this, previous reports from our research group have demonstrated that *in vitro* or *in vivo* exposure of rodents and fruit fly to high doses of (PhSe)<sub>2</sub> and diphenyl ditelluride ((PhTe)<sub>2</sub>) can inactivate δ-ALA-D (Maciel et al. 2000, Farina et al 2002, Golombieski et al 2008) and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase by oxidizing their thiol groups *in vitro* (Nogueira et al. 2003) and *in vivo* (Prigol et al 2007).

Considering that LDH is a sulfhydryl containing enzyme and plays a central role in cellular metabolism, we sought to determine whether this enzyme could be considered a toxicological molecular target for the thiol-oxidase activity of ebselen, an important antioxidant molecule that has been used in different models of diseases and also in some clinical trials with relative success (Schewe 1995, Delanty and Dichter 2000, Imai et al 2003, Lapchak and Zivin 2003), in a comparative way with (PhSe)<sub>2</sub> (which we have recently showed to inhibit LDH from different sources (Kade et al 2008)) and (PhTe)<sub>2</sub>. Our main objective was to determine whether ebselen, (PhSe)<sub>2</sub> and (PhTe)<sub>2</sub> could have some degree-extent of selectivity in inhibiting different isoforms of LDH and also to determine whether the direction of the reaction (i.e., from lactate to pyruvate or pyruvate to lactate) could change the inhibitory potency of these compounds. Since (PhTe)<sub>2</sub> is extremely toxic to rodents, we also sought to determine whether some of the differential toxicity of these two analog forms of arylchalcogenides (diselenide and ditelluride) could be related to a distinct inhibitory potency towards LDH.

## MATERIALS AND METHODS

### *Chemicals*

Lactate dehydrogenase, lactic acid, β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), and DL-dithiothreitol (DTT) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>], diphenyl ditelluride [(PhTe)<sub>2</sub>] and ebselen [2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one] (Fig. 1) were synthesized according to literature methods (Paulmier 1986, Engman 1989, Petraghani 1994). All other chemicals were of analytical grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### *Animals*

Male adult albino Wistar rats (150–250 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept on a 12-h light/dark cycle, at a room temperature of 22 °C and with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

### *Tissue Preparation*

Rats were killed by decapitation without anesthesia. The liver and cardiac muscle were quickly removed. The tissues were placed on ice and homogenized within 10 min in 9 volume of cold Tris-HCl 0.01M buffer, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 4,000g at 4°C for 10 min to yield a low-speed supernatant fraction (S1) that was used immediately for biochemical assay. Before the assays the liver and heart S1 were diluted 4 and 5 times, respectively. The purified LDH was diluted 80 times before use.

#### *Enzyme assay*

The effects of organochalcogens [ebselen, (PhSe)<sub>2</sub> and (PhTe)<sub>2</sub> (0.5-100 μM)] on LDH activity was assayed according to the method described in Pereira et al. (Pereira et al 1991). The enzyme activity was measured by determining the amount of NADH formed at 37°C (lactate → piruvate reaction). The compounds effects were investigated in four different situations in which the compound was incubated for 15 min: (1) with LDH in the presence of NAD<sup>+</sup>, with the reaction been started with addition of lactate; (2) with LDH in the presence of lactate, with the reaction been started with addition of NAD<sup>+</sup>; (3) with LDH (without the lactate and NAD<sup>+</sup>), with the reaction been started with the addition of both substrate and cofactor; (4) incubation with lactate and NAD<sup>+</sup> (without the LDH), and the reaction started when added the enzyme. The reaction product (NADH) was determined spectrophotometrically at 340 nm. The reaction was linear by 1 minute. The substrate (lactate) and cofactor (NAD<sup>+</sup>) concentrations were 50 mM and 0.1 mM, respectively.

The effects of (PhSe)<sub>2</sub> also were investigated on purified LDH activity by consume of NADH (piruvate → lactate reaction) according to the method of Hewitt et al. (Hewitt et al 1999) with some modifications. Briefly, LDH activity was assayed following the decrease in NADH concentration at 340 nm at 37°C. The buffer used was Tris-HCl (pH 7.4). The compound effects on enzyme activity were investigated using the same protocol before described (lactate → piruvate reaction). The substrate (piruvate) and cofactor (NADH) concentrations were 0.16 mM and 0.1 mM, respectively.

#### *Protective effect of DTT on LDH inhibition induced by organochalcogens*

To investigate a possible involvement of cysteinyl groups in the inhibitory actions of organochalcogens, the protective effect of a thiol reducing agent, dithiothreitol (DTT), was examined. The samples of LDH purified from rabbit muscle were incubated for 20 min at 37°C in the presence of lactate and/or NAD<sup>+</sup> or in the absence of both, and with (PhSe)<sub>2</sub> (5 μM), (PhTe)<sub>2</sub> (40 μM) or ebselen (0.5 μM); DTT (1 mM) was added at the start or at 10 minutes of incubation. The reaction was started by addition of substrate and/or cofactor, or addition of LDH to the medium.

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed statistically by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test when appropriate. Differences between groups were considered significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### *Effect of organochalcogens on LDH activity*

(PhTe)<sub>2</sub>, (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen inhibited in a concentration-dependent manner the LDH activity from rabbit muscle purified (Fig. 2) and from rats heart and liver homogenates (Fig. 3 and 4). Ebselen was the most effective LDH inhibitor and it caused a maximal inhibitory activity at 2 μM on purified LDH from rabbit muscle (Fig. 2A-C), and at 20 μM on LDH from rats heart and liver homogenate (Fig. 3A-C; 4A-C).

(PhSe)<sub>2</sub> followed by (PhTe)<sub>2</sub> also presented a significant inhibitory effect on LDH activity. (PhSe)<sub>2</sub> inhibited the enzyme in concentrations ranging 10 to 40 μM, whereas the enzyme was sensitive to (PhTe)<sub>2</sub> in concentrations ranging 40 to 100 μM. When the reaction was started by enzyme addition (Fig. 2D, 3D and 4D), only ebselen and (PhSe)<sub>2</sub> (concentrations starting 10 μM) had a slight, but significant, inhibitory effect on purified LDH (Fig. 2D). In contrast, cardiac and hepatic LDH (Fig. 3D and 4D) were not inhibited by (PhSe)<sub>2</sub> or (PhTe)<sub>2</sub> compounds.

Table 1 shows the IC<sub>50</sub>, inhibitor concentration necessary to reduce the initial velocity to half, of the three tested compounds on the different pre-incubations. This parameter was determined using Dixon Plot method (Dixon and Webb 1964). We may observe that, when LDH inhibition was obtained in the presence of NAD<sup>+</sup>, ebselen was the most powerful inhibitor, with an IC<sub>50</sub> of 0.16 ± 0.02 μM to purified LDH. In rats tissues, ebselen presented higher inhibitory effect on cardiac LDH (IC<sub>50</sub> 5.16 ± 0.55 μM) than on liver LDH (IC<sub>50</sub> 9.14 ± 0.17 μM). (PhSe)<sub>2</sub> presented an IC<sub>50</sub> of 3.02 ± 1.25 μM to purified LDH, 17.39 ± 3.2 μM and 24.2 ± 0.91 μM to rat heart and liver LDH, respectively. (PhTe)<sub>2</sub> was the poorest LDH inhibitor in these conditions, with an IC<sub>50</sub> of 13.6 ± 2.67 μM to purified enzyme, and 68.68 ± 3.23 μM and 74.65 ± 3.45 μM to heart and liver enzyme, respectively.

When the enzyme was exposed to organochalcogens in the presence of lactate, a similar behavior from NAD<sup>+</sup> pre-incubation was obtained, where ebselen was the most powerful LDH inhibitor followed by (PhSe)<sub>2</sub> and (PhTe)<sub>2</sub>, for all enzyme sources. A comparison between the different rat tissues LDH shows that for all compounds tested, heart LDH was more sensible to inhibition than liver LDH. The exposure of the enzyme to ebselen, (PhSe)<sub>2</sub> and (PhTe)<sub>2</sub> in the absence of both lactate and NAD<sup>+</sup> was characterized by a higher IC<sub>50</sub> for all compounds in comparison to the pre-incubation with NAD<sup>+</sup> and lactate. In this condition ebselen showed higher inhibitory effect on LDH, followed by (PhSe)<sub>2</sub> and (PhTe)<sub>2</sub>. In fact, for purified LDH, all compounds presented an increased IC<sub>50</sub> when the enzyme was exposed alone to organochalcogens, followed by the pre-incubations with lactate and NAD<sup>+</sup>. When the pre-incubation period was done without the presence of the enzyme (reaction starting with enzyme addition), highest values in comparison with other exposure situations were obtained; for purified LDH, IC<sub>50</sub> were: ebselen 2.82 ± 0.05 μM, (PhSe)<sub>2</sub> 81.81 ± 22.2 μM; and for (PhTe)<sub>2</sub> was not possible to calculate.

In figure 5, a set of tests with (PhSe)<sub>2</sub>-induced LDH inhibition are shown. In this case, a piruvate → lactate reaction was done in order to obtain a better physiological idea of the phenomenon involving LDH inhibition with organochalcogens. Here, we observe that (PhSe)<sub>2</sub> significantly inhibited the enzyme activity in all tested situations, and it was necessary lower (PhSe)<sub>2</sub> concentration to reach this inhibitory effect than for lactate → piruvate reaction (fig. 2A-D). The concentration of (PhSe)<sub>2</sub> necessary to inhibit 50% of LDH activity (IC<sub>50</sub>) for the piruvate → lactate reaction was 3.11 ± 0.73, 3.19 ± 0.065 and 1.94 ± 0.12 for LDH incubated in the presence of piruvate, NADH and enzyme alone, respectively.

*Protective effect of DTT on LDH inhibition induced by organochalcogens*

The DTT protective effect on purified LDH inhibition induced by organochalcogens compounds were tested on 4 sets of incubation described in the previous experiments: compounds plus enzyme and NAD<sup>+</sup>, reaction started by lactate; compound plus enzyme and lactate, reaction started by NAD<sup>+</sup> (cofactor); compounds plus enzyme, reaction started by lactate and NAD<sup>+</sup>; and compound plus lactate and NAD<sup>+</sup>, reaction started by enzyme.

(PhSe)<sub>2</sub> (5 μM) inhibited 91%, 61% and 92% of LDH activity when this compound was incubated in the presence of NAD<sup>+</sup> (Fig. 6A), lactate (Fig. 6B) and only enzyme (Fig. 6C), respectively. The addition of DTT to reaction medium, as at the beginning as at 10 min of incubation (total incubation time of 20 minutes) restored the LDH activity at the control level. (PhSe)<sub>2</sub> did not inhibit the LDH activity when the enzyme was not incubated previously with compound (Fig. 6D).

(PhTe)<sub>2</sub> (40 μM) inhibited 65%, 44% and 55% of LDH activity when this compound was incubated in the presence of NAD<sup>+</sup> (Fig. 7A), lactate (Fig. 7B) and only enzyme (Fig. 7C), respectively. The addition of DTT to reaction medium, as at the beginning as at 10 min of incubation (total incubation time of 20 minutes) restored the LDH activity at the control level. (PhTe)<sub>2</sub> 40 μM did not inhibit the LDH activity when the enzyme was not incubated previously with compound (Fig. 7D).

Ebselen (0.5 μM) inhibited 49%, 65% and 63% of LDH activity when this compound was incubated in the presence of NAD<sup>+</sup> (Fig. 8A), lactate (Fig. 8B) and only enzyme (Fig. 8C), respectively. The addition of DTT to reaction medium, as at the beginning as at 10 min of incubation (total incubation time of 20 minutes) restored the LDH activity at the control level when the compound was incubated with enzyme and NAD<sup>+</sup>; however, when ebselen was incubated with enzyme and lactate (Fig. 8B) or alone with enzyme (Fig. 8C), the DTT was effective only when incubated since the start of incubation. Ebselen did not inhibit the LDH activity when the enzyme was not incubated previously with compound (Fig. 8D).

## DISCUSSION

These results indicate that (PhSe)<sub>2</sub>, (PhTe)<sub>2</sub> and ebselen strongly inhibited LDH from rabbit muscle and rats liver and heart. This inhibition probable involves the interaction between these compounds to essential cysteinyl residues of LDH enzyme, although these residues are not localized in the catalytic site of enzyme, i.e., they did not combine with the substrate during the catalytic process (Abad-Zapatero et al. 1987, Vinals et al. 1995). The importance of thiol groups for LDH catalysis is well known (Zheng et al 2003, Pamp et al 2005). Likewise, (PhSe)<sub>2</sub>, (PhTe)<sub>2</sub> and ebselen inhibit  $\delta$ -ALA-D by binding to critical sulfhydryl groups on the enzyme (Nogueira et al 2003).

The purified LDH from rabbit muscle (M4 isoenzyme), predominantly favor the rapid reduction of piruvate to lactate and simultaneous oxidation of NADH to supply the glycolitic pathway with NAD<sup>+</sup>. The exposure to compounds produced a similar inhibition on the LDH activity in all pre-incubations sets (fig. 2A, 2B and 2C), except when the LDH started the reaction (fig. 2D). However, lower ebselen concentration was needed to inhibit the enzyme activity. When the reaction was started with enzyme addition, only ebselen and (PhSe)<sub>2</sub> had a slight, but significant inhibitory effect on the LDH activity.

In table 1, it is possible to observe that when LDH from three enzyme sources was incubated with NAD<sup>+</sup> or substrate, the LDH inhibition was higher than in the incubation without lactate and NAD<sup>+</sup>. When the reaction was started with addition of LDH, a high IC<sub>50</sub> was observed for all compounds, expected by ebselen on purified LDH. Thus, the presence of the substrate or cofactor in the reaction medium would increase the access of the organochalcogens to thiol groups, increasing, by this way, the LDH inhibition. This hypothesis is in agreement with previous work of Pamp et al (Pamp et al 2005), which showed that NAD<sup>+</sup> increases the accessibility of sulfrydryl groups to Cu(II)-mediated inhibition of LDH. However, when the reaction was started with enzyme addition almost none inhibitory effect of the compounds on LDH activity was observed, suggesting to a protective effect of lactate and NAD<sup>+</sup> in physiological conditions. This hypothesis is supported by work of Barbosa et al (2008), which showed no inhibitory effect of high doses of diphenyl diselenide on LDH activity in *in vivo* conditions; in fact, a slight increase were observed in this situation. Moreover, the inhibitory effect of (PhSe)<sub>2</sub> on LDH activity was tested on piruvate → lactate reaction (figure 5), and it is possible to observe that (PhSe)<sub>2</sub> had a higher inhibitory effect on piruvate → lactate than on lactate → piruvate reaction.

