

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

**EFEITO TERATOGENICO DO DITELURETO DE
DIFENILA, ADMINISTRADO DURANTE A GESTAÇÃO
EM RATAS E EFEITO DE ORGANOCALCOGÊNIOS
SOBRE A REPRODUÇÃO EM RATOS MACHOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eluza Curte Stangherlin

**Santa Maria, RS, Brasil
2004**

**EFEITO TERATOGENICO DO DITELURETO DE DIFENILA,
ADMINISTRADO DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS E
EFEITO DE ORGANOCALCOGÊNIOS SOBRE A
REPRODUÇÃO EM RATOS MACHOS**

por

Eluza Curte Stangherlin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em 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

2004

*Ao meu baby,
que está me fazendo ver a gestação com outros olhos...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por estar sempre ao meu lado, por ter criado a ciência e tudo mais que nos cerca.

Aos meus pais, pelo exemplo de responsabilidade, amor e dedicação que norteiam a minha vida. À vocês, que sacrificaram os seus sonhos em favor dos meus, não sei se palavras conseguiriam traduzir o que eu sinto! Muito obrigado, eu amo muito vocês!

Ao Alberto, minha porção melhor, meu chão, por existir, pelo amor incondicional, pelo carinho, pelo apoio, pelo bebezinho que eu carrego, e ao Bruno, pelo carinho e pela paciência comigo.

À Cadinha e ao Marcos, ao Fi e a Ana, por fazerem parte da minha família, pelo companheirismo, pelo “ombro amigo”, em todas as horas, amo muito vocês também!

Aos meus orientadores, Cris e GZ por me darem a oportunidade de tentar ser alguém, por acreditarem nos meus sonhos, e por serem pessoas tão maravilhosas, compreensivas e dedicadas. Agradeço por terem me ensinado muito mais do que eu poderia imaginar. Muito obrigado a vocês, avós científicos...

Ao Alex, meu braço direito, exemplo de perfeccionismo, inteligência, dedicação e otimismo (“mas, vai dar certo, Eluza, eu vou tentar!”) e à Simone, que nos últimos tempos sempre esteve do nosso lado.

Ao Sérgio Silveira, que nos ajudou com seus conhecimentos técnicos e amizade.

Às Superpoderosas (Fran, Vanessa e Lu) pelo companheirismo, humor, trabalho e principalmente pela amizade.

Ao pessoal do laboratório, Ju, Ana Banana, Carlos Eduardo, Dionéia, Carol e ao pessoal que está começando. Ao ex-pessoal do laboratório que está longe, buscando as suas realizações, mas que de alguma forma fizeram parte da minha vida, Tati, Gi, Márcio, Flávia, Fabrício, Eduardo, Dionei...

À Nilda e ao Prof. João Batista, pelo apoio, pelo exemplo de trabalho, de dedicação, pela sabedoria, e é claro, pelo Fred e pelo Toby!

À Fernanda, ao Febem e ao pessoal do laboratório do Prof. João, ao Rodrigo, que acha que “a maternidade me caiu bem”, ao Shumacher, ao Jesus, ao Joel, à Angélica e ao pessoal do laboratório do Prof. Gilson e do Prof. Braga, por terem compartilhado os momentos especiais.

À CAPES, pela bolsa concedida. À UFSM, pela infra-estrutura e pela qualidade do ensino público e gratuito, fundamental para a minha formação profissional e pessoal.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO TERATOGENICO DO DITELURETO DE DIFENILA, ADMINISTRADO DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS E EFEITO DE ORGANOCALCOGÊNIOS SOBRE A REPRODUÇÃO EM RATOS MACHOS

AUTORA: ELUZA CURTE STANGHERLIN

ORIENTADORA: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

CO-ORIENTADOR: GILSON ROGÉRIO ZENI

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 30 de Julho de 2004

Os organocalcogênios são importantes intermediários e reagentes utilizados em síntese orgânica e em processos industriais, portanto o risco de intoxicação por exposição ocupacional a estes compostos aumenta. O efeito da administração s.c., única, de ditelureto de difenila ((PhTe)₂) foi avaliado nos dias 6, 10 ou 17 da gestação de ratas Wistar. No final do período experimental não foram observadas alterações no organismo materno. O (PhTe)₂ induziu o aparecimento de malformações fetais, tais como deformações nos membros inferiores e superiores, ausência de cauda ou cauda diminuída, coágulos sangüíneos subcutâneos, exoftalmia, hidrocefalia e presença de cérebro exposto, quando as ratas mães receberam este composto no dia 10 da gestação. Além disso, essa mesma administração reduziu os pesos corporal e cerebral, o comprimento dos rins, as medidas de dimensão corporal e provocou uma taxa de mortalidade fetal de 73%. A administração de (PhTe)₂ no dia 17 da gestação induziu o aparecimento de hidrocefalia e edema nos fetos, além de 94% de mortalidade e alterações nas medidas de dimensão corporal fetal. Avaliações histológicas demonstraram as alterações acima descritas. Então, o (PhTe)₂ pode ser teratogênico para fetos de rato. Dessa forma, os dois últimos períodos gestacionais em ratas são os períodos críticos para a indução de anormalidades, no modelo experimental estudado. Outro foco deste estudo foi a avaliação do efeito de organocalcogênios sobre o sistema reprodutivo e a fertilidade de ratos machos. Os ratos receberam (PhTe)₂ ou disseleneto de difenila ((PhSe)₂), em doses únicas antes do acasalamento. Sinais clínicos da toxicidade das drogas foram evidenciados pela redução do peso corporal dos ratos. Entretanto, oito dias depois da exposição aos compostos, os índices de acasalamento e fertilidade não foram afetados. Vários parâmetros bioquímicos foram testados nos testículos desses animais, tais como as atividades das enzimas ácido δ-aminolenulínico desidratase e superóxido dismutase, a peroxidação lipídica, o conteúdo de glicogênio e a concentração de ácido ascórbico. Exceto por uma diminuição no conteúdo de glicogênio testicular no grupo tratado com (PhSe)₂, não houve alteração nos outros parâmetros bioquímicos estudados. A avaliação histológica revelou que o tecido testicular não sofreu mudanças após a administração das drogas. Baseados nesses resultados, não foi observada toxicidade reprodutiva em ratos machos expostos agudamente ao (PhTe)₂ ou (PhSe)₂.

Palavras-chave: Organocalcogênios, gestação, reprodução.

ABSTRACT

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

TERATOGENIC EFFECT OF DIPHENYL DITELLURIDE, ADMINISTERED DURING THE GESTATION IN RATS AND EFFECT OF ORGANOCHALCOGENS ON THE REPRODUCTION IN THE MALE RATS

AUTHOR: ELUZA CURTE STANGHERLIN

ADVISOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

CO-ADVISOR: GILSON ROGÉRIO ZENI

Date and Place of the Defense: Santa Maria, July 30, 2004

Organochalcogens are important intermediates and the main applied reagents in organic synthesis and in industrial processes, which can increase human exposure risk to these chemicals in the workplace. The effects of single subcutaneous (s.c.) injection of diphenyl ditelluride ((PhTe)₂) at days 6, 10 or 17 of gestation were evaluated in Wistar rats. No alterations were observed in maternal organism at the end of the experimental period. Maternal injections at day 10 of gestation resulted in appearance of malformation in the inferior and superior limbs, absent or short tail, subcutaneous blood clots, exophthalmia, hydrocephalus and exposed brain in fetuses on day 20 of gestation. Besides, (PhTe)₂ reduced the fetal body and cerebral weight, kidneys length, measurements of body dimension and provoked 73% of fetal mortality. The administration of (PhTe)₂ at day 17 of gestation induced appearance of hydrocephalus and evident edema in fetuses on day 20 of gestation. This administration caused 94% of fetal mortality and alterations at measurements of body dimension. Histological evaluations demonstrated alterations in GD10 and GD17. Thus, (PhTe)₂ can be teratogenic to the rat fetuses. The two last fetal periods of development in the rat are the critical periods for induction of anomalies induced by (PhTe)₂. Other focus of this study was the evaluation of effect of organochalcogens on the fertility and reproductive system of male rats. Adult male rats were exposed acutely (single dose) to diphenyl diselenide ((PhSe)₂) and diphenyl ditelluride prior to mating. Clinical signs of toxicity following administration of drug were evidenced for reduction of body weight of rats. However, eight days after compounds exposure the mating and fertility indices were not affected in treated groups. A number of biochemical parameters in rat testes were examined, such as δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity, lipid peroxidation, glycogen content and components of the antioxidant defenses (superoxide dismutase (SOD) activity and ascorbic acid concentration). Except for a decrease in testes glycogen content on (PhSe)₂-treated group, no alterations were found on treated groups. Histological evaluation revealed that no modification were found on the testicular tissue after drugs administration. Based on these results, there was no observed reproductive toxicity in male Wistar rats exposed acutely to (PhTe)₂ and (PhSe)₂.