Furthermore, the observation of the different incubation situations suggest the presence of a noncompetitive factor in the inhibition induced by these compounds on liver and heart LDH, in view of the absence of inhibition when the reaction was started with addition of the enzyme. However, it can be not discard the possibility of that, at least in part, the absence of inhibitory effects may involve the short interval of enzyme and inhibitor contact.

To corroborate the hypothesis of involvement of thiol oxidation in the LDH inhibition, we used DTT to protect the enzyme against the effect of the organochalcogens (figure 6, 7 and 8). We observed that the DTT prevented the LDH inhibition induced by organochalcogens in all situations tested, and this lets clear the involvement of thiol groups in the LDH inhibition. Furthermore, when the enzyme was exposed to (PhSe)<sub>2</sub> and (PhTe)<sub>2</sub> (figures 6 and 7), DTT protected (addition at the beginning of incubation) the essential thiol groups of LDH from oxidation, as well as reverted this oxidation (added to the medium at 10 minutes after the respective organochalcogen). The DTT effect on ebselen inhibition depended of

incubation set: when the compound was incubated with enzyme plus NAD<sup>+</sup>, DTT prevented and protected the LDH enzyme. However, when ebselen was incubated with enzyme plus lactate or with enzyme alone, DTT had only protective effect, since when added at 10 min of incubation, this reductor reactant did not revert the inhibition induced by this organochalcogen.

In conclusion, our findings indicate that ebselen, (PhTe)<sub>2</sub> and (PhSe)<sub>2</sub> are potent inhibitors of LDH-catalyzed conversion of lactate to pyruvate by oxidizing essential thiol groups; and that the presence of a substrate and/or cofactor may increase the inhibition induced by thiol oxidase-like activity compounds. Furthermore, we also showed that the oxidation of essential thiols of LDH interfere more on piruvate → lactate than lactate → piruvate reaction, for (PhSe)<sub>2</sub>. The LDH inhibition may impair the regulation of the extent of cellular acidosis, respiration, cell growth, oxidoresistance, and the generation of recombinant proteins. So, we concluded that LDH from different sources are possible targets for organochalcogens toxicity.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

None.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

Work Supported by CAPES, CNPq

## REFERENCES

- Abad-Zapatero C, Griffith JP, Sussman JL et al (1987) Refined crystal structure of dogfish M4 apo-lactate dehydrogenase. *J Mol Biol* 198:445-467.
- Arteel GE, Sies H (2001) The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10:153-158.
- Barbosa NB, Rocha JB, Soares JC et al (2008) Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem Toxicol* 46:186-194.
- Borges LP, Nogueira CW, Panatieri RB et al (2006) Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. *Chem Biol Interact* 160:99-107.
- Cotgreave IA, Morgenstern R, Engman L et al (1992) Characterisation and quantitation of a selenol intermediate in the reaction of ebselen with thiols. *Chem Biol Interact* 84:69-76.
- Delanty N, Dichter MA (2000) Antioxidant therapy in neurologic disease. *Arch Neurol* 57:1265-1270.
- Dixon M, Webb EC (1964) *Enzymes*, Longmans, Green and Co. Ltd., London.
- Engman L (1989) Expedient synthesis of ebselen and related compounds. *J. Org. Chem.*:2964–2966.
- Engman L, Andersson C, Morgenstern R et al (1994) Evidence for a common selenolate intermediate in the glutathione peroxidase-like catalysis of A-(phenylselenenyl) ketones and diphenyl diselenide. *Tetrahedron* 50:2929-2938.
- Engman L, Persson J, Vessman K et al (1995) Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Radic Biol Med* 19:441-452.
- Engman L, Stern D, Cotgreave IA et al (1992) Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a HNMR method. *J. Am. Chem. Soc.*:9737-9743.
- Farina M, Barbosa NB, Nogueira CW et al (2002) Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase from rat liver and cucumber leaves. *Braz J Med Biol Res* 35:623-631.
- Farina M, Folmer V, Bolzan RC et al (2001) Selenoxides inhibit delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol Lett* 119:27-37.
- Galet V, Bernier JL, Henichart JP et al (1994) Benzoselenazolinone derivatives designed to be glutathione peroxidase mimetics feature inhibition of cyclooxygenase/5-lipoxygenase pathways and anti-inflammatory activity. *J Med Chem* 37:2903-2911.
- Goeger DE, Ganther HE (1994) Oxidation of dimethylselenide to dimethylselenoxide by microsomes from rat liver and lung and by flavin-containing monooxygenase from pig liver. *Arch Biochem Biophys* 310:448-451.
- Goldberg E (1963) Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa. *Science* 139:602-603.
- Golombieski RM, Graichen DA, Pivetta LA et al (2008) Diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>] inhibits *Drosophila melanogaster* delta-aminolevulinic acid dehydratase (delta-ALA-D) gene transcription and enzyme activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147:198-204.
- Hewitt CO, Eszes CM, Sessions RB et al (1999) A general method for relieving substrate inhibition in lactate dehydrogenases. *Protein Eng* 12:491-496.
- Imai H, Graham DI, Masayasu H et al (2003) Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 34:56-63.
- Jacquemin PV, Christiaens LE, Renson MJ (1992) Synthesis of 2H-3,4-dihydro-1,2-benzoselenazin-3-one and derivatives – a new heterocyclic ring-system. *Tetrahedron Lett.*
- Kade IJ, Paixao MW, Rodrigues OE et al (2008) Studies on the antioxidant effect and interaction of diphenyl diselenide and dicholesteryl diselenide with hepatic delta-aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase. *Toxicol In Vitro.*
- Lapchak PA, Zivin JA (2003) Ebselen, a seleno-organic antioxidant, is neuroprotective after embolic strokes in rabbits: synergism with low-dose tissue plasminogen activator. *Stroke* 34:2013-2018.
- Le Bras G, Garel JR (1991) Properties of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus*: a possible different evolutionary origin for the D- and L-lactate dehydrogenases. *FEMS Microbiol Lett* 63:89-93.
- Lv SW, Wang XG, Mu Y et al (2007) A novel dicyclodextrinyl diselenide compound with glutathione peroxidase activity. *FEBS J* 274:3846-3854.
- Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL et al (2000) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 14:310-319.
- Maiorino M, Roveri A, Coassin M et al (1988) Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). *Biochem Pharmacol* 37:2267-2271.
- Mugesh G, du Mont WW, Sies H (2001) Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev* 101:2125-2179.



Mugesh G, Singh HB (2000) Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. *Chem. Soc. Rev.* 29:347–357.

Muller A, Gabriel H, Sies H (1985) A novel biologically active selenoorganic compound--IV. Protective glutathione-dependent effect of PZ 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 34:1185-1189.

Nogueira CW, Borges VC, Zeni G et al (2003) Organochalcogens effects on delta-aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 191:169-178.

Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104:6255-6285.

Pamp K, Bramey T, Kirsch M et al (2005) NAD(H) enhances the Cu(II)-mediated inactivation of lactate dehydrogenase by increasing the accessibility of sulfhydryl groups. *Free Radic Res* 39:31-40.

Parnham MJ, Graf E (1991) Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog Drug Res* 36:9-47.

Paulmier C (1986) *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*. Pergamon Books.

Pereira ME, Bordignon AM, Burger C et al (1991) Long-term treatment with 2,5-hexanedione has no effect on the specific activity of some brain and liver glycolytic enzymes of adult rats. *Braz J Med Biol Res* 24:735-740.

Petragani N (1994) *Tellurium in Organic Synthesis*. Academic Press, San Diego 248.

Phillips D, Blake CCF, Watson HC (1981) The enzymes of glycolysis: structure, activity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 293:1-214.

Prigol M, Wilhelm EA, Schneider CC et al (2008) Protective effect of unsymmetrical dichalcogenide, a novel antioxidant agent, in vitro and an in vivo model of brain oxidative damage. *Chem Biol Interact* 176:129-136.

Prigol M, Wilhelm EA, Schneider CC et al (2007) Involvement of oxidative stress in seizures induced by diphenyl diselenide in rat pups. *Brain Res* 1147:226-232.

Puntel RL, Roos DH, Paixao MW et al (2007) Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Chem Biol Interact* 165:87-98.

Ren X, Xue Y, Zhang K et al (2001) A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. *FEBS Lett* 507:377-380.

Ren X, Yang L, Liu J et al (2001) A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity. *Arch Biochem Biophys* 387:250-256.

Santos FW, Zeni G, Rocha JB et al (2005) Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact* 151:159-165.

Schewe T (1995) Molecular actions of ebselen--an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* 26:1153-1169.

Shaklee JB, Kepes KL, Whitt GS (1973) Specialized lactate dehydrogenase isozymes: the molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes. *J Exp Zool* 185:217-240.

Sies H (1993) Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* 14:313-323.

Sies H (1995) Ebselen. *Methods Enzymol* 252:341-342.

Vinals C, De Bolle X, Depiereux E et al (1995) Knowledge-based modeling of the D-lactate dehydrogenase three-dimensional structure. *Proteins* 21:307-318.

Wendel A, Fausel M, Safayhi H et al (1984) A novel biologically active seleno-organic compound--II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem Pharmacol* 33:3241-3245.

Zhao R, Holmgren A (2002) A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 277:39456-39462.

Zhao R, Masayasu H, Holmgren A (2002) Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8579-8584.

Zheng YB, Wang Z, Chen BY et al (2003) Multiple effects of chemical reagent on enzyme: o-phthalaldehyde-induced inactivation, dissociation and partial unfolding of lactate dehydrogenase from pig heart. *Int J Biol Macromol* 32:191-197.

## Figures legends

### Fig 1 Compounds structures

**Fig 2** Inhibitory effect of (PhSe)<sub>2</sub>, (PhTe)<sub>2</sub> and ebselen on purified LDH activity from rabbit muscle. The effect of compounds was tested in four situations: (A) enzyme in the presence of the cofactor (NAD<sup>+</sup>); (B) enzyme in the presence of the substrate (lactate); (C) enzyme without both cofactor and substrate; (D) with substrate and cofactor, and reaction started with the enzyme. Data are expressed as mean±S.E. for three independent experiments. \* expresses difference of control at least p<0.05.

**Fig 3** Inhibitory effect of (PhSe)<sub>2</sub>, (PhTe)<sub>2</sub> and ebselen on LDH from rat heart homogenized. The effect of compounds was tested in four situations: (A) enzyme in the presence of the cofactor (NAD<sup>+</sup>); (B) enzyme in the presence of the substrate (lactate); (C) enzyme without both cofactor and substrate; (D) with substrate and cofactor, and reaction started with the enzyme. Data are expressed as mean±S.E. for three independent experiments. \* expresses difference of control at least p<0.05.

**Fig 4** Inhibitory effect of (PhSe)<sub>2</sub>, (PhTe)<sub>2</sub> and ebselen on LDH from rat liver homogenized. The effect of compounds was tested in four situations: (A) enzyme in the presence of the cofactor (NAD<sup>+</sup>); (B) enzyme in the presence of the substrate (lactate); (C) enzyme without both cofactor and substrate; (D) with substrate and cofactor, and reaction started with the enzyme. Data are expressed as mean±S.E. for three independent experiments. \* expresses difference of control at least p<0.05.

**Fig 5** Inhibitory effect of (PhSe)<sub>2</sub> on piruvate→lactate reaction of purified LDH activity from rabbit muscle. The effect of the compound was tested in four situations: (-Δ-) enzyme in the presence of the cofactor (NADH<sup>+</sup>); (-O-) enzyme in the presence of the substrate (piruvate); (-∇-) enzyme without both cofactor and substrate; (-◊-) with substrate and cofactor, and reaction started with the enzyme. Data are expressed as mean±S.E. for three independent experiments. \*expresses difference of control at least p<0.05.

**Fig 6** Effect of DTT (1 mM) on (PhSe)<sub>2</sub>-induced LDH inhibition. The compounds were incubated in four situations: (A) with enzyme and cofactor (NAD<sup>+</sup>), reaction started with substrate; (B) with enzyme and substrate (lactate), reaction started with cofator; (C) with enzyme, reaction started with cofactor and substrate; (D) with substrate and cofactor, reaction started with enzyme. The incubation was carried out by 20 min at 30°C, and DTT was added at 10 min or at the beginning (0 min) of incubation. Data are expressed as mean±S.E. for three independent experiments. \*expresses difference of control at least p<0.05.

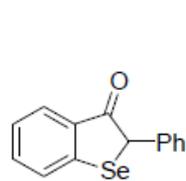
**Fig 7** Effect of DTT (1 mM) on (PhSe)<sub>2</sub>-induced LDH inhibition. The compounds were incubated in four situations: (A) with enzyme and cofactor (NAD<sup>+</sup>), reaction started with substrate; (B) with enzyme and substrate (lactate), reaction started with cofator; (C) with enzyme, reaction started with cofactor and substrate; (D) with substrate and cofactor, reaction started with enzyme. The incubation was carried out by 20 min at 30°C, and DTT was added at 10 min or at the beginning (0 min) of incubation. Data are expressed as mean±S.E. for three independent experiments. \*expresses difference of control at least p<0.05.

**Fig. 8** Effect of DTT (1 mM) on ebselen-induced LDH inhibition. The compounds were incubated in four situations: (A) with enzyme and cofactor (NAD<sup>+</sup>), reaction started with substrate; (B) with enzyme and substrate (lactate), reaction started with cofator; (C) with enzyme, reaction started with cofactor and substrate; (D) with substrate and cofactor, reaction started with enzyme. The incubation was carried out by 20 min at 30°C, and DTT was added at 10 min or at the beginning (0 min) of incubation. Data are expressed as mean±S.E. for three independent experiments. \*expresses difference of control at least p<0.05.

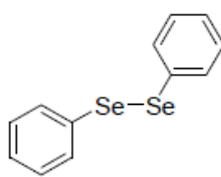
### Scheme legends

**Scheme 1** Glutathione peroxidase cycle of ebselen. GSH represent a glutathione molecule.

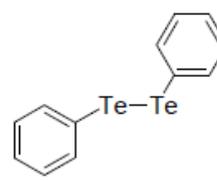
**Scheme 2** Thiol oxidase futile cycle of diorganochalcogens (X=Se or Te). RSH can represent a low molecular endogenous molecule (glutathione, cysteine, etc) or thiol-containing proteins ( $\delta$ -ALA-D, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase).



Ebselen



Diphenyl Diselenide



Diphenyl Ditelluride

Figure 1

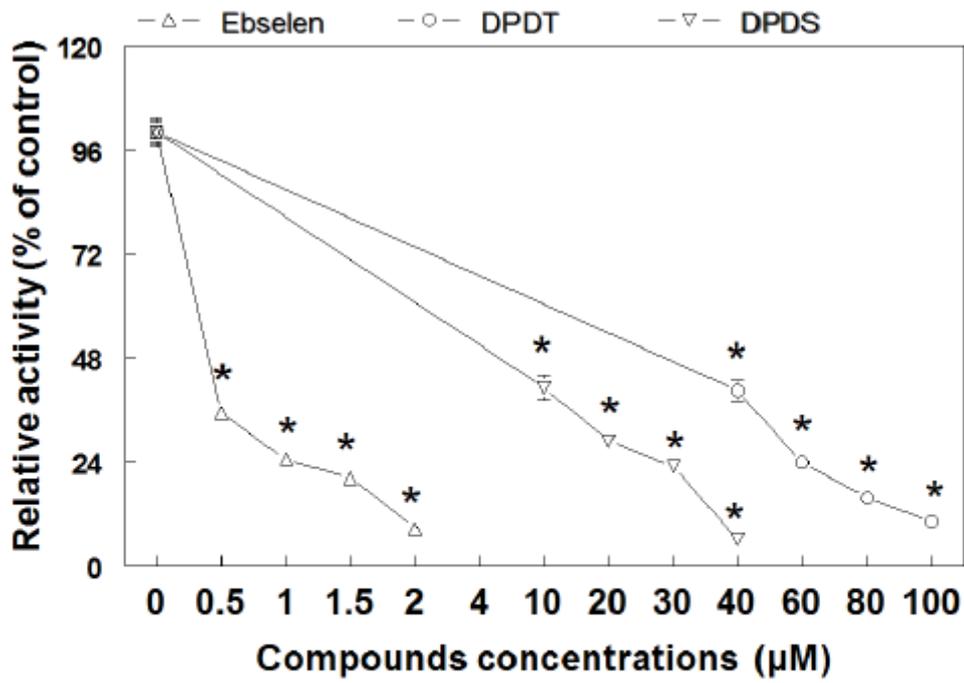


Figure 2A

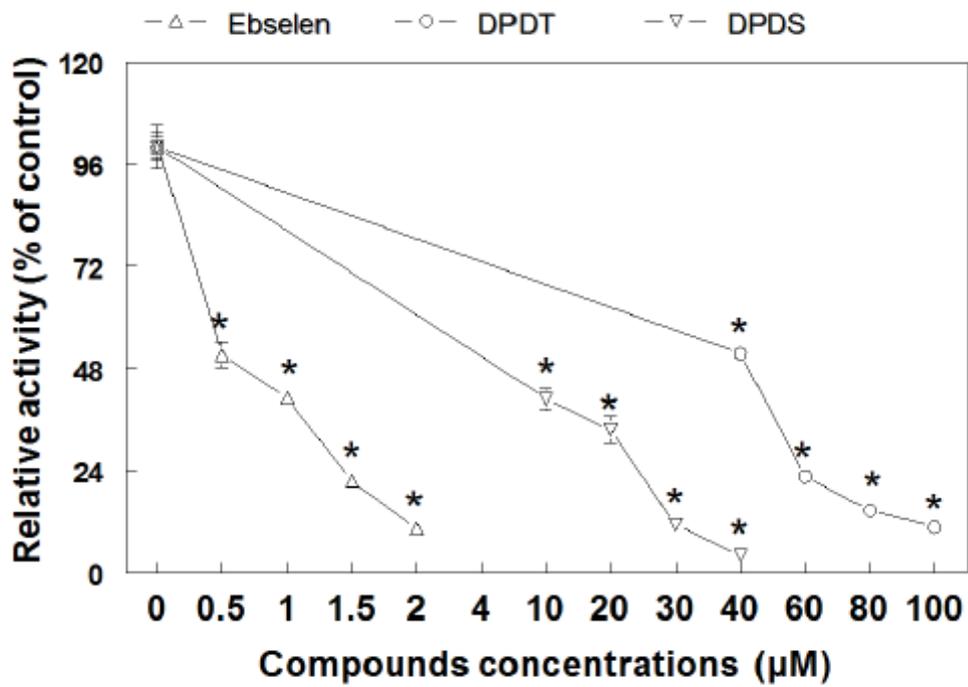


Figure 2B

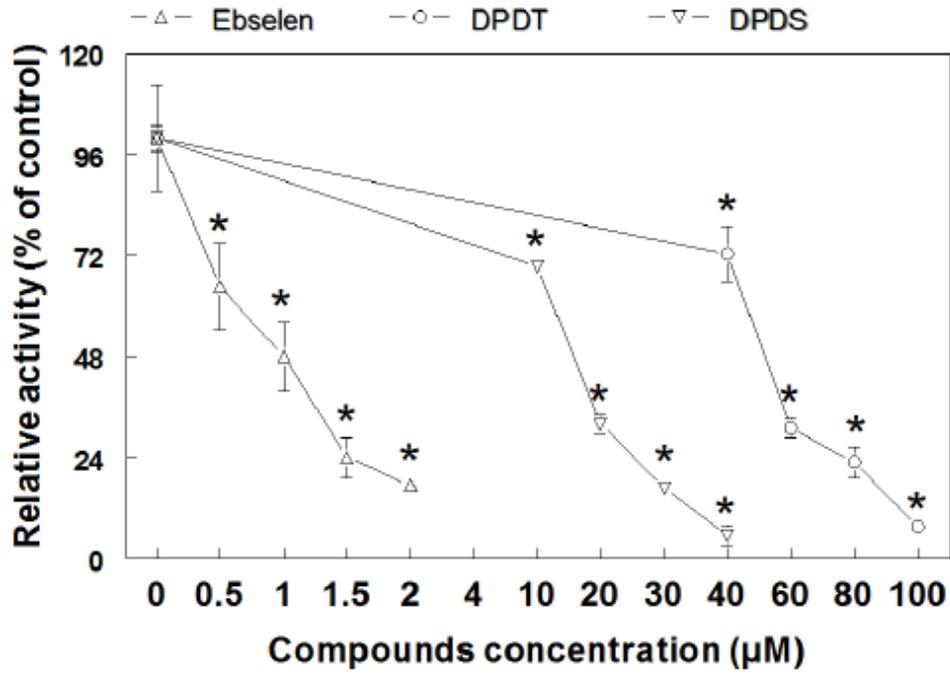


Figure 2C

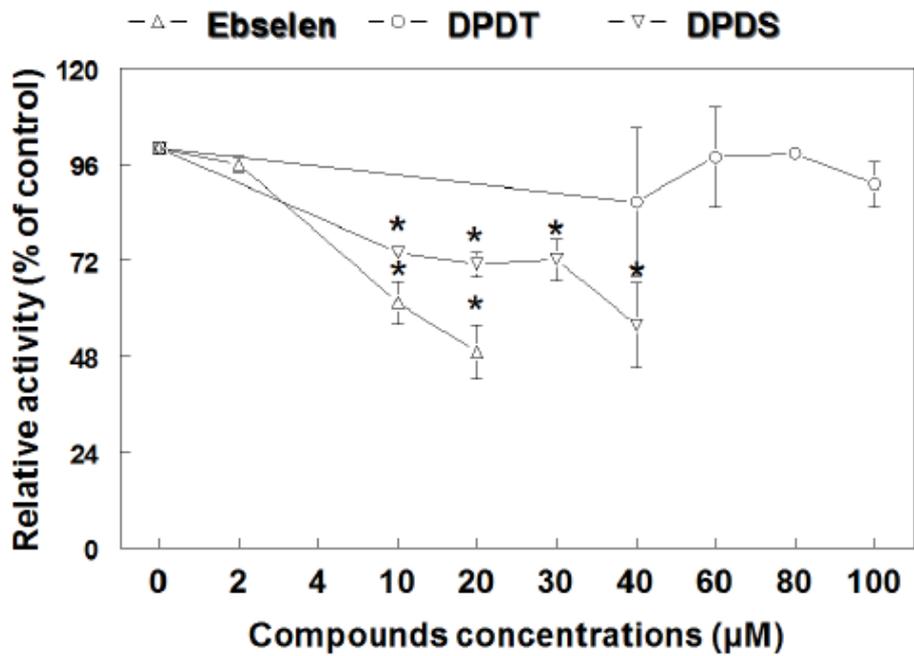


Figure 2D

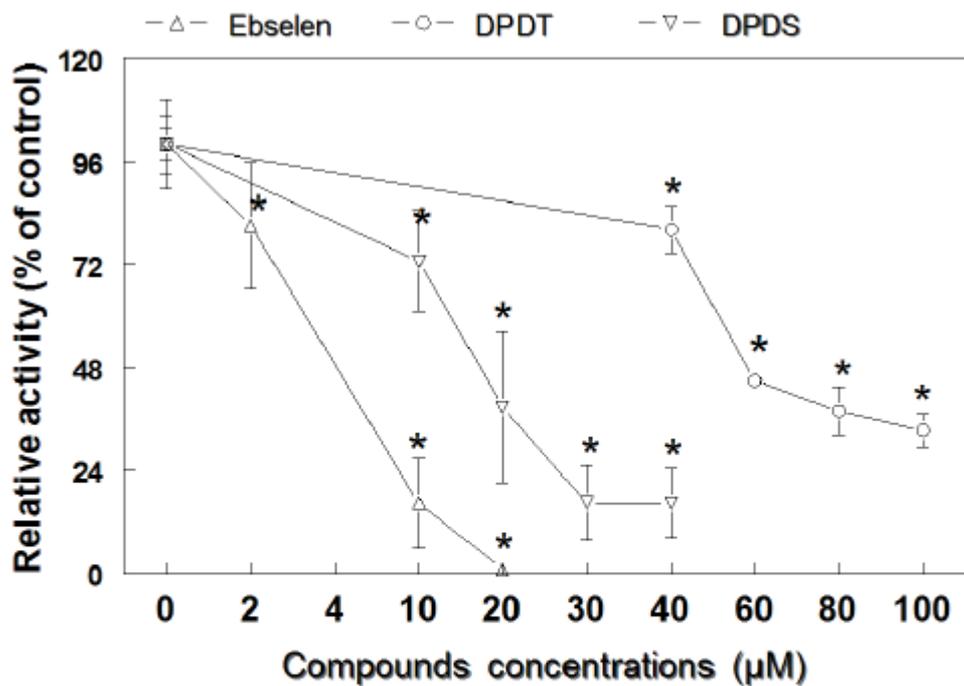


Figure 3A

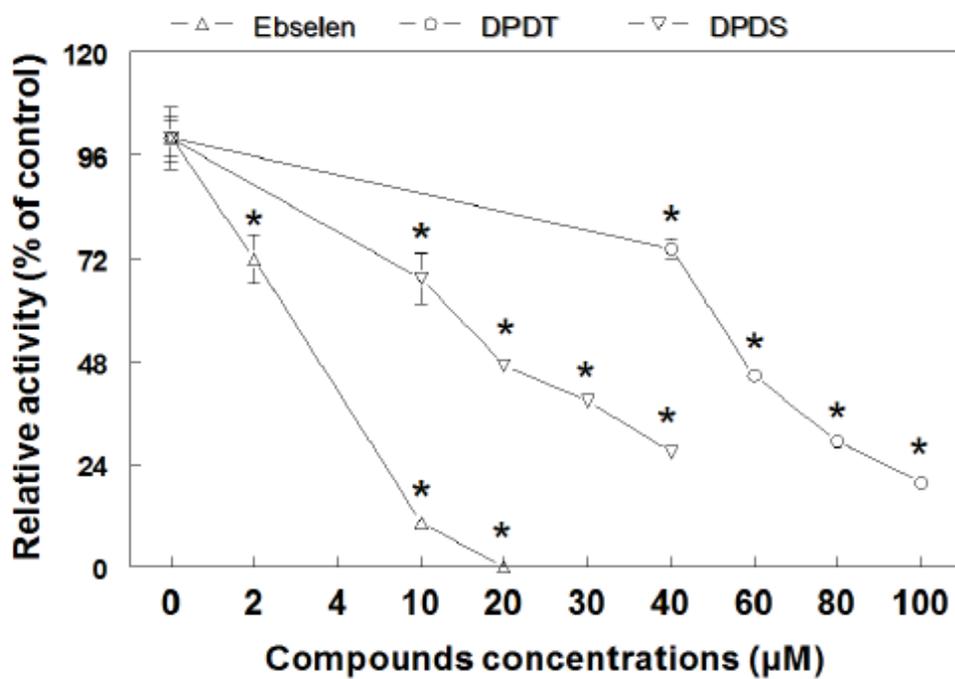


Figure 3B

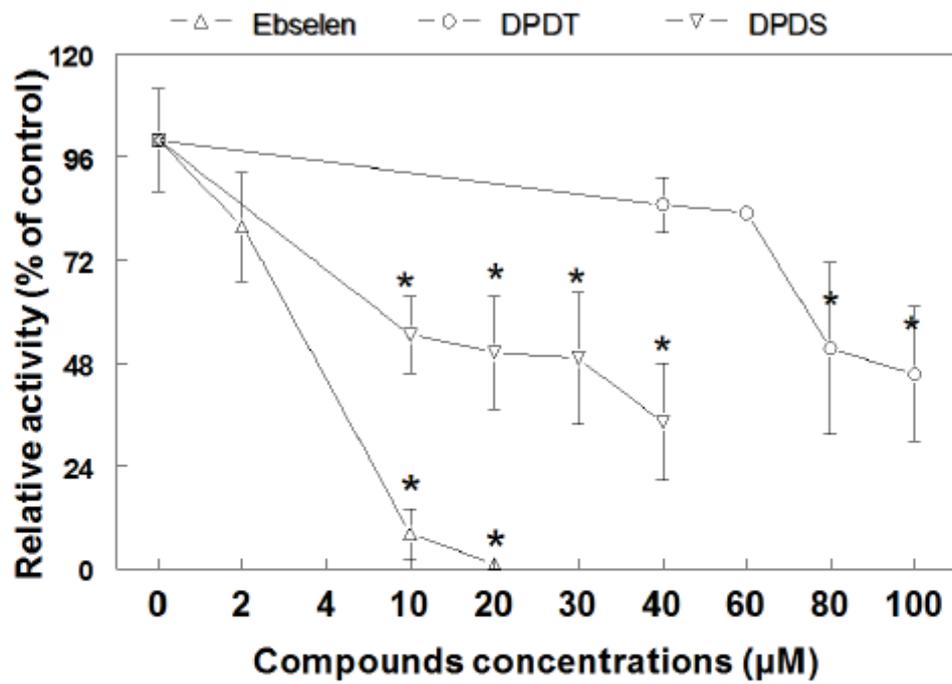


Figure 3C

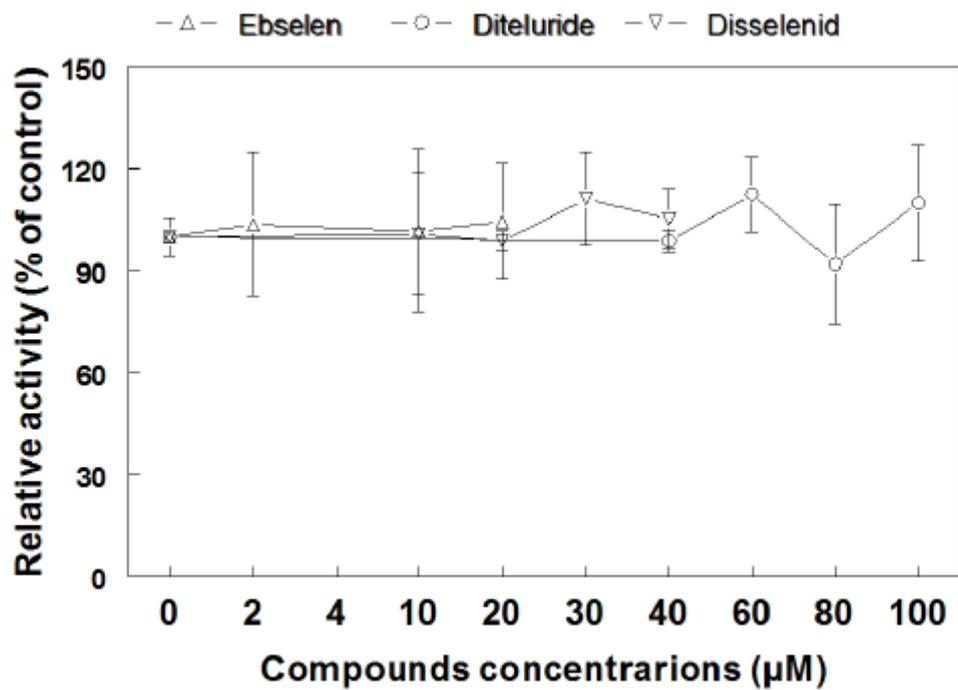


Figure 3D

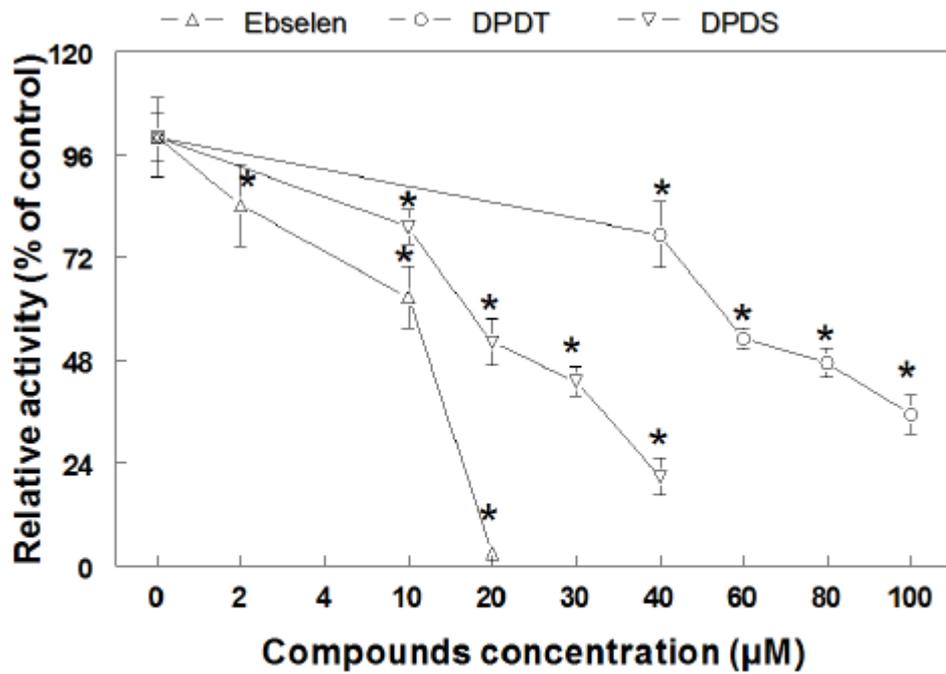


Figure 4A

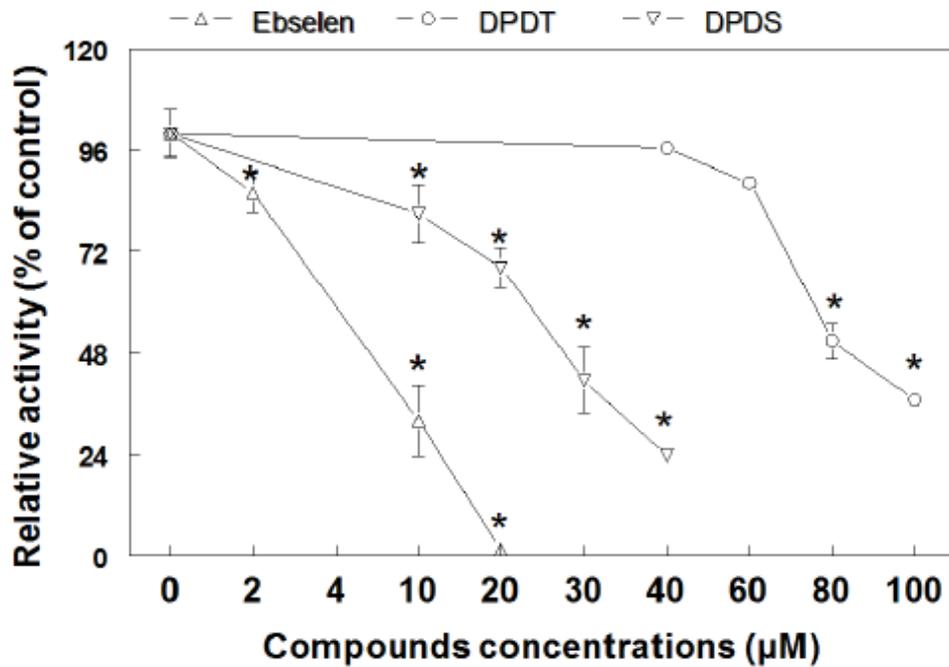


Figure 4B

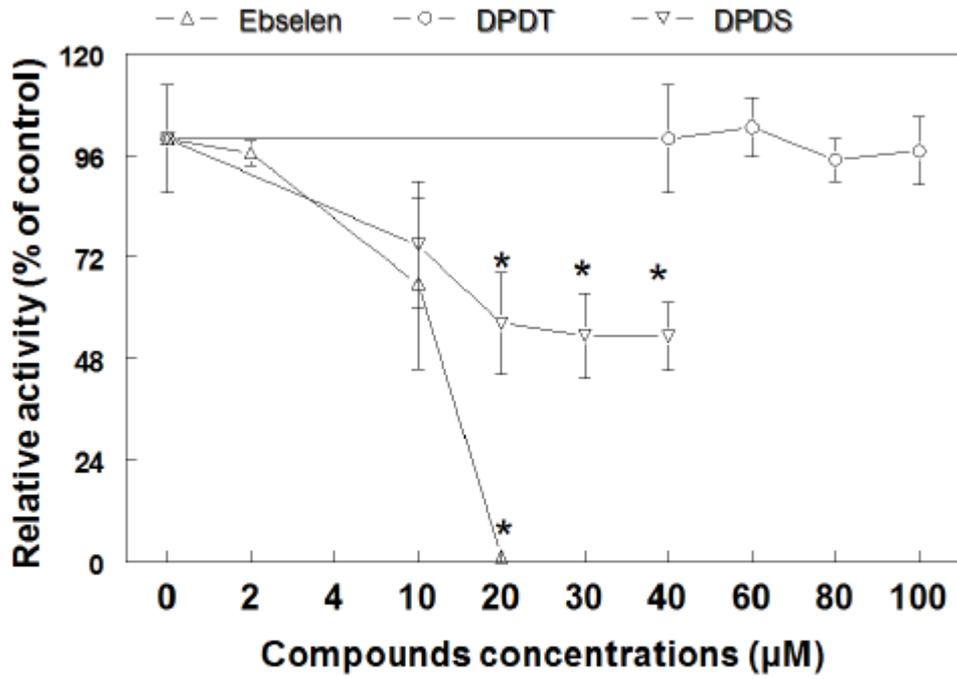


Figure 4C

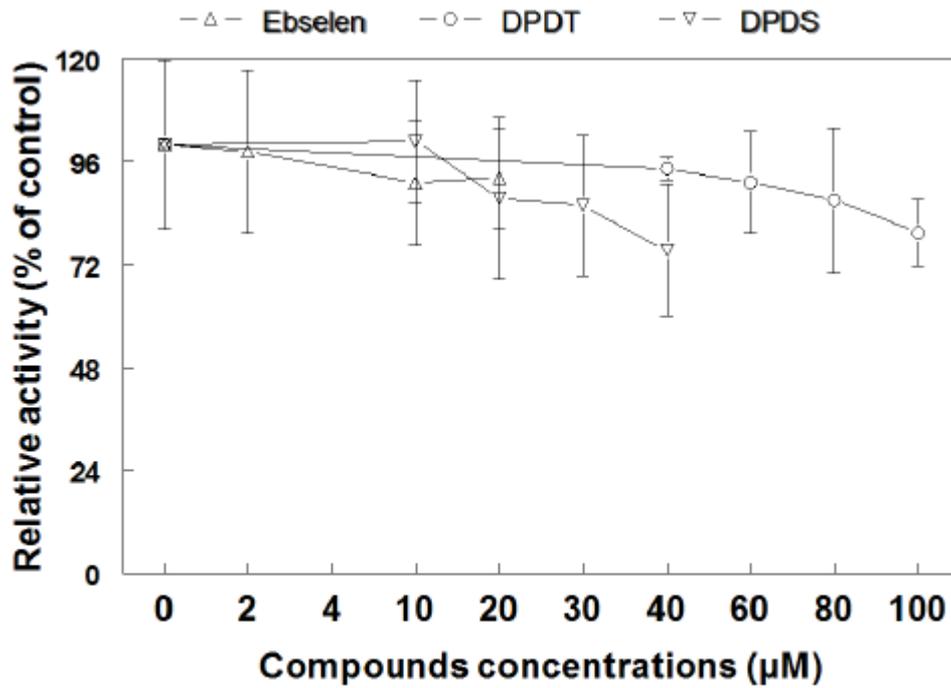


Figure 4D

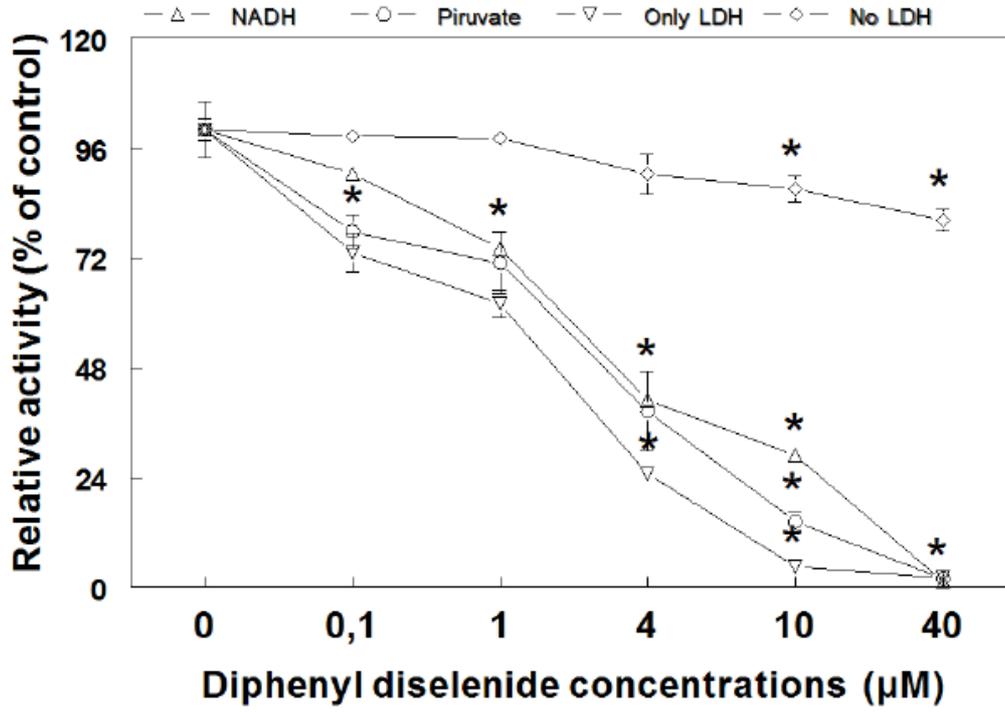


Figure 5

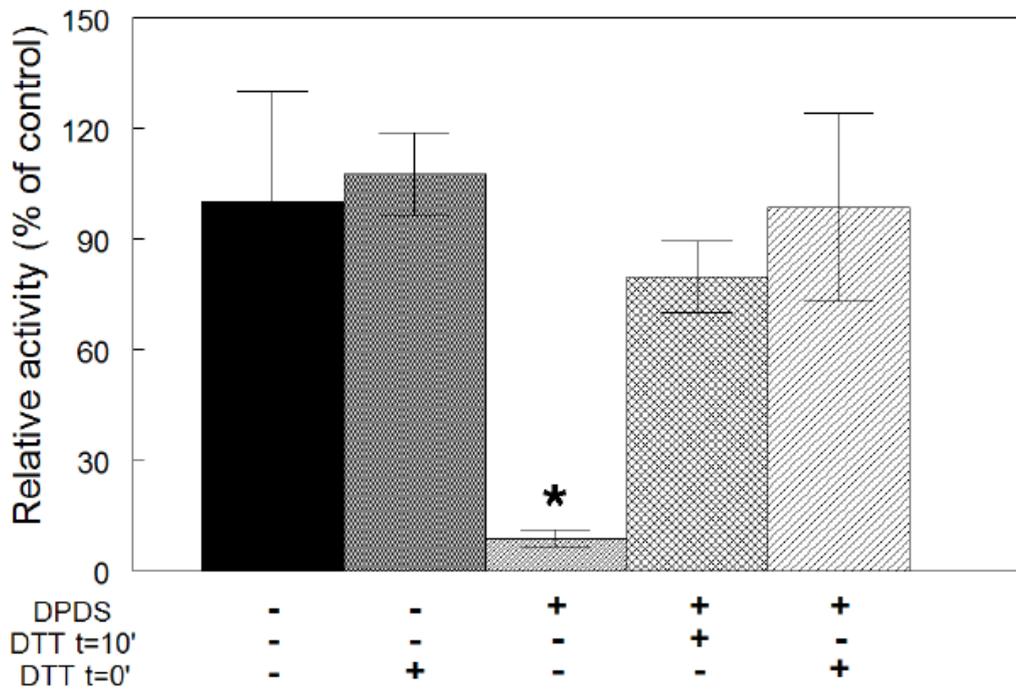