Keywords: organochalcogens, gestation, reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sistema reprodutor masculino.....	6
Figura 2. Estrutura do testículo e sua relação com o epidídimo.....	7
Figura 3. Structure of diphenyl ditelluride.	36
Figura 4. External measurements performed in day 20 rat fetuses.	26
Figura 5. Maternal body weight gain during the gestation.....	36
Figura 6. Histological evaluation of the fetus heads (sagittal section), with 20 days of intrauterine life, exposed to (PhTe) ₂ at GD10.....	38
Figura 7. Histological evaluation of the fetus heads (sagittal section), with 20 days of intrauterine life, exposed to (PhTe) ₂ at GD17.....	38
Figura 8. Histological evaluation of the posterior half of the fetus neck, with 20 days of intrauterine life, exposed to (PhTe) ₂ at GD17.....	39
Figura 9. Histological evaluation of anterior half of the neck of the fetus, with 20 days of intrauterine life, exposed to (PhTe) ₂ at GD17.....	39
Figura 10. Structure of diphenyl diselenide (a) and diphenyl ditelluride (b)	56
Figura 11. Effect of diphenyl ditelluride acute exposure on body weight gain in male rats.	56
Figura 12. Effect of diphenyl diselenide acute exposure on body weight gain in male rats.....	57
Figura 13. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on testicular glycogen content.....	57
Figura 14. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on lipid peroxidation.....	58
Figura 15. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on testis ascorbic acid level.....	58

Figura 16. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on δ -ALA-D activity.....	59
Figura 17. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on superoxide dismutase activity in rats.....	59
Figura 18. Testicular sections of control rat (a and d), diphenyl ditelluride (b and e) and diphenyl diselenide (c and f) treated rats..	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Evaluation of maternal body weight, fetal parameters, numbers of fetal deaths, numbers of live fetuses, numbers of litters with malformed fetuses and the characteristics of malformations.	34
Tabela 2. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide acute exposure on fertility and reproductive performance of male Wistar rats.....	54

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	v
LISTA DE TABELAS	vi
APRESENTAÇÃO	ix
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Teratologia	2
I.1.1. Histórico	3
I.1.2. Agentes Teratogênicos	4
I.1.3. Princípios da Teratologia.....	5
I.2. Reprodução em mamíferos machos	6
I.2.1. A fisiologia do aparelho reprodutor de mamíferos machos	6
I.2.2. Toxicidade reprodutiva em machos	8
I.3. Organocalcogênios	10
I.3.1. Telúrio	10
I.3.1.1. Potencial farmacológico.....	11
I.3.1.2. Propriedades toxicológicas.....	11
I.3.1.3. O telúrio e a toxicidade desenvolvimental	13
I.3.1.4. O telúrio e a reprodução em ratos machos	14
I.3.2. Selênio	14
I.3.2.1. Atividade biológica	15
I.3.2.2. Propriedades farmacológicas.....	16
I.3.2.3. Propriedades toxicológicas.....	16
I.3.2.4. O selênio e a reprodução em ratos machos	18
I.4. OBJETIVOS	19
II. ARTIGOS CIENTÍFICOS	20

II.1. CAPÍTULO 1 - EFEITO TERATOGÊNICO DO DITELURETO DE DIFENILA, ADMINISTRADO DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS WISTAR	21
II.1.1. Artigo 1 – STANGHERLIN, E.C.; Favero, A.M.; Rocha, J.B.T.; Zeni, G.; Nogueira, C.W. Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. Submetido à Toxicology, está em fase de revisão.....	22
II.1.1.1. Abstract.....	23
II.1.1.2. Introduction.....	24
II.1.1.3. Materials and methods.....	25
II.1.1.4. Results.....	27
II.1.1.5. Discussion.....	29
II.1.1.6. References.....	31
II.2. CAPÍTULO 2 – EFEITO DE ORGANOCALCOGÊNIOS SOBRE O REPRODUÇÃO MASCULINA, EM RATOS WISTAR	40
II.2.1. Artigo 2 – STANGHERLIN, E.C.; Favero, A.M.; Rocha, J.B.T.; Zeni, G.; Nogueira, C.W. Absence of reproductive toxicity in male rats following acute exposure to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. Submetido à Toxicology.....	41
II.2.1.1. Abstract.....	42
II.2.1.2. Introduction.....	43
II.2.1.3. Materials and methods.....	44
II.2.1.4. Results.....	48
II.2.1.5. Discussion.....	49
II.2.1.6. References.....	50
III. DISCUSSÃO	62
IV. CONCLUSÕES	67
V. PERSPECTIVAS	69
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

APRESENTAÇÃO

No item I, INTRODUÇÃO, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados estão apresentados sob a forma de artigos, submetidos à publicação, os quais encontram-se organizados em dois capítulos, no item II. Os artigos científicos estão descritos na sua íntegra, com introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas, e representam a totalidade deste estudo.

No item III, DISCUSSÃO, estão apresentadas as interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos aqui apresentados. Também estão expostos alguns pontos de vista da autora em relação aos resultados obtidos.

No item IV, CONCLUSÕES, são apresentadas as conclusões gerais do presente trabalho.

No item V, PERSPECTIVAS, estão expostos possíveis estudos para continuação do estudo da autora, referentes a esse assunto.

O item VI, REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, refere-se somente as citações que aparecem na Introdução e nas Conclusões desta dissertação.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Teratologia

Teratologia, segundo o Dicionário Internacional de Medicina e Biologia (1986), é “o estudo do desenvolvimento anormal. Mais particularmente, é o estudo das causas, mecanismos e manifestações do desenvolvimento anormal, que podem ser induzidas geneticamente, durante a gestação ou após o nascimento e que se expressam como letalidade, malformação, retardo no crescimento ou desordem funcional”.

Por isso, as substâncias que têm a capacidade de produzir dano ao embrião ou feto durante a gestação são ditas agentes teratogênicos ou teratógenos. Estes danos podem se refletir como perda da gestação, malformações ou alterações funcionais (retardo de crescimento, por exemplo), ou ainda distúrbios neuro-comportamentais, como retardo mental (Kalter, 2003).

Os agentes teratogênicos atuam sobre períodos críticos do desenvolvimento, também chamados de período alvo de indução de alterações. O período crítico representa uma única etapa no desenvolvimento, que não pode ser revertida ou repetida posteriormente. Está baseado no fato de que processos organizacionais são modificados ou interrompidos neste período. Os períodos críticos apresentam duração e importância que dependerá da velocidade de mudança nestes processos. Em um cérebro embriônico, por exemplo, muitos processos críticos têm sua atividade acelerada por curtos períodos de tempo, quando então cessam completamente. Ou, um processo pode inicialmente proceder rapidamente e se manter em um nível baixo de atividade, mas nunca cessar inteiramente (Morgane et al., 2002).

A vulnerabilidade do conceito implica no fato de que a organização de um processo é suscetível a perturbações, das mais diversas naturezas (Morgane et al., 2002). Essas perturbações podem se expressar na forma de malformações congênitas, que são defeitos estruturais presentes ao nascimento e atribuídos a falhas no desenvolvimento (Carter, 1963). Eles podem ser grosseiros ou microscópicos, estar na superfície do corpo ou dentro dele, ser hereditária ou não hereditária, simples ou múltipla (Warkany, 1947).

I.1.1. Histórico

A teratologia, o estudo das anormalidades do recém nascido é uma velha preocupação humana. Não surpreendentemente, determinadas condições afligem a humanidade. Já na antiguidade, evidências antropológicas pré-históricas e registros escritos a esse respeito datam de cerca de cinco mil anos atrás. Sendo assim, o nascimento de pessoas com malformações estimulou a imaginação humana, e por séculos essas pessoas foram tratadas como monstros, aberrações da natureza. Ao longo dos anos, no entanto, as pesquisas foram se intensificando com o intuito de esclarecer o que realmente estava acontecendo (Kalter, 2003).