Figure 6A

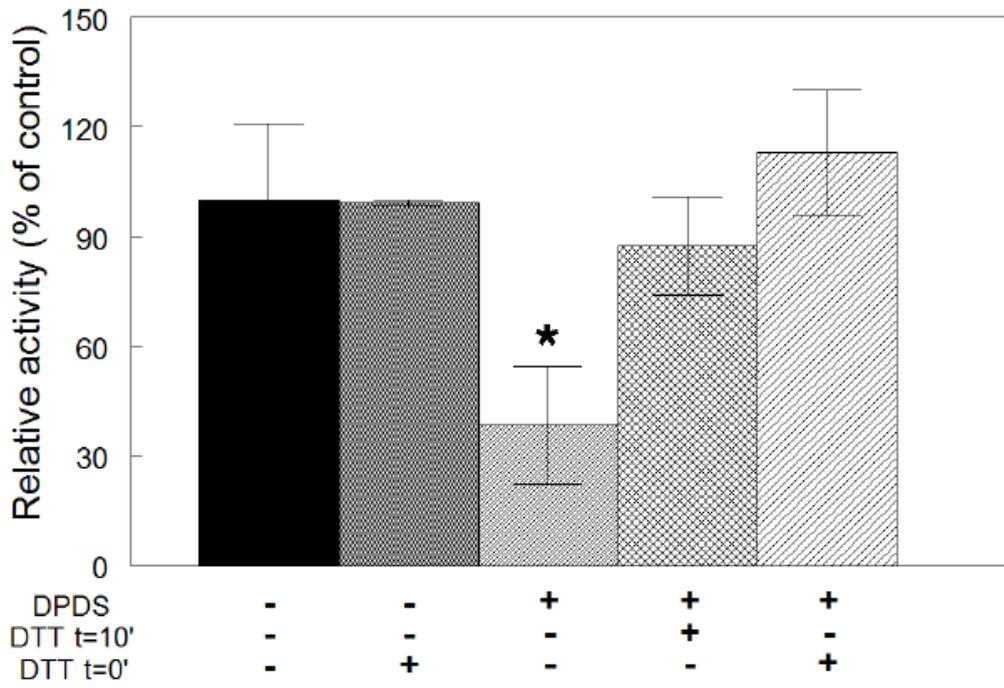


Figure 6B

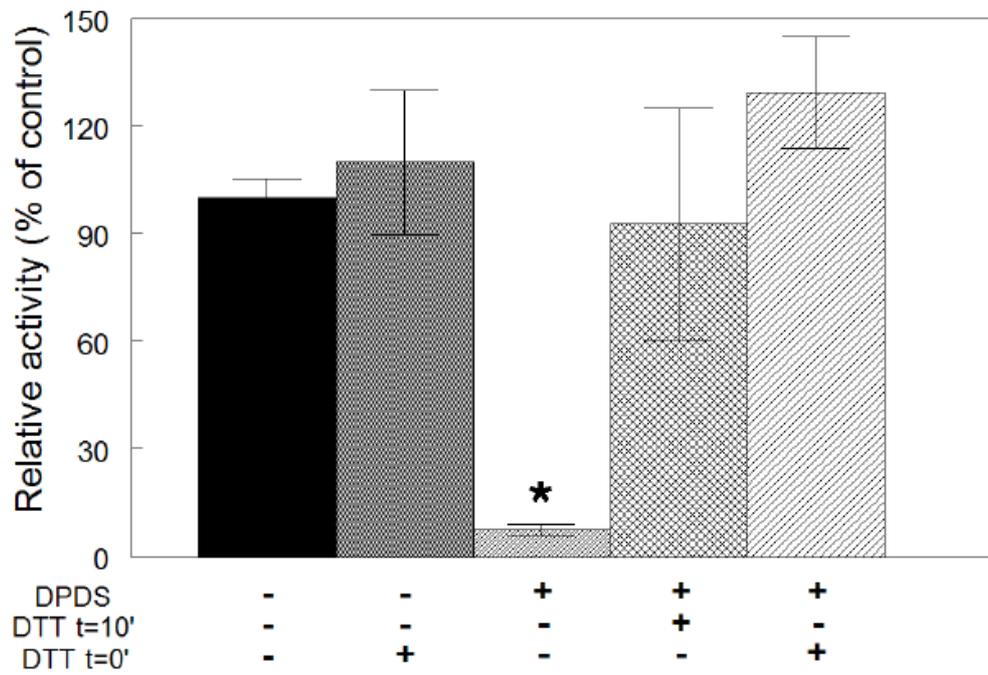


Figure 6C

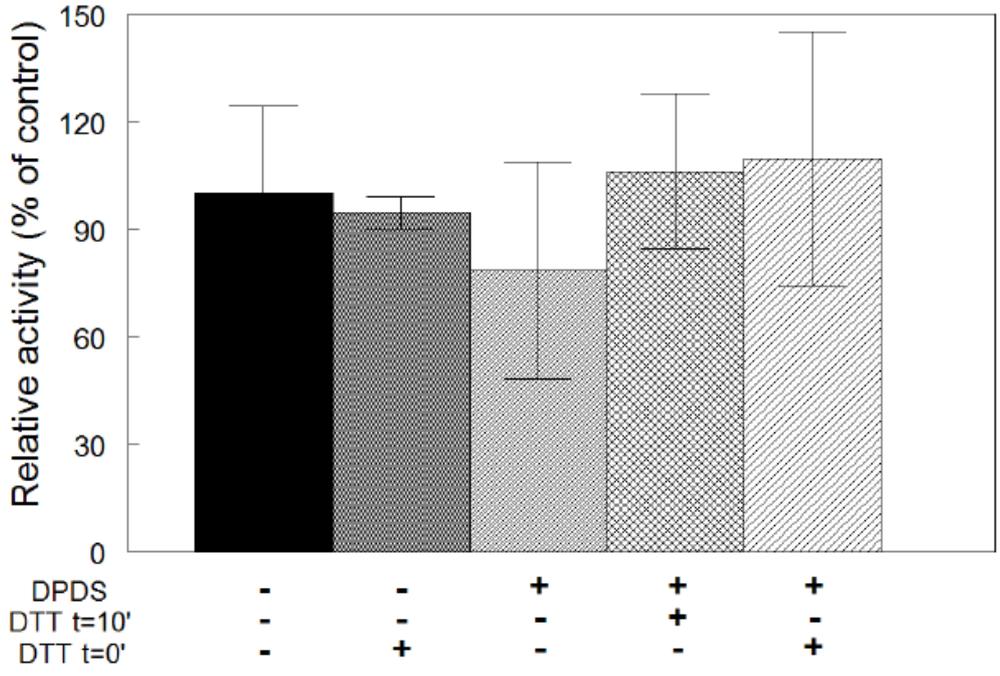


Figure 6D

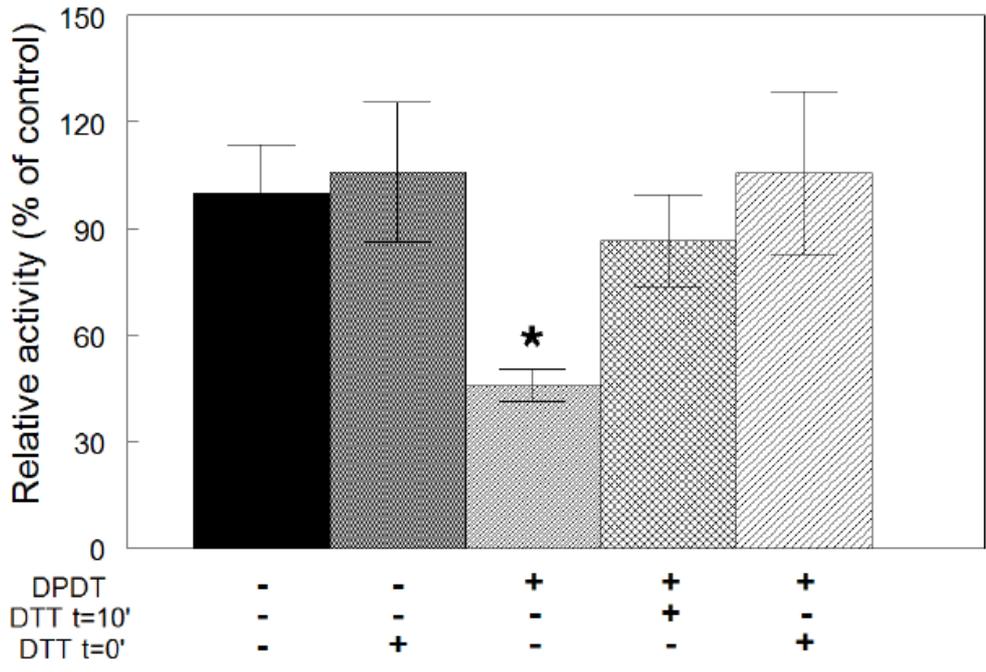


Figure 7A

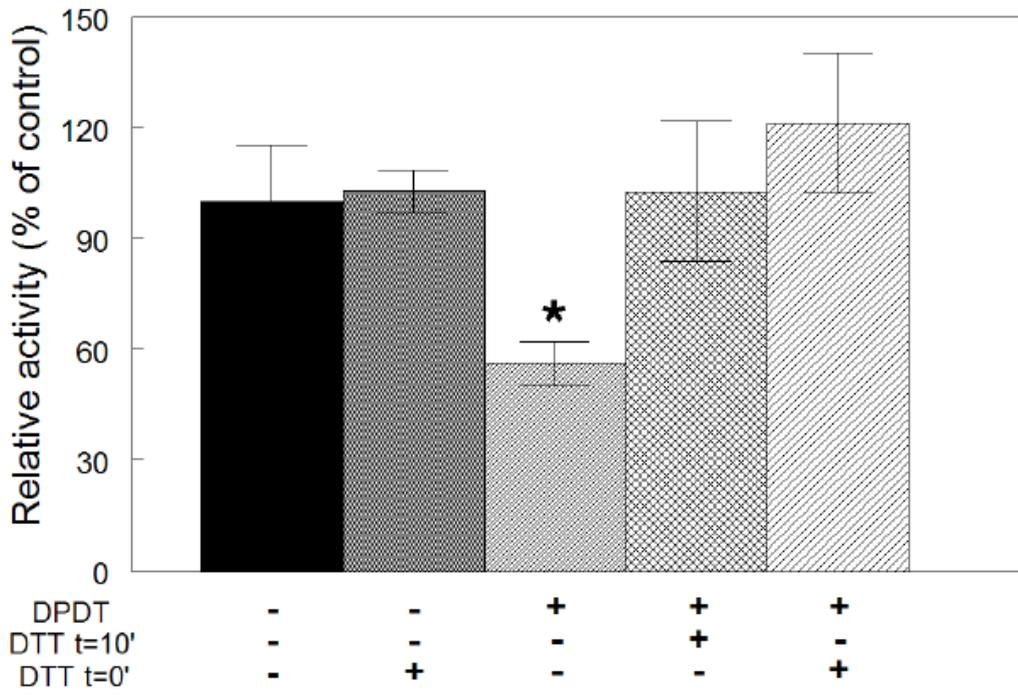


Figure 7B

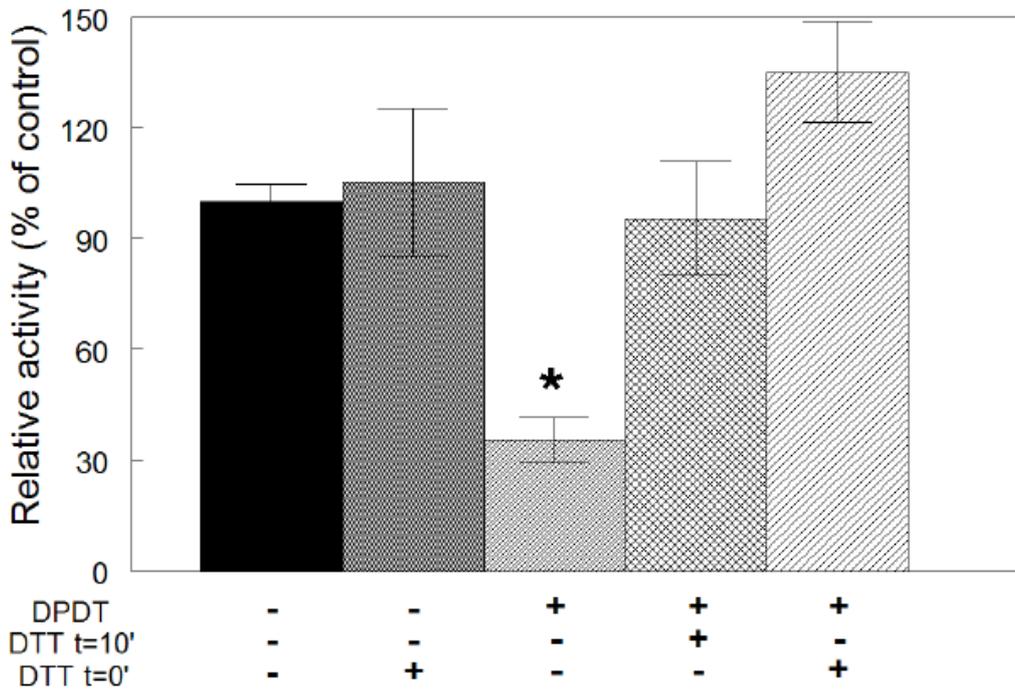


Figure 7C

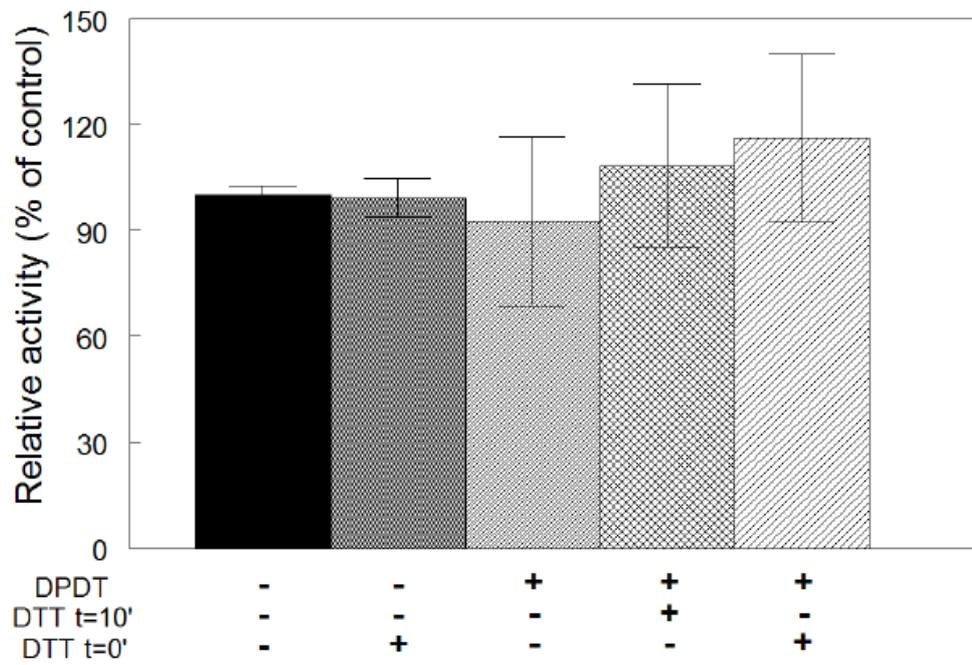


Figure 7D

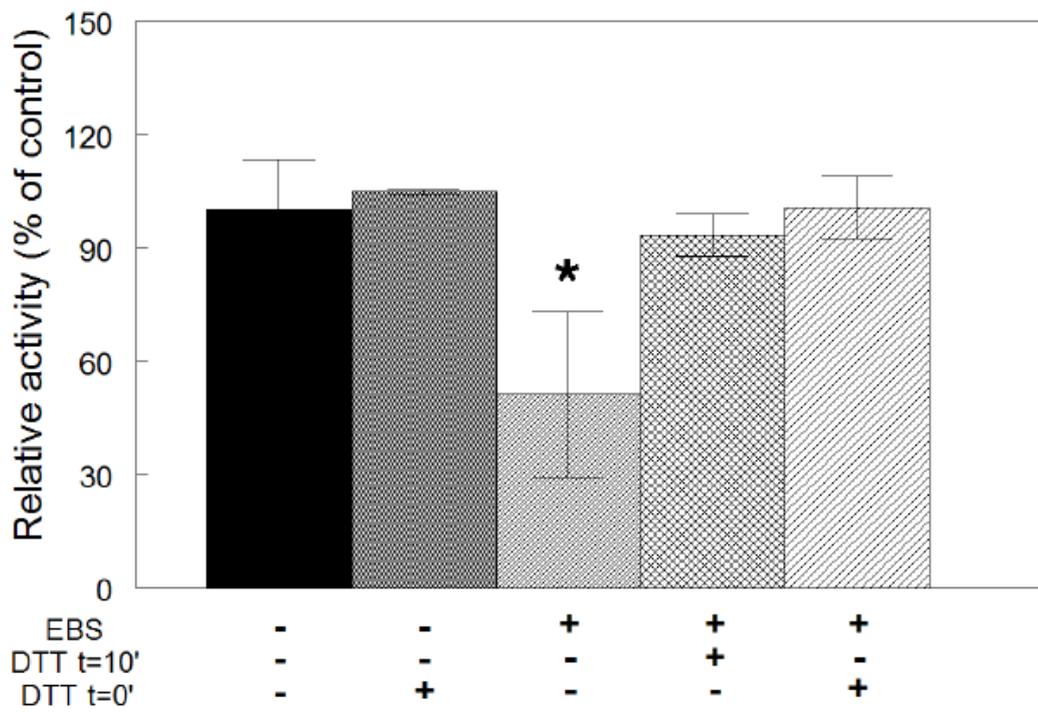


Figure 8A

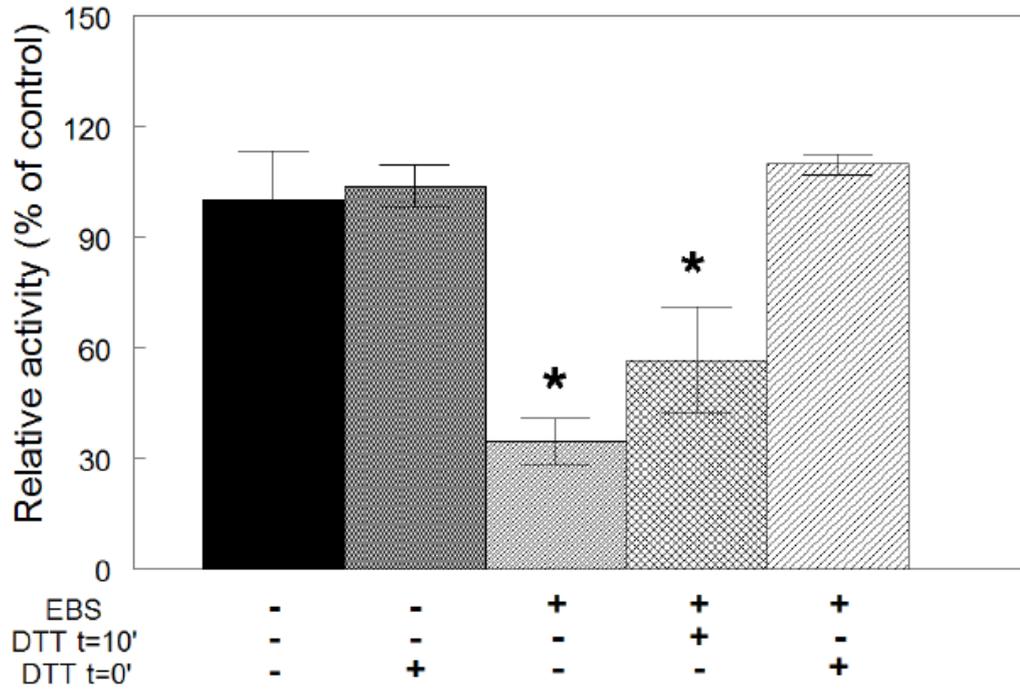


Figure 8B

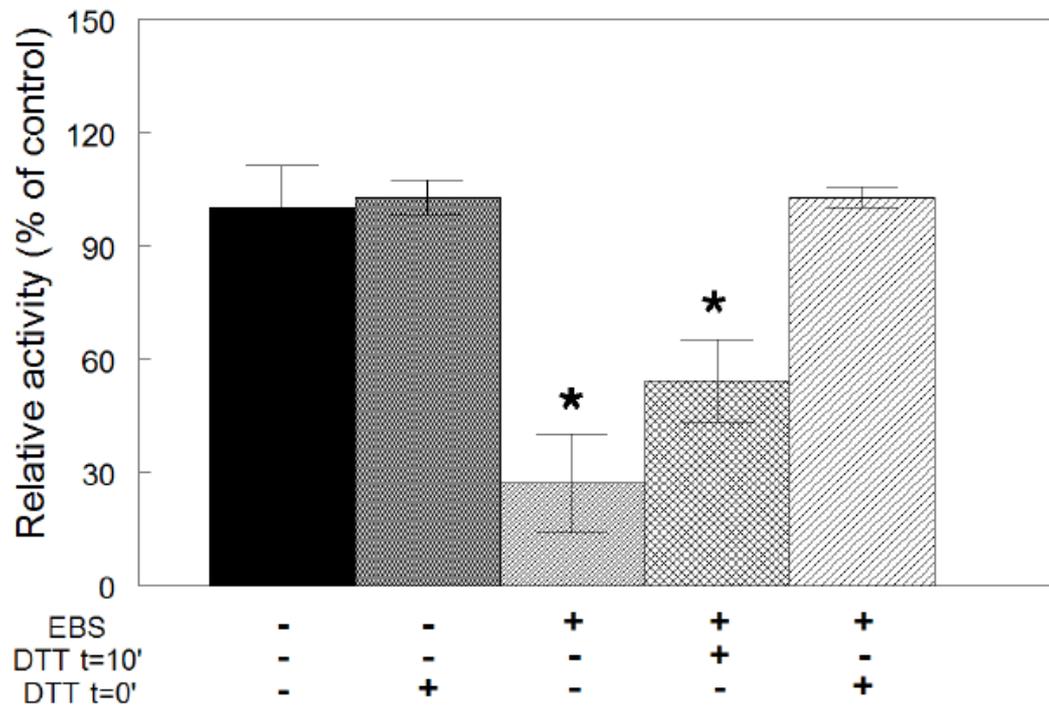


Figure 8C

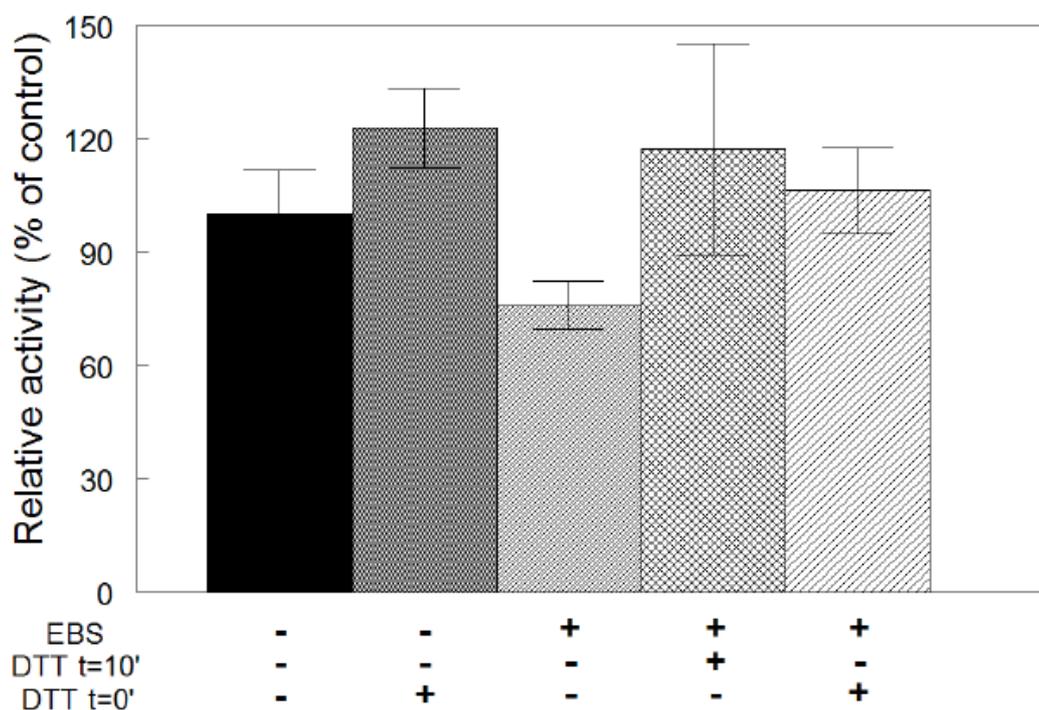


Figure 8D

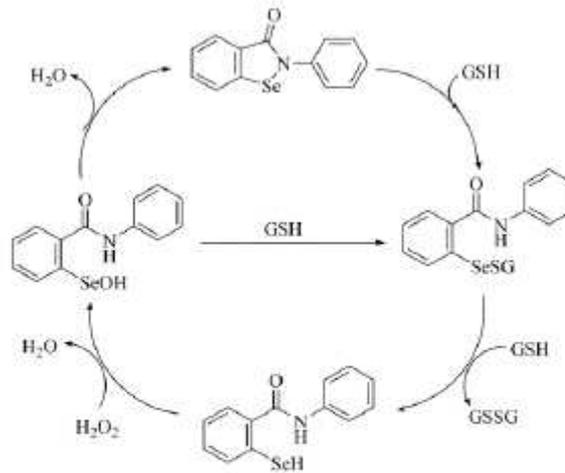
Table 1 – IC<sub>50</sub> values for LDH inhibition with ebselen, diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>) and diphenyl ditelluride ((PhTe)<sub>2</sub>), in