Sendo assim, através da história, o nascimento de fetos malformados têm sido documentado e as atitudes para com essas crianças e seus pais variam de acordo com o estado cultural das pessoas, que oscilam a partir da admiração para a rejeição e a hostilidade.

Anteriormente se acreditava que embriões de mamíferos, que se desenvolviam nos úteros dito “impenetráveis” de suas mães, estavam protegidos de todo e qualquer fator extrínseco. Entretanto, após o desastre da talidomida, na década de 60, se tornou mais claro e aceitável que os embriões em desenvolvimento poderiam estar vulneráveis a determinados agentes ambientais, os quais tinham efeitos desprezíveis ou não-tóxicos para indivíduos adultos (Smithells & Newman, 1992).

A talidomida foi um medicamento comercializado como um sedativo moderado, usado para diminuir as náuseas em mulheres grávidas. Poucos anos depois, se retirou a talidomida do mercado, pois foi descoberto que se tratava de um teratógeno para humanos. Quantidades pequenas, como as referentes a uma simples dose, foram suficientes para causar defeitos significativos ao nascimento. Milhares de crianças malformadas nasceram de mulheres que ingeriram a talidomida durante a gestação. Os fetos expostos à talidomida apresentaram intestinos malformados, defeitos na audição, ausência de orelhas e/ou anomalias renais e oculares. No entanto, o fenótipo que mais chamou a atenção foi a focomelia: graves malformações nos membros, cujos ossos longos se encontravam reduzidos no seu comprimento ou estavam totalmente ausentes, e dedos surgiam a partir dos ombros (Smithells & Newman, 1992).

Hoje, a teratologia é simplesmente a ciência que trata do desenvolvimento anormal e das malformações congênitas, sem referência à monstruosidade, e é aceita pela comunidade biomédica mundial (Kalter, 2003).

Nos anais da teratologia humana, os mais notórios exemplos de malformações estão relacionados com o SNC (Sistema Nervoso Central). As alterações características compreendem defeitos na embriogênese, resultando em uma formação anormal do tubo neural (TNA), (que originará o cérebro e o cordão espinal) (Little & Elwood, 1991). Essas alterações podem se manifestar como anencefalia e espinha bífida, sendo que a frequência das alterações pode variar com a raça, o grupo étnico, a localização geográfica e o sexo - a ocorrência das alterações é maior em fêmeas do que em machos (Murphy et al., 1996). Dois procedimentos têm sido sugeridos no tratamento de TNA: diagnóstico prenatal com eliminação eletiva dos fetos afetados, anulando seu nascimento (Cragan et al., 1995) ou suplementação vitamínica com ácido fólico antes e durante a gestação, para evitar o desenvolvimento de TNA (Oakley et al., 1994). Estudos dos últimos anos apontam para uma ocorrência de cerca de 3% de malformações congênitas graves, em crianças examinadas no período neonatal (Kalter, 2003).

I.1.2. Agentes Teratogênicos

No início deste século, trabalhos usando a indução de malformações congênitas começaram a ser desenvolvidos em animais, incluindo mamíferos (Kalter, 2003).

Vários fatores são capazes de induzir um desenvolvimento anormal, como por exemplo a radiação, agentes infecciosos, fármacos, doenças, intoxicação por metais pesados, etc. Estudos epidemiológicos que levaram em conta diversos fatores - tais como idade materna, saúde antes, durante e após a gestação, e história reprodutiva prévia - indicaram que a radiação (raios X) é um risco sério para o desenvolvimento intra-uterino, porque leva ao aparecimento de fetos mortos ou com anormalidades congênitas (Murphy, 1929; Goldstein & Murphy, 1929). Outro tipo de radiação que causa preocupação pelas suas conseqüências sobre o organismo humano é a radiação atômica. Nas explosões das bombas atômicas em Hiroshima e Nagasaki, em 1945, por exemplo, muitas crianças japonesas que estavam se desenvolvendo foram afetadas, e nasceram com anormalidades. Uma das malformações que apareceram foi a microcefalia, isto é, a redução significativa da circunferência da cabeça do feto, com subsequente retardo mental (Warkany et al., 1981).

Agentes infecciosos também são capazes de induzir malformações. Os efeitos pré-natais do vírus da rubéola são um exemplo clássico na teratologia. Entre várias alterações, destacam-se os defeitos cardíacos e oculares (Swan & Tostevin, 1946) causados por esse vírus. Outros agentes causadores de infecções são conhecidos por induzirem diversos tipos de alterações

congênitas, como por exemplo, o vírus influenza (Arvin & Maldonado, 1995), o citomegalovírus (Stagno, 1995), o protozoário parasita *Toxoplasma gondii*, (Alford et al., 1983; Remington et al., 1995) e o vírus Varicella-zoster (Alkalay et al., 1987; Higa et al., 1987; Gershon, 1995).

Alguns fármacos são também conhecidos por induzirem malformações congênitas. A Talidomida, relatada anteriormente, é o exemplo mais clássico. Podem ser citados, entre outros: o dietilstilbestrol, indicado para conter hemorragias (Giusti et al., 1995); o ácido retinóico, utilizado no tratamento da acne (Soprano & Soprano, 1995); o ácido valpróico, um anticonvulsivante (Nau et al., 1991; Ehlers et al., 1992) e o lítio, usado no tratamento de distúrbios neurológicos (Fries, 1970; Silverman et al., 1971). Diante dessa realidade, de que os medicamentos podem ser teratogênicos, muitas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de esclarecer o possível potencial embrio/fetotóxico de fármacos (Schüler et al., 1999).

Doenças também podem causar defeitos no desenvolvimento. É o caso da fenilcetonúria (Levy et al., 1982, 2001; Rouse et al., 1990, 2000; Platt et al., 2000) e do diabetes mellitus (Kalter, 1993), onde aparecem diversas manifestações de anormalidades.

Por fim, metais pesados como mercúrio, chumbo e cádmio podem induzir malformações congênitas. Várias formas orgânicas de mercúrio, especialmente o metilmercúrio, são conhecidas por causar numerosas patologias cerebrais, incluindo atrofia, hipoplasia, citoarquitetura anormal do córtex cerebral e várias alterações no cerebelo (Nelson et al., 1971; Myers & Davidson, 1998; Harada, 1995). O chumbo causa prejuízo no desenvolvimento cerebral de fetos, quando administrado em ratas prenhas (Moreira et al., 2001). O cádmio, que assim como o chumbo tem importância industrial e também é um poluente ambiental, exerce atividades teratogênica e carcinogênica (Mahalik et al., 1995).

Diante desses achados, saber se um agente pode atuar como um teratogêno é importante não só para que se possa prevenir o aparecimento de anormalidades congênitas, como também para que se possam desenvolver drogas que sejam seguras para o uso terapêutico em mulheres grávidas.

I.1.3. Princípios da Teratologia

Diante da consciência a respeito da vulnerabilidade do feto *in utero*, elaborou-se o que ficou conhecido como “Os seis princípios da teratologia”, aplicáveis para a teratologia experimental em mamíferos (Wilson & Warkany, 1965):

1. A suscetibilidade à teratogênese depende do genótipo do conceito e a maneira com que ele interage com fatores ambientais;
2. A suscetibilidade a agentes teratogênicos varia com o estágio do desenvolvimento e o tempo de exposição à influência adversa;
3. Os agentes teratogênicos atuam por caminhos específicos (mecanismos) no desenvolvimento das células e dos tecidos para iniciar os eventos de um desenvolvimento anormal (patogênese);
4. O acesso das influências adversas ambientais aos tecidos em desenvolvimento depende da natureza dessas influências (agentes);
5. As manifestações finais de um desenvolvimento anormal são morte, malformação, retardo no crescimento e déficit funcional;
6. As manifestações de desvio de desenvolvimento aumentam em frequência e em níveis com o aumento das dosagens, desde um nível sem efeito até um nível máximo de letalidade total.

Esses princípios são importantes para que se possa entender melhor como determinados agentes teratogênicos atuam sobre o organismo, principalmente de mamíferos.