four situations: (A) enzyme in the presence of the substrate (lactate); (B) enzyme in the presence of the cofactor (NAD<sup>+</sup>); (C) enzyme without both cofactor and substrate; (D) with substrate and cofactor, and reaction started with the enzyme.

Compound	Incubation	IC <sub>50</sub>		
		Liver	Heart	Purified
(PHSE) <sub>2</sub>	(A) Lactate	26.38 ± 2.39 <sup>a,1</sup>	18.44 ± 2.28 <sup>a,2</sup>	4.34 ± 1.87 <sup>a,3</sup>
	(B) NAD <sup>+</sup>	24.20 ± 0.91 <sup>a,1</sup>	17.39 ± 3.2 <sup>a,1</sup>	3.02 ± 1.25 <sup>a,2</sup>
	(C) Only LDH	14.06 ± 4.22 <sup>b,1</sup>	27.72 ± 10.62 <sup>b,1</sup>	15.81 ± 0.75 <sup>b,1</sup>
	(D) No LDH	179.26 ± 44.18 <sup>c,1</sup>	nc	81.81 ± 22.20 <sup>c,2</sup>
Ebselen	(A) Lactate	7.64 ± 0.38 <sup>a,1</sup>	3.35 ± 0.94 <sup>a,2</sup>	0.57 ± 0.08 <sup>a,3</sup>
	(B) NAD	9.14 ± 0.17 <sup>a,1</sup>	5.16 ± 0.55 <sup>ab,2</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>ab,3</sup>
	(C) Only LDH	11.00 ± 1.96 <sup>a,1</sup>	3.78 ± 2.39 <sup>a,2</sup>	0.82 ± 0.3 <sup>b,2</sup>
	(D) No LDH	63.16 ± 14.23 <sup>b,1</sup>	nc	2.82 ± 0.05 <sup>c,2</sup>
(PHTE) <sub>2</sub>	(A) Lactate	87.44 ± 1.68 <sup>a,1</sup>	67.31 ± 2.21 <sup>a,2</sup>	31.23 ± 2.67 <sup>a,3</sup>
	(B) NAD	74.65 ± 3.45 <sup>a,1</sup>	68.68 ± 3.23 <sup>a,1</sup>	13.6 ± 2.67 <sup>a,2</sup>
	(C) Only LDH	136.17 ± 33.86 <sup>ab,1</sup>	nc	52.77 ± 4.73 <sup>b,2</sup>
	(D) No LDH	190.25 ± 25.87 <sup>b</sup>	nc	nc

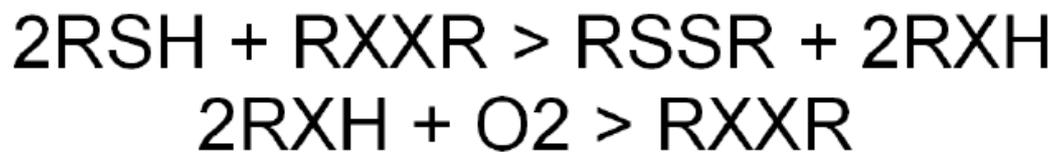
<sup>a,b,c</sup> Different letters show statistically difference between incubation situations, for the same compound and LDH source (at least p<0.05).