I.2. Reprodução em mamíferos machos

Outro assunto de interesse desta dissertação são os efeitos de compostos químicos sobre o sistema reprodutor de mamíferos machos.

I.2.1. A fisiologia do aparelho reprodutor de mamíferos machos

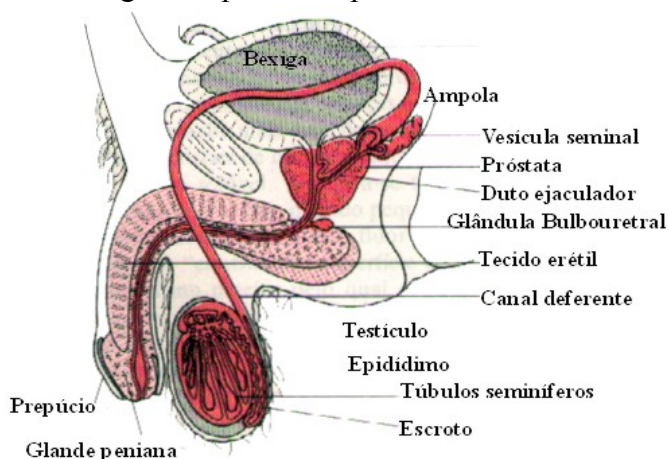


Figura 1. Sistema reprodutor masculino (Guyton, 1992).

O sistema reprodutor dos machos é composto de órgãos e glândulas sexuais acessórias, como mostra a figura 1. O testículo é composto de até 900 túbulos seminíferos enovelados, cada um com mais de meio metro de comprimento em média, onde são formados os espermatozóides. A seguir, os espermatozóides desembocam no epidídimo, outro tubo enovelado com aproximadamente seis metros de comprimento, onde essas células amadurecem (Figura 2). O epidídimo leva ao canal deferente, que se alarga para formar a ampola do canal deferente, imediatamente antes de sua penetração na glândula prostática. As vesículas seminais, cada uma localizada num lado da próstata, esvaziam-se na extremidade prostática da ampola, e o conteúdo da ampola e da vesícula seminal passa para o duto ejaculador, que segue através de corpo da glândula prostática para desaguar na uretra interna. Os dutos prostáticos esvaziam-se, por sua vez, no duto ejaculador. Por fim, a uretra é a última ligação entre o testículo e o exterior. A uretra recebe muco derivado de grande número de pequenas glândulas uretrais localizadas em toda a sua extensão, bem como das glândulas bulbouretrais bilaterais, situadas próximo à origem da uretra (Figura 1) (Guyton, 1992).

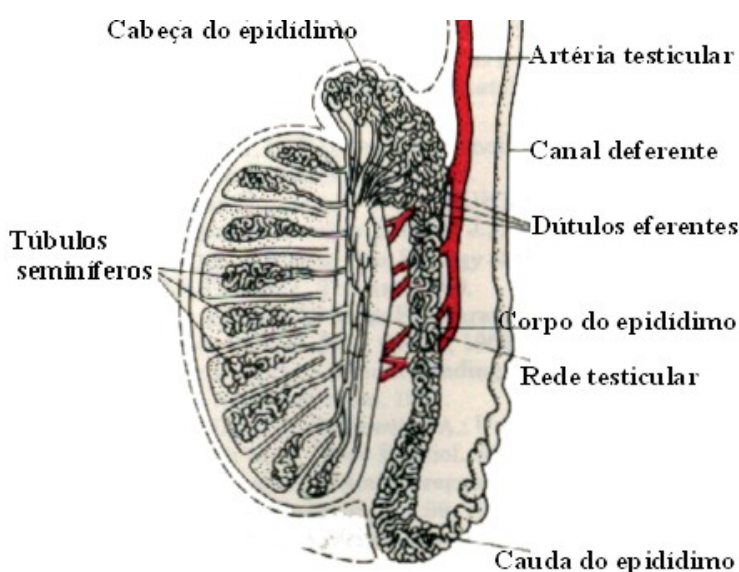


Figura 2. Estrutura do testículo e sua relação com o epidídimo (Guyton, 1992).

A espermatogênese (processo de formação dos gametas masculinos) ocorre em todos os túbulos seminíferos, durante a vida sexual ativa, em consequência da estimulação hormonal e prosseguindo durante todo o resto da vida. Entre os hormônios envolvidos nesse processo, destacam-se: a testosterona, o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo-estimulante (FSH), os estrogênios e o hormônio do crescimento. (Guyton, 1992).

A testosterona é um hormônio secretado pelas células de Leydig, que se localizam nos testículos. Esse hormônio é essencial para a manutenção da altura do epitélio da mucosa das glândulas sexuais acessórias, fazendo com que as secreções sejam continuamente produzidas (Fawcett, 1986). É responsável, ainda, pela espermatogênese e a concentração desses gametas, os espermatozoides, no epidídimo (Barkeley & Goldmass, 1977). A testosterona influencia, ainda, a função do músculo liso, no canal deferente e nas vesículas seminais (Fawcett, 1986). Além disso, esse hormônio e seu principal metabólito, a diidrotestosterona, são determinantes críticos do fenótipo masculino (Jost et al., 1973). A descida dos testículos na vida pré-natal é controlada pela testosterona (Spencer et al., 1991), e a masculinização da genitália externa, em machos, é controlada pela diidrotestosterona (Imperato-McGinley et al., 1985; Clark et al., 1990). Ainda, as glândulas sexuais acessórias requerem o hormônio testosterona para o seu crescimento (Fawcett, 1986).

O LH, secretado pelo lobo posterior da hipófise, estimula as células de Leydig a secretar a testosterona. O FSH, secretado pelo lobo anterior da hipófise, estimula as células de Sertoli, responsáveis pela etapa final da formação dos espermatozoides. Os estrogênios, formados a partir da testosterona pelas células de Sertoli, são indispensáveis no processo de diferenciação dos espermatozoides. Por fim, o hormônio do crescimento é necessário para a regulação das funções metabólicas básicas dos testículos (Guyton, 1992).

As vesículas seminais secretam um material mucóide contendo quantidades abundantes de frutose e outras substâncias de grande valor nutritivo para o esperma ejaculado, que sustentam o gameta masculino até que ele fertilize o óvulo. A próstata secreta um líquido alcalino contendo íon citrato, cálcio, fosfato ácido, e outras substâncias, importantes para aumentar a motilidade e a fertilidade dos espermatozoides. As secreções dessas duas glândulas sexuais acessórias aumenta grandemente o volume total do esperma a ser ejaculado (Guyton, 1992).

I.2.2. Toxicidade reprodutiva em machos

Recentemente tem havido um aumento no interesse dos possíveis efeitos de compostos químicos na reprodução masculina (Chia, 2000). Várias substâncias, incluindo metais, são conhecidas por alterar diferentes fases da reprodução e do desenvolvimento, levando a um prejuízo da fertilidade (Xu et al., 1993; Domingo, 1994).

Dentro desse contexto, o estresse oxidativo parece estar associado com o prejuízo reprodutivo (Ahotupa & Huhtaniemi, 1992), e estudos demonstraram que um aumento na

formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) diminui a fertilidade. De fato, as ERO podem atacar as membranas dos espermatozóides, diminuindo sua viabilidade (Irvine, 1996).

As ERO são produzidas normalmente durante o metabolismo celular. Os radicais livres possuem uma grande reatividade e podem levar à lipoperoxidação, oxidação de carboidratos, proteínas e DNA (Praticò & Delanty, 2000). As ERO podem ser tóxicas, e determinantes do tempo de vida celular (Parkes et al., 1998).

Atualmente, está demonstrado que os metabólitos das ERO estão associados com muitos processos degenerativos (Melov et al., 1998; Janssen et al., 1998). Essas alterações no *status* oxidativo do organismo podem estar implicadas em diversas desordens, tais como o câncer, catarata, isquemia, diabetes mellitus, envelhecimento e doenças neurodegenerativas (Cohen, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1990; Floyd, 1990).

Além disso, a falta de vitaminas e minerais têm um papel importante no crescimento dos animais e em suas funções fisiológicas, como por exemplo, a performance reprodutiva (Gabryszuk & Klewicz, 2002).