<sup>1,2,3</sup> Different numbers show statistically difference between different LDH sources, for the same compound and incubation situation (at least p<0.05).

nc – not calculated



Scheme 1



Scheme 2

## 5 - Discussão

Considerando que a LDH é uma enzima contendo grupamentos sulfidril e que possui uma função central no metabolismo celular (Jeong e cols., 2006) objetivou-se determinar se esta enzima poderia ser considerada um alvo molecular de toxicidade para a atividade tiol-oxidase do ebselen, uma importante molécula antioxidante que tem sido usada em diferentes modelos de doenças e também em algumas tentativas clínicas com relativo sucesso (Delanty & Dichter, 2000; Imai e cols., 2003; Schewe, 1995), bem como do (PhSe)<sub>2</sub> (o qual recentemente mostrou ser um inibidor da LDH (Kade e cols., 2008) e (PhTe)<sub>2</sub>. Assim, este trabalho investigou se o ebselen, o (PhSe)<sub>2</sub> e o (PhTe)<sub>2</sub> apresentam algum grau de seletividade em inibir diferentes isoformas da LDH e também avaliou se a direção da reação (lactato à piruvato ou piruvato à lactato) poderia mudar a potência inibitória destes compostos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, o (PhSe)<sub>2</sub>, o (PhTe)<sub>2</sub> e, principalmente, o ebselen são fortes inibidores da LDH purificada de músculo esquelético de coelhos, e da LDH de fígado e coração de ratos. Esta inibição provavelmente envolve a interação entre os organocalcogênios com os resíduos sulfidril essenciais da enzima LDH. Embora esses resíduos não estejam localizados no sítio catalítico da enzima e não combinem com o substrato durante o processo catalítico, a oxidação destes grupos sulfidril leva a uma forma enzimática inativa. A importância destes resíduos tem sido bem descritas na literatura (Zheng e cols., 2003; Abad-Zapatero e cols., 1987; Pamp e cols., 2005).

Neste trabalho é possível observar que quando a LDH de diferentes origens foi incubada com NAD<sup>+</sup> ou lactato, a inibição da enzima foi maior que

quando incubada sem o cofator e o substrato. Esses estudos sugerem que a presença do substrato ou do cofator no meio de reação poderia estar facilitando o acesso dos grupos sulfidril da LDH aos organocalcogênios, aumentando dessa maneira a inibição da enzima. Esta hipótese está de acordo com o trabalho prévio de Pamp e cols. (2005) o qual mostrou que a presença de  $\text{NAD}^+$  aumenta a acessibilidade de grupos sulfidril enzimáticos a inibição da LDH mediada por  $\text{Cu(II)}$  em condições *in vitro*. Contudo, quando a reação foi iniciada com a adição da enzima, quase nenhum efeito inibitório dos compostos foi observado sobre a atividade da LDH, sugerindo que em condições fisiológicas o lactato e o  $\text{NAD}^+$  em conjunto possam ter um efeito protetor sobre a LDH. De fato, trabalho prévio de Barbosa e cols. (2008) demonstrou nenhum efeito inibitório de altas doses de  $(\text{PhSe})_2$  sobre a atividade da LDH de ratos em condições *in vivo*, o que pode ser explicado tanto por um efeito protetor do substrato e do cofator em conjunto, tanto como uma possível baixa afinidade do  $(\text{PhSe})_2$  pelos grupos sulfidril da LDH quando comparado a outras fontes de grupos -SH, oxidando primariamente estas últimas em condições *in vivo*.

Além disso, pode-se sugerir a presença de um fator não-competitivo na inibição da LDH pelos organocalcogênios, em LDH de fígado e coração de ratos, em vista da ausência de inibição quando a reação foi iniciada com a adição da enzima. Contudo, não pode ser descartada a possibilidade de que, ao menos em parte, a ausência de atividade inibitória, mesmo *in vitro*, possa envolver um efeito protetor do substrato e cofator, quando incubados juntos, sobre a atividade da LDH inibida pelos compostos testados. Outra possibilidade que não pode ser descartada é ausência de inibição enzimática devido ao pouco tempo de exposição da enzima ao composto nesta condição testada.

No geral, verifica-se que a LDH purificada apresenta maior susceptibilidade à ação dos compostos, seguida pela fonte enzimática cardíaca e hepática. Este efeito pode ser devido a interação exclusiva dos compostos com grupos –SH da LDH, à única fonte disponível de grupos tiólicos no meio.

Para corroborar a hipótese do envolvimento da oxidação de grupos tiól na inibição da LDH de diferentes tecidos e o mecanismo de toxicidade do ebselen,  $(\text{PhTe})_2$  e  $(\text{PhSe})_2$ , foi testado o efeito protetor do DTT, um agente sulfidrilico redutor, na inibição da LDH induzida pelos organocalcogênios. Foi possível observar que o DTT, quando incubado em conjunto com os organocalcogênios, preveniu a inibição da LDH em todas as situações de incubação testadas, deixando claro o envolvimento da oxidação de grupos tióis essenciais no processo de inibição da LDH pelos organocalcogênios. Além disso, quando o DTT foi adicionado ao meio de incubação 10 minutos após o  $(\text{PhTe})_2$  e  $(\text{PhSe})_2$ , ocorreu também a reativação da enzima. Para o caso do ebselen, o efeito do DTT em restaurar ou proteger a atividade da LDH dependeu do meio de incubação: quando o composto foi incubado com a enzima mais  $\text{NAD}^+$ , DTT foi capaz de prevenir e também reativar a atividade da LDH. Contudo, quando ebselen foi incubado com a LDH mais lactato ou com a enzima sozinha, DTT teve somente um efeito protetor, desde que quando o DTT foi adicionado 10 minutos após a exposição da enzima ao ebselen, este agente redutor não reverteu a inibição induzida por este organocalcogênio. Estes resultados são de particular importância para trabalhos subseqüentes que avaliem a liberação da LDH como um marcador de morte celular, uma vez que a inibição desta enzima pelos organocalcogênios pode representar um

efeito protetor falso. Além disso, para o caso do ebselen, a reativação da LDH por DTT só acontece na presença do  $\text{NAD}^+$ .

## 6 – Conclusões

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir:

O ebselen, o  $(\text{PhSe})_2$  e o  $(\text{PhTe})_2$  foram capazes de inibir a enzima LDH, sugerindo que esta enzima pode ser um possível alvo toxicológico destes compostos;

O ebselen foi o mais potente inibidor da LDH de todas as fontes testadas, seguido pelo  $(\text{PhSe})_2$  e  $(\text{PhTe})_2$ ;

A reação piruvato  $\rightarrow$  lactato, catalisada pela LDH, foi mais sensível à inibição induzida pelo  $(\text{PhSe})_2$  do que a reação lactato  $\rightarrow$  piruvato.

A presença do substrato ou cofator aumentou a inibição da LDH causada por todos os compostos testados, para as três fontes da enzima;

O DTT protegeu/reactivou a LDH inibida pelos compostos testados, confirmando o possível envolvimento da oxidação de grupos tióis enzimáticos essenciais no processo inibitório induzido por organocalcogênios;

## 7 - Referencias

ABAD-ZAPATERO C., GRIFFITH J.P., SUSSMAN J.L., ROSSMANN M.G., Refined crystal structure of dogfish M4 apo-lactate dehydrogenase, **J Mol Biol** v.198, p.445-467. 1987.

AGNEW, W. F. e CURRY, E. Period of teratogenic vulnerability of rat embryo to induction of hydrocephalus by tellurium. **Experientia**, v.28, p.1444-1445. 1972.

ARTEEL G.E., SIES H., The biochemistry of selenium and the glutathione system, **Environ Toxicol Pharmacol**, v.10, p.153-158. 2001.

BARBOSA, N. B., ROCHA, J. B., ZENI, G., EMANUELLI, T., BEQUE, M. C. e BRAGA, A. L. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.149, p.243-53. 1998.

BARBOSA, N. B., ROCHA, J. B., SOARES, J. C., WONDRACK, D. C., GONÇALVES, J. F., SCHETINGER, M. R., NOGUEIRA, C. W. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. **Food Chem Toxicol**, v.46, p.189-194. 2008.

BAUMGART, E., FAHIMI, H. D., STICH, A. e VOLKL, A. L-lactate dehydrogenase A4- and A3B isoforms are bona fide peroxisomal enzymes in rat liver. Evidence for involvement in intraperoxisomal NADH reoxidation. **J Biol Chem**, v.271, p.3846-3855. 1996.

BEHNE, D., KYRIAKOPOULOS, A., MEINHOLD, H. e KOHRLE, J. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochem Biophys Res Commun**, v.173, p.1143-1149. 1990.

BLAIS, F. X., ONISCHUK, R. T. e DEMEIO, R. H. Hemolysis by tellurite. I. The tellurite test for hemolysis. **J Am Osteopath Assoc**, v.72, p.207-210. 1972.

BORGES, L. P., BORGES, V. C., MORO, A. V., NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B. e ZENI, G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, v.210, p.1-8. 2005a.

BORGES, V. C., ROCHA, J. B. e NOGUEIRA, C. W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. **Toxicology**, v.215, p.191-197. 2005b.

BORGES, L. P., NOGUEIRA, C. W., PANATIERI, R. B., ROCHA, J. B. e ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem Biol Interact**, v.160, p.99-107. 2006.

BOUZIER-SORE, A. K., MERLE, M., MAGISTRETTI, P. J. e PELLERIN, L. Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. **J Physiol Paris**, v.96, p.273-82. 2002.

BRAGA, A. L., SILVEIRA, C. C., ZENI, G., SEVERO, W. A. e STEFANI, H. A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J Chem Res**, v.5, p.206-207. 1996.

BRAGA, A. L., ZENI, G., ANDRADE, L. H. e SILVEIRA, C. C. Stereoconservative formation and reactivity of  $\alpha$ -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinyllic chalcogens. **Synlett**, v.5, p.595-596. 1997.

BROOKS, G. A. Mammalian fuel utilization during sustained exercise. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v.120, p.89-107. 1998.

BROOKS, G. A. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, p.790-799. 2000.

BROOKS, G. A., BROWN, M. A., BUTZ, C. E., SICURELLO, J. P. e DUBOUCHAUD, H. Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. **J Appl Physiol**, v.87, p.1713-1718. 1999a.

BROOKS, G. A., DUBOUCHAUD, H., BROWN, M., SICURELLO, J. P. e BUTZ, C. E. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, p.1129-1134. 1999.

BROOKS, G. A. Lactate shuttle -- between but not within cells? **J Physiol**, v.541, p.333-334. 2002a.

BROOKS, G. A. Lactate shuttles in nature. **Biochem Soc Trans**, v.30, p.258-264. 2002b.

BURGER, M. E., FACHINETTO, R., CALEGARI, L., PAIXÃO, M. W., BRAGA, A. L. e ROCHA, J. B. T. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Res Bull**, v.64, p.339-345. 2004.

BURGER, M. E., FACHINETTO, R., WAGNER, C., PEROTTONI, J., PEREIRA, R. P., ZENI, G. e ROCHA, J. B. Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. **Brain Res Bull**, v.70, p.165-170. 2006.

COMASSETO, J. V. Vinylic Selenides. **J Organ Chem**, v.253, p.131-181. 1983.

COTGREAVE I.A., MORGENSTERN R., ENGMAN L., AHOKAS J., Characterisation and quantitation of a selenol intermediate in the reaction of ebselen with thiols, **Chem Biol Interact** v.84, p.69-76. 1992.

DELANTY, N., DICHTER, M. A. Antioxidant therapy in neurologic disease, **Arch Neurol**, v.57, p.1265-1270. 2000.

DEUTICKE, B., LUTKEMEIER, P. e POSER, B. Tellurite-induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v.1109, p.97-107. 1992.

ENGMAN L., ANDERSSON C., MORGENSTERN R., COTGREAVE I.A., ANDERSSON C.M., HALLBERG A., Evidence for a common selenolate intermediate in the glutathione peroxidase-like catalysis of A-(phenylselenenyl) ketones and diphenyl diselenide, **Tetrahedron**, v.50, p.2929-2938. 1994.

ENGMAN L., PERSSON J., VESSMAN K., EKSTROM M., BERGLUND M., ANDERSSON C.M., Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol, **Free Radic Biol Med**, v.19, p.441-452. 1995.

ENGMAN, L., AL-MAHARIC, N., MCNAUGHTON, M., BIRMINGHAM, A. e POWIS, G. Thioredoxin Reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. **Bioorg Medic Chem**, v.11, p.5091-5100. 2000a.

ENGMAN, L., KANDRA, T., GALLEGOS, A., WILLIAMS, R. e POWIS, G. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. **Anticancer Drug Des**, v.15, p.323-330. 2000b.

FACHINETTO, R., PIVETTA, L. A., FARINA, M., PEREIRA, R. P., NOGUEIRA, C. W. e ROCHA, J. B. Effects of ethanol and diphenyl diselenide exposure on the activity of delta-aminolevulinatase from mouse liver and brain. **Food Chem Toxicol**, v.44, p.588-594. 2006.

FARINA M., FOLMER V., BOLZAN R.C., ANDRADE L.H., ZENI G., BRAGA A.L., ROCHA J.B., Selenoxides inhibit delta-aminolevulinic acid dehydratase, **Toxicol Lett** v.119, p.27-37. 2001.

FARINA, M., BARBOSA, N. B., NOGUEIRA, C. W., FOLMER, V., ZENI, G., ANDRADE, L. H., BRAGA, A. L. e ROCHA, J. B. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase from rat liver and cucumber leaves. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.623-631. 2002.

FOLMER, V., SOARES, J. C., GABRIEL, D. e ROCHA, J. B. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **J Nutr**, v.133, p.2165-2170. 2003.

FOLMER, V., SOARES, J. C. e ROCHA, J. B. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. **Int J Biochem Cell Biol**, v.34, p.1279-1285. 2002.

GALET V., BERNIER J.L., HENICHART J.P., LESIEUR D., ABADIE C., ROCHETTE L., LINDENBAUM A., CHALAS J., RENAUD DE LA FAVERIE J.F., PFEIFFER B., Benzoselenazolinone derivatives designed to be glutathione peroxidase mimetics feature inhibition of cyclooxygenase/5-lipoxygenase pathways and anti-inflammatory activity, **J Med Chem**, v.37, p.2903-2911. 1994.

GHISLENI, G., PORCIUNCULA, L. O., CIMAROSTI, H., BATISTA, T. R. J., SALBEGO, C. G. e SOUZA, D. O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoreactivity. **Brain Res**, v.986, p.196-199. 2003.

GLADDEN, L. B. Lactic acid: a new roles in a new millennium. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, p.395-397. 2001.

GLADDEN, L. B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **J Physiol**, v.558, p.5-30. 2004.

GOLDBERG E., Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa, **Science**, v.139, p.602-603. 1963.

GOLOMBIESKI R.M., GRAICHEN D.A., PIVETTA L.A., NOGUEIRA C.W., LORETO E.L., ROCHA J.B., Diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>] inhibits *Drosophila melanogaster* delta-aminolevulinatase dehydratase (delta-ALA-D) gene transcription and enzyme activity, **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.147, p.198-204. 2008.

GROGAN, T. M., FENOGLIO-RIESER, C., ZEHEB, R., BELLAMY, W., FRUTIGER, Y., VELA, E., STEMMERMAN, G., MACDONALD, J., RICHTER, L., GALLEGOS, A. e POWIS, G. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. **Hum Pathol**, v.31, p.475-481. 2000.

GULOTTA, M., DENG, H., DYER, R. B. e CALLENDER, R. H. Toward an understanding of the role of dynamics on enzymatic catalysis in lactate dehydrogenase. **Biochemistry**, v.41, p.3353-3363. 2002.

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

IMAI, H., GRAHAM, D. I., MASAYASU, H., MACRAE, I. M. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia, **Free Radic Biol Med**, v.34, p.56-63, 2003.

IWASE, K., TATSUSHI, T., NISHIMURA, Y., YAMAGUCHI, J. Y., OYAMA, Y., MIYOSHI, N. e WADA, M. Cytometric analysis of adverse action of

diphenyl ditelluride on rat thymocytes: cell shrinkage as a cytotoxic parameter. **Environ Toxicol**, v.19, p.614-619. 2004.

JACQUEMIN P.V., CHRISTIAENS L.E., RENSON M.J., Synthesis of 2H-3,4-dihydro-1,2-benzoselenazin-3-one and derivatives – a new heterocyclic ring-system, **Tetrahedron Lett**, 1992.

JEONG, D. W., CHO, I. T., KIM, T. S., BAE, G. W., KIM, I. H. e KIM, I. Y. Effects of lactate dehydrogenase suppression and glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism. **Mol Cell Biochem**, v.284, p.1-8. 2006.

JORGENSEN, P. L. Structure, function and regulation of Na,K-ATPase in the kidney. **Kidney Int**, v.29, p.10-20. 1986.

KLAMAN, D. Organotellurium compounds. In: (Ed.). **Methods of organic chemistry**. New York: George Thieme Verlag Stuttgart, 1990. Organotellurium compounds.

KLOTZ, L. O. e SIES, H. Defenses against peroxyxynitrite: selenocompounds and flavonoids. **Toxicol Lett**, v.140, p.125-132. 2003.

KONDOH, S., NAGASAWA, S., KAWANISHI, M., YAMAGUCHI, K., KAJIMOTO, S. e OHTA, T. Effects of ebselen on cerebral ischemia and reperfusion evaluated by microdialysis. **Neurol Res**, v.21, p.682-686. 1999.

KONO, H., ARTEEL, G. E., RUSYN, I., SIES, H. e THURMAN, R. G. Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats. **Free Radic Biol Med**, v.30, p.403-411. 2001.

KOYANAGI, T., NAKAMUTA, M., ENJOJI, M., IWAMOTO, H., MOTOMURA, K., SAKAI, H. e NAWATA, H. The selenoorganic compound

ebesen suppresses liver injury induced by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide in rats. **Int J Mol Med**, v.7, p.321-327. 2001.

LE BRAS G., GAREL J.R., Properties of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus*: a possible different evolutionary origin for the D- and L-lactate dehydrogenases, **FEMS Microbiol Lett**, v.63, p.89-93. 1991.

LI, Q. J., BESSEMS, J. G., COMMANDEUR, J. N., ADAMS, B. e VERMEULEN, N. P. Mechanism of protection of ebesen against paracetamol-induced toxicity in rat hepatocytes. **Biochem Pharmacol**, v.48, p.1631-1640. 1994.

LUCHESE, C., STANGHERLIN, E. C., ARDAIS, A. P., NOGUEIRA, C. W. e SANTOS, F. W. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. **Toxicology**, v.230, p.189-196. 2007.

MACIEL, E. N., BOLZAN, R. C., BRAGA, A. L. e ROCHA, J. B. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of mice. **J Biochem Mol Toxicol**, v.14, p.310-319. 2000.

MACIEL, E. N., FLORES, E. M., ROCHA, J. B. e FOLMER, V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.70, p.470-476. 2003.

MAGISTRETTI, P. J. e PELLERIN, L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.354, p.1155-1163. 1999.

MAGISTRETTI, P. J., PELLERIN, L., ROTHMAN, D. L. e SHULMAN, R. G. Energy on demand. **Science**, v.283, p.496-497. 1999.

MAIORINO M., ROVERI A., COASSIN M., URSINI F., Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51), **Biochem Pharmacol**, v.37, p.2267-2271. 1988.

MAIORINO, M., ROVERI, A. e URSINI, F. Antioxidant effect of Ebselen (PZ 51): peroxidase mimetic activity on phospholipid and cholesterol hydroperoxides vs free radical scavenger activity. **Arch Biochem Biophys**, v.295, p.404-409. 1992.

MASUMOTO, H. e SIES, H. The reaction of ebselen with peroxyxynitrite. **Chem Res Toxicol**, v.9, p.262-267. 1996.

MATHEWS, C.K., VAN HOLDE, K.E., AHERN, K.G. Biochemistry, p.648. Addison-Wesley Longman, Inc, New York. 2000.

MCCLELLAND, G. B., KHANNA, S., GONZALEZ, G. F., BUTZ, C. E. e BROOKS, G. A. Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? **Biochem Biophys Res Commun**, v.304, p.130-135. 2003.

MCGROARTY, E., HSIEH, B., WIED, D.M. GEE, R., TOLBERT, N.E. Alpha hydroxyl acid oxidation by peroxisomes. **Arch Biochem Biophys**, v.161, p.194-210. 1974.

MEOTTI, F. C., BORGES, V. C., ZENI, G., ROCHA, J. B. e NOGUEIRA, C. W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicol Lett**, v.143, p.9-16. 2003.

MORETTO, M. B., FUNCHAL, C., ZENI, G., ROCHA, J. B. e PESSOA-PUREUR, R. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. **Toxicology**, v.210, p.213-222. 2005.

MUGESH G., SINGH H.B., Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity, **Chem Soc Rev**, v.29, p.347–357. 2000.

MUGESH, G., DU MONT, W. W. e SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chem Rev**, v.101, p.2125-2179. 2001.

MULLER, A., GABRIEL, H. e SIES, H. A novel biologically active selenoorganic compound--IV. Protective glutathione-dependent effect of PZ 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. **Biochem Pharmacol**, v.34, p.1185-1189. 1985.

NOGUEIRA, C. W., ROTTA, L. N., PERRY, M. L., SOUZA, D. O. e DA ROCHA, J. B. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Res**, v.906, p.157-163. 2001.

NOGUEIRA, C. W., ROTTA, L. N., ZENI, G., SOUZA, D. O. e ROCHA, J. B. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. **Neurochem Res**, v.27, p.283-288. 2002.

NOGUEIRA, C. W., BORGES, V. C., ZENI, G. e ROCHA, J. B. Organochalcogens effects on delta-aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, v.191, p.169-178. 2003.

NOGUEIRA, C. W., ZENI, G. e ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, v.104, p.6255-6285. 2004.

OSMUNDSEN, H. Factors which can influence beta-oxidation by peroxisomes isolated from livers of clofibrate treated rats. Some properties of

peroxisomal fractions isolated in a self-generated Percoll gradient by vertical rotor centrifugation. **Int J Biochem**, v.14, p.905-914. 1982.

OZAKI, M., NAKAMURA, M., TERAOKA, S. e OTA, K. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. **Transpl Int**, v.10, p.96-102. 1997.

PAMP K., BRAMEY T., KIRSCH M., DE GROOT H., PETRAT F., NAD(H) enhances the Cu(II)-mediated inactivation of lactate dehydrogenase by increasing the accessibility of sulfhydryl groups, **Free Radic Res** 39: 31-40. 2005.

PARNHAM, M. J. e GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. **Biochem Pharmacol**, v.36, p.3095-3102. 1987.

PAULMIER, C. Selenium reagents and intermediates. In: **Organic Synthesis**. Oxford: Pergamon, 1986.

PEIXOTO, N. C., ROZA, T., FLORES, E. M. e PEREIRA, M. E. Effects of zinc and cadmium on HgCl<sub>2</sub>-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicol Lett**, v.146, p.17-25. 2003.

PEIXOTO, N. C., ROZA, T. e PEREIRA, M. E. Sensitivity of delta-ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals in vitro depends on the stage of postnatal growth and tissue. **Toxicol In Vitro**, v.18, p.805-809. 2004.

PEIXOTO, N. C., KRATZ, C. P., ROZA, T., MORSCH, V. M. e PEREIRA, M. E. Effects of HgCl<sub>2</sub> on porphobilinogen-synthase (E.C. 4.2.1.24) activity and on mercury levels in rats exposed during different precocious periods of postnatal life. **Cell Biol Int**, v.31, p.1057-1062. 2007.

PELLERIN, L. e MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, p.10625-10629. 1994.

PELLERIN, L. e MAGISTRETTI, P. J. How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. **J Physiol**, v.546, p.325. 2003.

PEREZ-D'GREGORIO, R. E. e MILLER, R. K. Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. **Teratology**, v.37, p.307-316. 1988.

PEROTTONI, J., LOBATO, L. P., SILVEIRA, A., ROCHA, J. B. e EMANUELLI, T. Effects of mercury and selenite on delta-aminolevulinatase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. **Environ Res**, v.95, p.166-173. 2004.

PEROTTONI, J., MEOTTI, F. C., FOLMER, V., PIVETTA, L. A., NOGUEIRA, C. W., ZENI, G. e ROCHA, J. B. T. Ebselen and diphenyl diselenide do not change the inhibitory effect of lead acetate on delta-aminolevulinatase dehidratase. **Environ Tox Pharmacol**, v.19, p.239-248. 2005.

PETRAGNANI, N., RODRIGUES, R. e COMASSETO, J. V. **Organomet Chem**, v.15, p.114-281. 1976.

PHILLIPS D., BLAKE C.C.F., WATSON H.C., The enzymes of glycolysis: structure, activity and evolution, **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.293, p.1-214. 1981.

PRIGOL M., WILHELM E.A., SCHNEIDER C.C., ROCHA J.B., NOGUEIRA C.W., ZENI G., Involvement of oxidative stress in seizures induced by diphenyl diselenide in rat pups, **Brain Res**, v.1147, p.226-232. 2007.

PUNTEL R.L., ROOS D.H., PAIXAO M.W., BRAGA A.L., ZENI G., NOGUEIRA C.W., ROCHA J.B., Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive

species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride, **Chem Biol Interact**, v.165, p.87-98. 2007

ROTRUCK, J. T., POPE, A. L., GANTHER, H. E., SWANSON, A. B., HAFEMAN, D. G. e HOEKSTRA, W. G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, p.588-590. 1973.

SANTOS, F. W., ZENI, G., ROCHA, J. B., DO NASCIMENTO, P. C., MARQUES, M. S. e NOGUEIRA, C. W. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food Chem Toxicol**, v.43, p.1723-1730. 2005a.

SANTOS, F. W., ZENI, G., ROCHA, J. B., WEIS, S. N., FACHINETTO, J. M., FAVERO, A. M. e NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chem Biol Interact**, v.151, p.159-165. 2005b.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen—an anti-inflammatory antioxidant, **Gen Pharmacol**, v.26, p. 1153-1169, 1995.

SHAKLEE J.B., KEPES K.L., WHITT G.S., Specialized lactate dehydrogenase isozymes: the molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes, **J Exp Zool**, v.185, p.217-240. 1973.

SIES H., Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic, **Free Radic Biol Med**, v.14, p,313-323, 1993.

SIES H., Ebselen, **Methods Enzymol**, v.252, p.341-342, 1995.

SOARES, J. C., FOLMER, V. e ROCHA, J. B. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition**, v.19, p.627-632. 2003.

TAN, Y. X., LI, W. H., TAO, X. B., JIANG, Y. Y., CHEN, W. P. e ZHOU, B. Protection of ebselen against anoxic damage of cultured neurons of cerebral cortex. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, v.18, p.201-203. 1997.

TAYLOR, A. Biochemistry of tellurium. **Biol Trace Elem Res**, v.55, p.231-239. 1996.

TOEWS, A. D., ECKERMANN, C. E., ROBERSON, M. D., LEE, S. Y. e MORELL, P. Primary demyelination induced by exposure to tellurium alters mRNA levels for nerve growth factor receptor, SCIP, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, and myelin proteolipid protein in rat sciatic nerve. **Brain Res Mol Brain Res**, v.11, p.321-325. 1991.

ULLRICH, V., WEBER, P., MEISCH, F. e VON APPEN, F. Ebselen-binding equilibria between plasma and target proteins. **Biochem Pharmacol**, v.52, p.15-19. 1996.

URSINI, F., HEIM, S., KIESS, M., MAIORINO, M., ROVERI, A., WISSING, J. e FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v.285, p.1393-1396. 1990.

VAN ROERMUND, C. W., ELGERSMA, Y., SINGH, N., WANDERS, R. J. e TABAK, H. F. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. **EMBO J**, v.14, p.3480-3486. 1995.

VINALS C., DE BOLLE X., DEPIEREUX E., FEYTMANS E., Knowledge-based modeling of the D-lactate dehydrogenase three-dimensional structure, **Proteins**, v.21, p.307-318. 1995.

WAAGEPETERSEN, H. S., SONNEWALD, U., LARSSON, O. M. e SCHOUSBOE, A. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. **J Neurochem**, v.75, p.471-479. 2000.

WASSER, S., LIM, G. Y., ONG, C. N. e TAN, C. E. Anti-oxidant ebselen causes the resolution of experimentally induced hepatic fibrosis in rats. **J Gastroenterol Hepatol**, v.16, p.1244-1253. 2001.

WENDEL, A., FAUSEL, M., SAFAYHI, H., TIEGS, G. e OTTER, R. A novel biologically active seleno-organic compound--II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. **Biochem Pharmacol**, v.33, p.3241-3245. 1984.

WILSON, S. R., ZUCKER, P. A., HUANG, R. R. C. e SPECTOR, A. Development of synthetic compound with glutathione peroxidase activity. **Journal American Chemical Society**, v.111. 1989.

WÖHLER, F. **Ann Chemistry**. 35, p.111. 1840.

YAMAGUCHI, T., SANO, K., TAKAKURA, K., SAITO, I., SHINOHARA, Y., ASANO, T. e YASUHARA, H. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. **Stroke**, v.29, p.12-17. 1998.

ZHAO, R., HOLMGREN, A., A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase, **J Biol Chem**, v.277, p.39456-39462. 2002.

ZHAO, R., MASAYASU, H., HOLMGREN, A., Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant, **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, p.8579-8584. 2002.

ZHENG Y.B., WANG Z., CHEN B.Y., WANG X.C., Multiple effects of chemical reagent on enzyme: o-phthalaldehyde-induced inactivation, dissociation and partial unfolding of lactate dehydrogenase from pig heart, **Int J Biol Macromol**, v.32, p.191-197. 2003.