Dentro deste contexto, informações a respeito de tóxicos reprodutivos têm sido adquiridas usando-se modelos animais. Entretanto, uma extrapolação entre os resultados obtidos em animais para possíveis efeitos em humanos deve ser tomada com cautela, e seguindo determinados parâmetros. A suscetibilidade de humanos e animais em relação aos agentes tóxicos nem sempre pode ser comparada de uma forma direta, já que existem diferenças entre uma espécie e outra. Por exemplo, uma diminuição de aproximadamente 30% na contagem total de espermatozóides é suficiente para que se determine uma fertilidade consideravelmente reduzida em humanos. Em contrapartida, ratos são ainda férteis quando a contagem total de espermatozóides é reduzida a apenas 1 % (Mangelsdorf et al, 2003).

Sendo assim, determinações mais sensíveis para a avaliação da toxicidade reprodutiva incluem a análise de múltiplos testes, como: histopatologia (aplicando-se um método refinado), avaliação do esperma, avaliação dos órgãos reprodutivos e testes de acasalamento (performance reprodutiva), para determinação da fertilidade (Mangelsdorf et al, 2003).

A histologia é uma ferramenta altamente sensível. Após uma simples dose, muitos agentes tóxicos podem causar danos nas células primordiais da cadeia formadora dos espermatozóides, o que só poderá ser detectado na análise de lâminas histológicas (Mangelsdorf et al, 2003).

I.3. Organocalcogênios

A partir da década de 30, os organocalcogênios têm sido alvo de interesse para os químicos orgânicos em virtude da descoberta de aplicações sintéticas (Petragani et al., 1976; Comasseto, 1983) e de propriedades biológicas desses compostos (Parnham & Graf, 1991; Kanda et al., 1999), que são importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (Paulmier, 1986; Braga et al., 1996; 1997).

Conseqüentemente, o risco de contaminação ocupacional por organocalcogênios tem motivado estudos toxicológicos. Outro aspecto relevante é a tentativa crescente de desenvolvimento de compostos organocalcogênios que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham & Graf, 1991; Nogueira et al., 2003a).

I.3.1. Telúrio

O elemento telúrio foi descoberto em 1782. Entretanto, a inclusão desse átomo em moléculas orgânicas ocorreu no início do século XIX. No Brasil, a química de telúrio foi introduzida pelo Prof. Reinbolt, o qual dedicou-se ao estudo sistemático de compostos orgânicos contendo telúrio e sua aplicabilidade como intermediários em síntese orgânica (Petragani, 1995; Comasseto et al., 1997; Zeni et al., 2003).

O telúrio é um elemento que pertence ao grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob múltiplos estados de valência, que vão de -2 a $+6$ (apresenta-se sob quatro estados de oxidação: telurato (Te^{+6}), telurito (Te^{+4}), telúrio elementar (Te^0) e telureto (Te^{-2})) (Scansetti, 1992). Esse elemento é encontrado com maior frequência na forma de teluretos com ouro, bismuto, chumbo e prata.

Telúrio elementar (Te^0) é usado como componente de muitas ligas metálicas, na composição da borracha, na indústria de microchips, de componentes eletrônicos e em sistemas de energia fotovoltaica. Ele também é utilizado na produção industrial de vidro e aço, e como um aditivo anti-detonante na gasolina (Fairhill, 1969). O telúrio é encontrado em muitos minérios, junto com o selênio, e é fabricado como um sub-produto no refinamento do cobre, do chumbo, do bismuto e de outros metais (U.S. Bureau of Mines, 1985). Ainda, o telúrio apresenta a propriedade de interagir com metais (Painter, 1941; Khayat & Dencher, 1984).

I.3.1.1. Potencial farmacológico

Os efeitos do telúrio sobre o organismo animal começaram a ser estudados por Gmelin (1824).

Os compostos orgânicos de telúrio apresentam propriedades imunomoduladoras, podem ser usados como drogas antitumor e antivirais, e apresentam propriedades antiinflamatórias (Sredni et al., 1987, 1988; Nyska et al., 1989, Sun et al., 1996). Estudos recentes têm demonstrado que os diteluretos de diarila podem apresentar atividade antioxidante (Engman et al., 1995; Andersson et al., 1994; Kanda et al., 1999) e propriedade de mimetizar a atividade da enzima glutathione peroxidase (Andersson et al., 1993; Engman et al., 1992), uma importante enzima endógena que participa de reações de neutralização de agentes pró-oxidantes.

Conseqüentemente, o emprego farmacológico desses agentes poderá crescer nos próximos anos.

Sabe-se que o telúrio metálico está presente na composição de organismos vegetais, particularmente em membros da família *Alium*, tais como o alho (Larner, 1995). Alguns estudos já demonstraram que pequenas quantidades de telúrio foram identificadas nos fluidos corporais, tais como sangue e urina (Siddik & Newman, 1988; Newman et al., 1989). Estudos demonstraram também que esse elemento está presente na forma de telurocisteína e telurometionina em muitas proteínas de bactérias (Boles et al., 1995; Budisa et al., 1995), leveduras (Yu et al., 1993) e fungos (Ramadan et al., 1989). Mas, até o presente momento, proteínas contendo telúrio não foram identificadas em células animais. Por isso, o telúrio não apresenta função fisiológica descrita até o momento, em mamíferos (Taylor, 1996).

I.3.1.2. Propriedades toxicológicas

O aumento do uso industrial de produtos químicos provoca riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana, e cresce a preocupação em relação aos potenciais efeitos adversos desses compostos. Os primeiros relatos a respeito da toxicidade do telúrio aconteceram após o acidente de Windscale (UK) (Stewart & Crooks, 1958).

O telúrio é um elemento relativamente abundante, sendo prontamente absorvido pelo organismo, através da dieta, principalmente na forma de compostos orgânicos. Entretanto, a

exposição e a absorção de telúrio inorgânico na forma de teluritos e teluratos também ocorre (Larner, 1995).

Casos de intoxicação ocupacional aguda por telúrio são raros, entretanto, quando ocorrem, os sintomas são: dores de cabeça, sonolência, náuseas, alteração da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho, na respiração e na urina (Müller et al., 1989; Taylor et al., 1996).

A toxicidade desse elemento parece estar relacionada ao seu estado de oxidação (Van Vleet et al., 1982). O mecanismo proposto para explicar essa toxicidade envolve a oxirredução de grupos -SH de moléculas biologicamente ativas (Blais et al., 1972; Young et al., 1981; Deuticke et al., 1992).

Por bloquearem a síntese do colesterol, que é um precursor da mielina, compostos que contêm telúrio são potentes agentes neurotóxicos. Os compostos de telúrio inibem a atividade da enzima esqualeno monooxigenase, responsável pela conversão do esqualeno à 2,3-epoxiesqualeno, um precursor do colesterol. Dessa forma, o esqualeno acaba se acumulando. A sensibilidade da enzima ao telúrio se deve à reação desse elemento com grupamentos sulfidrílicos e com a ligação de cisteínas vicinais (Laden & Porter, 2001). Sendo assim, o telúrio inibe a síntese de colesterol nas células de Schwann, o que resulta no bloqueio da formação de mielina e no acúmulo de esqualeno.

A consequência desse processo é uma desmielinização ou hipomielinização, que pode ser a causa das neuropatias ocasionadas por esses compostos (Wagner-Recio et al., 1994). Os efeitos da intoxicação com telúrio no sistema nervoso têm sido estabelecido como sugestivo de neuropatia periférica durante um período ativo de mielinogênese (Duckett et al., 1979; Harry et al., 1989; Lampert & Garrett, 1971), afetando a produção de proteínas mielínicas à nível de gene (Morell et al., 1994). Defeitos neuromusculares têm sido identificados em animais após a administração de telurito inorgânico (Duckett et al., 1979). A suscetibilidade preferencial do sistema nervoso periférico à toxicidade do telúrio depende, provavelmente, da grande demanda de colesterol pelos nervos periféricos, e uma menor taxa de acúmulo de colesterol no cérebro (Rawlins & Smith, 1971).

Seguindo esse raciocínio, alguns autores sugeriram que o ditelureto de difenila, um composto orgânico que contém telúrio, é neurotóxico para camundongos (Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2001a; 2002; Moretto et al., 2003), além de causar toxicidade renal e hepática em roedores, quando administrado em doses muito baixas (Meotti et al., 2003). Além disso, o ditelureto de difenila é capaz de reduzir a neurotransmissão glutamatérgica em plaquetas de

humanos (Borges et al., 2004) e de inibir a enzima δ -aminoluvulinato desidratase (δ -ALA-D) em eritrócitos de humanos (Nogueira et al., 2003c).

δ -ALA-D é uma enzima sulfidrílica que catalisa a condensação de duas moléculas de ácido aminolevulínico (ALA) com a formação de porfobilinogênio (PBG), que é um precursor do heme (Shemin, 1976). Conseqüentemente, a inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a biossíntese do heme (Sassa et al., 1989), resultar no acúmulo de ALA, afetar o metabolismo aeróbico, podendo também desenvolver uma atividade pró-oxidante (Bechara et al., 1993). Sendo assim, a inibição da enzima δ -ALA-D é um importante parâmetro de toxicidade.

Os compostos de telúrio, que têm propriedades metálicas, atravessam a barreira cérebro-sangue, barreira placentária e a barreira endotelial-fluido cérebro espinhal-sangue fetal (Duckett & Ellem, 1971). Já foi demonstrado que telúrio metálico atravessa as membranas celulares e se localiza no citoplasma das células (Blinzinger & Hager, 1965, Mizuno, 1969), mais especificamente, nas mitocôndrias, nos primeiros estágios de intoxicação (Duckett & White, 1974). E que a ingestão de determinadas quantidades de telúrio por mamíferos adultos e pássaros faz com que apareçam grânulos negros ou cristais em forma de agulha no citoplasma das células do sistema urogenital, do trato alimentar, dos órgãos respiratórios, do sistema reticulo-endotelial e do sistema nervoso (Pentschew et al., 1962, Carlton & Kelly, 1967).

O metabolismo do telúrio nos tecidos não está esclarecido, mas é sugerido que os depósitos negros ou os cristais puntiformes são telúrio reduzido ou telúrio elementar. (Duckett, 1972).

I.3.1.3. O telúrio e a toxicidade desenvolvimental

Estudos descreveram o aparecimento de hidrocefalia e observaram a presença de telúrio nos tecidos fetais de rato. Essa foi a primeira vez que a presença de um agente teratogênico para hidrocefalia foi demonstrado em fetos. Malformações em outros órgãos não foram verificadas nos animais hidrocefálicos no estudo em questão. Esses dados foram confirmados posteriormente (Agnew et al., 1968; Duckett, 1971a).

Também foram realizados estudos que avaliaram o momento particular (período crítico) em que o telúrio metálico estaria causando dano aos tecidos fetais. Constatou-se que a administração de telúrio, em ratas, no período do 10º ao 15º dia de gestação, induziu o

surgimento de malformações congênitas (Duckett & Scott, 1971). Outro estudo, porém, indicou os dias 9 e 10 da gestação, também em ratas, como sendo o período mais suscetível ao aparecimento de hidrocefalia induzida por esse composto (Agnew & Curry, 1972).

Foi avaliada a arquitetura das alterações que levavam à hidrocefalia, por meio de lâminas histológicas. Foi observada uma estenose dos aquedutos cerebrais, associada com o fechamento do espaço subaracnoideo pelo aumento do volume nos ventrículos cerebrais fetais. A possível causa da hidrocefalia induzida pelo telúrio, no protocolo experimental utilizado, pode ser, entre outras, a superprodução de fluido cerebrospinal e/ou a não absorção desse fluido. As alterações observadas foram incompatíveis com a vida (Duckett, 1972).

O dióxido de telúrio, um composto inorgânico que se demonstrou teratogênico, induziu a formação de hidrocefalia, edema, exoftalmia, hemorragia ocular, hérnia umbilical, a não descida dos testículos, rins pequenos e diminuição no tamanho corporal, de uma maneira relacionada à dose, em fetos de ratas Wistar, quando administrado diariamente em injeções s.c., na mãe, do dia 15 ao dia 19 da gestação (Perez-D'Gregorio & Miller, 1988).

Dessa forma, pode-se constatar que compostos contendo telúrio são altamente tóxicos, principalmente para mamíferos em desenvolvimento. Apesar dos estudos já realizados, não existem na literatura dados referentes ao possível efeito tóxico do ditelureto de difenila sobre o desenvolvimento intra-uterino de animais.

I.3.1.4. O telúrio e a reprodução em ratos machos

Não existem, na literatura, dados sobre os efeitos do telúrio, incluindo esse elemento na forma de ditelureto de difenila, sobre os órgãos reprodutivos de ratos machos, bem como não há estudo que relacione esse elemento com efeitos sobre a performance reprodutiva desses animais.

I.3.2. Selênio

Esse elemento químico foi descoberto em 1817, pelo químico sueco J. J. Berzelius. O selênio, assim como o telúrio, é um elemento do grupo 16 da tabela periódica, podendo

apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

O selênio compartilha propriedades químicas e físicas com o enxofre. Esta similaridade permite que o selênio substitua o enxofre, promovendo interações selênio-enxofre nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre selênio e enxofre constituem a base de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980).

Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), onde ocorre a substituição do átomo de enxofre pelo átomo de selênio (Klayman & Günther, 1973).

I.3.2.1. Atividade biológica

O selênio é um elemento traço, cuja essencialidade nutricional, foi demonstrada em 1957, em ratos (Schwartz & Foltz, 1957).

Nos últimos anos, têm sido descrito que baixos níveis de selênio podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000).

Neste contexto, a suplementação de dietas com selênio, tanto para animais quanto para humanos, tem sido aceita pela comunidade científica. A Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50-200 μg , a qual é considerada segura e saudável para adultos (Food and Nutrition Board, 1989).

O selênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante como antioxidante.

As pesquisas recentes têm procurado estabelecer a função e a biologia molecular de selenoproteínas. Já é conhecido que o selênio está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas glutathiona peroxidase (Wingler & Brigelius-Flohé, 1999), tioredoxina redutase (Holmgren, 1985), 5'-deiodinase (Behne & Kyriakopoulos, 1990) e selenoproteína P (Ursini et al., 1990). A atividade redox do selênio tem fundamental importância para o sítio catalítico dessas enzimas.

I.3.2.2. Propriedades farmacológicas

Com a descoberta do papel essencial do selênio e com o aumento do entendimento do papel fisiológico dele na regulação do dano oxidativo (Cadenas & Sies, 1985; Ursini & Bindoli, 1987), aumentou o interesse em relação à síntese de compostos orgânicos que contenham selênio (Parnhan & Graf, 1991).

Recentemente, estudos *in vitro* demonstraram que compostos organoselênio (alquil e aril disselenetos, incluindo o composto disseleneto de difenila) podem ser considerados compostos antioxidantes potenciais (Parnham & Graf, 1991; Meotti et al., 2004). Além disso, nosso grupo de estudo tem demonstrado que o disseleneto de difenila tem outras propriedades farmacológicas, tais como efeito anti-úlceras (Trevisan et al., 2004), anti-inflamatório e agente antinociceptivo (Nogueira et al., 2003a).

I.3.2.3. Propriedades toxicológicas

Em meados de 1930 foi dada uma maior importância ao selênio, quando então ele foi identificado como o agente etiológico de intoxicações em animais de pastagem (Franke, 1934; Spallholz, 1993). Estes animais apresentavam emagrecimento, perda de pelos e anemia (Franke, 1934).

Quando a ingestão diária de selênio excede a capacidade corporal de eliminação, algum tipo de intoxicação pode ocorrer e os sintomas crônicos mais comuns são: severa irritação das vias respiratórias, gosto tipicamente metabólico na boca, edema pulmonar e cheiro característico de alho (Bedwall et al., 1993; Diaz et al., 1997).

Devido a isso, o homem é suscetível à intoxicação por selênio, principalmente pelo seu amplo uso na indústria, particularmente na síntese de compostos, uma vez que este elemento, assim como o telúrio, constitui um importante intermediário em síntese orgânica (Wilber, 1980).

Nos mamíferos, o selênio parece ser rapidamente absorvido, entretanto a biodisponibilidade depende da sua fonte. A absorção do selênio sob a forma de selenito através do trato gastrointestinal de ratos excede 90% (Brown et al., 1972). O principal local de absorção parece ser o duodeno, seguido pelo jejuno e íleo.

Além do trato gastrointestinal, o selênio pode ser absorvido por tecidos cutâneos ou por inalação. Estas duas últimas vias de absorção de selênio estão relacionadas com a exposição e intoxicação ocupacional por compostos de selênio (Whanger et al., 1976).

Após a absorção, os maiores níveis de selênio estão localizados nos eritrócitos, fígado, baço, coração, unhas e no esmalte dos dentes, enquanto que menores quantidades são depositadas no miocárdio, músculo esquelético e cérebro (Martin & Gerlack, 1972).

É sabido, ainda, que o selênio é transmitido através da placenta para o feto em desenvolvimento, mesmo que esteja presente em baixas concentrações no organismo materno (Koller et al., 1984).

Em animais intoxicados cronicamente, o selênio é depositado principalmente nos rins e fígado, seguido pelo pâncreas, baço e pulmões (Wilber, 1980).

A primeira evidência de que compostos de selênio são metabolizados em animais foi determinada após um longo período de tratamento com selenito de sódio. Os animais apresentavam um odor gárlico característico, que posteriormente demonstrou ter sido causado pelo seleneto de dimetila (Klayman & Gunther, 1973). Esse composto pode ser o resultado da detoxicação metabólica de muitos compostos de selênio, a qual envolve uma série de metilações dependentes da S-adenosilmetionina (Hoffman & McConnell, 1986).

O selênio pode ser eliminado do organismo pelas três principais vias excretoras- urina, fezes e ar expelido. Os rins têm um importante papel, pois a excreção urinária é considerada uma das principais rotas de desintoxicação e de eliminação em animais e humanos. Por ser excretado na urina, essa pode ser usada como indicadora em casos de intoxicação ou de exposição a altos níveis do elemento (Valentine et al., 1978).

A excreção de selênio pelo ar expirado é feita basicamente pelo composto volátil seleneto de dimetila, que tem sido detectado na respiração de indivíduos expostos acidentalmente a níveis altos desse elemento (Mozier et al., 1988).

Até o presente momento, os mecanismos da toxicidade do selênio ainda não estão bem esclarecidos. Entretanto, Painter (1941) propôs que a toxicidade do selenito era devido à sua interação com tióis. As reações entre compostos de selênio e tióis foram estudadas por Tsen & Tappel (1958) e mais tarde por Ganther (1968).

Na década de 60, especulava-se sobre os efeitos tóxicos do selênio, onde seu excesso causaria inativação de enzimas sulfidrílicas (Tsen & Collier, 1959; Schwarz, 1961).

Compostos orgânicos de selênio, incluindo o disseleneto de difenila, são conhecidos por induzir toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Dados do nosso laboratório têm mostrado que formas orgânicas de selênio podem ser neurotóxicas (Nogueira et al., 2003b; Moretto et al., 2003),

causar toxicidade renal (Meotti et al., 2003) para roedores adultos, ou ser nocivas para proteínas ou enzimas de vários tecidos de mamíferos, tais como a enzima δ -ALA-D (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001; Bolzan et al., 2002; Nogueira et al., 2003c).

I.3.2.4. O selênio e a reprodução em ratos machos

O selênio, como nutriente essencial ao organismo, se faz necessário também para um bom funcionamento do aparelho reprodutor de machos. Esse elemento é essencial para a fertilidade de roedores machos e também tem importância na capacidade de fertilização dos espermatozoides, em gado e humanos. A deficiência nos níveis de selênio está associada com um prejuízo na motilidade do esperma, alterações estruturais na peça intermediária e diminuição dos flagelos dos espermatozoides. Quando esse gameta está maduro, existe uma grande quantidade de selênio, na forma de uma enzima chamada glutathione peroxidase hidropéroxido fosfolípido, de localização mitocondrial, na peça intermediária desse gameta, que é rica em mitocôndrias (Behne et al., 1996).

Problemas relacionados aos níveis de selênio também incluem prejuízo na fertilidade, abortos, retração de placenta e perdas neonatais. Além disso, a administração de selenato de sódio melhorou parâmetros reprodutivos em ovelhas (Gabryszuk & Klewicz, 2002).

Trabalhos científicos demonstraram que o selenito de sódio, um composto inorgânico, foi capaz de suprimir a apoptose e as alterações necróticas testiculares induzidas por cádmio (Jones et al., 1997).

Entretanto, dados referentes ao sistema reprodutivo de machos e selênio são escassos na literatura. Outros dados, como os que relacionam o disseleneto de difenila e o aparelho reprodutor de machos não são encontrados.

I.4. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- Avaliar o possível efeito teratogênico do ditelureto de difenila, administrado durante a gestação em ratas Wistar;
- Identificar o período alvo da toxicidade desenvolvimental do ditelureto de difenila, administrado em dias específicos da gestação, em ratas Wistar;
- Identificar as possíveis alterações histológicas dos tecidos fetais, após a administração do ditelureto de difenila em ratas Wistar prenhas;
- Avaliar o efeito de organocalcogênios sobre os índices de acasalamento e performance reprodutiva em ratos machos Wistar;
- Avaliar a toxicidade testicular de organocalcogênios sobre parâmetros bioquímicos. Serão avaliadas as atividades das enzimas ácido δ -aminolenulínico desidratase e superóxido dismutase, a peroxidação lipídica, o conteúdo de glicogênio e a concentração de ácido ascórbico;
- Avaliar o tecido testicular, por meio de estudo histológico, para detectar possíveis alterações causadas pela administração de organocalcogênios.

II. ARTIGOS CIENTÍFICOS

II.1 CAPÍTULO 1

EFEITO TERATOGENICO DO DITELURETO DE DIFENILA, ADMINISTRADO DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS WISTAR

II.1.1. Artigo 1

TERATOGENIC VULNERABILITY OF WISTAR RATS TO DIPHENYL DITELLURIDE

Stangherlin, E.C.; Favero, A.M.; Rocha, J.B.T.;

Zeni, G.; Nogueira, C.W.

Submetido à Toxicology, está em fase de revisão.

**TERATOGENIC VULNERABILITY OF WISTAR RATS TO DIPHENYL
DITELLURIDE**

Stangherlin, E.C.; Favero, A.M.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.*

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de
Santa Maria, SM, RS, CEP 97105-900 Santa Maria, Brazil

Correspondence should be sent to:

Cristina Wayne Nogueira

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de
Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Phone: 55-55 220-8140

FAX: 55-55-220-8978

E-mail: criswn@quimica.ufsm.br (Nogueira CW)

Abstract

The effect of single maternal subcutaneous (s.c.) injection of 0.12 mg/kg diphenyl ditelluride, (PhTe)₂, diluted in canole oil at days 6, 10 or 17 of gestation were evaluated in Wistar rats. The reduction of body weight gain was statistically significant at GD9, for the dams that received (PhTe)₂, at GD6; at GD13, for the dams that received (PhTe)₂, at GD10, and at GD20, for the dams that received (PhTe)₂, at GD17, when compared to respective control groups. External and internal fetal soft-tissues examination was performed on day 20 of gestation. Single maternal injection at day 10 of gestation resulted in appearance of malformations in fore- and hind-limbs, absent or short tail, subcutaneous blood clots, exophthalmia, hydrocephalus and exencephaly in fetuses on day 20 of gestation. Besides, (PhTe)₂ reduced the fetal body and cerebral weight, kidneys length, measurements of body dimension and provoked 73% of fetal mortality. Subcutaneous administration of (PhTe)₂ on day 17 of gestation was associated with 94% mortality, hydrocephalus and edema. Histological evaluations of fetal brain demonstrated alterations in GD10 and GD17. No fetal changes were observed after the administration of (PhTe)₂ at day 6 of gestation. Thus, (PhTe)₂ can be teratogenic to rat fetuses and toxic for dams. The late fetal stages of rat prenatal development appeared uniquely sensitive to organic tellurium exposure.

Keywords: Tellurium, diphenyl ditelluride, teratogenic, pregnancy and toxicity.

1. Introduction

Elemental tellurium (Te^0) is a rare trace element, which is used as an industrial component of many alloys, in the rubber compounding, in microchip industry, in electronics and in photovoltaic energy systems. It is also used in the glass and steel production industries and as a gasoline antiknock additive (Fairhill, 1969). Tellurium is found in various ores along with selenium and it is produced as a by-product in the refining of copper, lead, bismuth, and other metals (U.S. Bureau of Mines, 1985). Therefore, the increase of industrial use of chemicals provokes occupational and environmental risks for human health. Among the potential adverse effects derived from exposure to metals, developmental toxicity is a serious risk (Domingo, 1998).

Agnew and collaborators (1968) described hydrocephalus in the offspring and observed the presence of tellurium in fetal tissues. This was the first time that the presence of a teratogenic agent for hydrocephalus had been unquestionably demonstrated in the fetus. No malformation in other organs was verified in the hydrocephalic animals. Accordingly, Duckett (1971) proposed that tellurium crosses the blood-brain barrier, the cerebrospinal fluid (CSF)-ependymal barrier, and the placental barrier. Thus, the effects of tellurium intoxication on the nervous system have been established as suggestive of peripheral neuropathy during a period of active myelinogenesis (Lampert and Garrett, 1971; Duckett et al., 1979; Harry et al., 1989) affecting transcription of the myelin proteins at the gene level (Morell et al., 1994).

Tellurium dioxide has been also described to induce hydrocephalus, edema, exophthalmia, ocular hemorrhage, umbilical hernia, undescended testes, small kidneys, and reduction on size in a dose-related manner in the Wistar rat fetuses when administered in daily s.c. injections to dams from day 15 to day 19 of gestation (Perez-D'Gregorio and Miller, 1988).

Whereas tellurium is regarded as a toxic metalloid, some pharmacological properties have been described for organotellurium compounds. The AS-101, an organotellurium compound, has been identified to possess immunomodulating properties and used as the antitumor drug (Sredni et al. 1987, 1988; Nyska et al., 1989). Other organotellurium compounds possess antioxidant (Andersson et al., 1994; Engman et al., 1995) and glutathione peroxidase-like properties (Andersson et al., 1993; Engman et al., 1992). Consequently, it is reasonable to presume that the exposure of man to these compounds may increase in a near future due to its importance in organic synthesis (Comasseto et al., 1997; Zeni et al., 2003) and their potential use as a component of a range of therapeutic agents.

Conversely, dimethyltellurium has been reported as an inducer of peripheral neuropathy in rats (Goodrum, 1998). In fact, dimethyltellurium is a potent inhibitor of squalene monooxygenase, a downstream enzyme in the cholesterol biosynthetic pathway (Laden and Porter, 2001). The resulting inhibition of cholesterol synthesis blocks myelin formation and causes the accumulation of squalene in Schwann cells, leading to peripheral segmental demyelination and paralysis (Wagner-Recio et al., 1991).

Accordingly, some authors suggested that diphenyl ditelluride is a neurotoxic compound for mice (Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2001a; 2002; Moretto et al., 2003) and provide evidence for renal and hepatic toxicity of this organotellurium compound for rodents even when administered at very low doses (Meotti et al., 2003). However, there are no data about the toxic effect of diphenyl ditelluride for the developing animals.

Taking into account the importance of diphenyl ditelluride as an intermediate in organic synthesis, its high lipophilicity and the possibility of occupational exposure to this compound, the present study evaluated the toxicity of diphenyl ditelluride during the fetal period in Wistar rats. The purpose of these experiments was to define the particular period, the target period, during intrauterine development, in which, the fetuses were more susceptible to diphenyl ditelluride. Maternal toxicity induced by diphenyl ditelluride was also evaluated. The results of the present investigation clearly indicated that diphenyl ditelluride is a potent teratogen, even when pregnant rats are exposed to very low doses of this compound. Consequently, the present results indicated that pregnant woman must avoid a direct contact with diphenyl ditelluride.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Diphenyl ditelluride (Fig. 1) was synthesized according to literature methods (Petragani, 1994). Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed that the compound obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. Since diphenyl ditelluride is a hydrophobic compound, it was diluted in canole oil. All chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Animals

Virgin female Wistar rats (170-250 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept on a 12 light/dark cycle, at a room temperature of 22 °C, 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, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

2.3. Experimental procedure

For mating, females were placed three per cage with one male breeder overnight. Day zero of pregnancy (GD0) was determined by the presence of sperm in vaginal smears in the morning. Dams recognized as pregnant were separated of the males in standard plastic cages.

For the purposes of this study, the 21-day-period of gestation was divided into 3 periods in agreement with Duckett (1971): the first period was from day 1 to day 9 inclusive, that is until the appearance of neural plate, the second period was from day 10 to day 15, the organogenetic period, and the third period was from day 16 to 21.

Maternal weight was recorded every day until GD20. Diphenyl ditelluride (0.12 mg/kg – 1/3 LD₅₀) (Meotti et al., 2003) was diluted in canole oil and administered (s.c.) at GD 6, GD 10 or GD 17. The control animals received only canole oil (1 mL/kg).

At gestational day 20, dams were euthanatized by chloroform. The maternal liver, kidneys, brain and spleen were removed and the weight was recorded. The gravid uterus was also removed and the fetuses were analyzed.

The condition of each conceptus was recorded as live or dead fetuses. A viability of the fetuses was determined by presence of spontaneous breathing or responses to a tactile stimulus. The fetus weights were recorded and they were examined for gross external anomalies. Fetal measurements were performed according to Perez-D'Gregorio and Miller (1988): (1) longest longitudinal dimension in natural position; (2) longest dimension occipitonasal; (3) perpendicular to 1 at the level of neck; and (4) parallel to 3 at the level of umbilical insertion (Fig. 2).

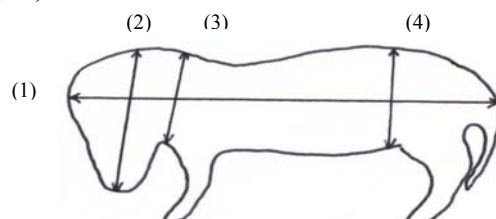


Figure 2.

The fetal liver and brain were removed and the tissues weights were recorded. The fetal kidney were removed and measured. Fetal heads were randomly selected, fixed by immersion in Bouin's solution, and embedded in paraffin for histological evaluation. Sagittal sections (2nd and 3th cervical vertebra) were performed and stained with hematoxylin and eosin.

2.4. Statistical analysis

The litter was used as the experimental unit. Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Body and organ weights of maternal rats

Dams showed a decrease weight after administration of diphenyl ditelluride. The reduction of body weight gain was statistically significant at GD9, for the dams that received (PhTe)₂ at GD6 (Fig. 3a); at GD13, for the dams that received (PhTe)₂ at GD10 (Fig. 3b) and at GD20, for the dams that received (PhTe)₂ at GD17 (Fig. 3c), when compared to respective control groups.

There were no significant differences on weights of maternal organs (liver, brain, kidney and spleen) among treated and control groups (data not shown). As well, no maternal lethality was observed.

3.2. Fetal analysis

Administration of (PhTe)₂ at GD10 and GD17 was toxic to GD20 fetuses. The dams treated at GD10 and GD17 demonstrated 73% and 94% of fetal mortality, respectively. No fetal mortality was observed in the GD6 exposure (Table 1). Dead fetuses did not show signs of autolysis during internal examination, which suggests that death occurred shortly before GD20.

Prenatal exposure to (PhTe)₂ caused decrease on fetal weight when administration was at GD10. A significant reduction in cerebral fetal weight was observed after (PhTe)₂ administration at GD10 and GD17. Internal examination of the pelvis revealed the presence

of small kidneys and this decrease was statistically significant to the fetuses exposed at GD10 and GD17. There was no change on fetal liver weight (Table 1).

A significant decrease on body length (measurement 1) of animals exposed to $(\text{PhTe})_2$ was evident at GD10 and GD17 when compared to respective control groups. Prenatal exposure to $(\text{PhTe})_2$ at GD10 produced a significant decrease in the measurements 2, 3 and 4, while the administration at GD17 induced an increase in the measurement at the level of the neck (measurement 3) (Table 1). The increase on neck diameter could be explained by the presence of a soft tissue with skin easily distensible; thus edema could be documented. The presence of abnormal accumulation of fluid in the subcutis was recorded as edema, during the external examination. The abnormal accumulation of fluid, which produced a subsequent distention of the skin and generalized deformity, was corroborated after fixation of the fetuses in Bouin's solution (Perez-D'Gregorio and Miller, 1988).

Edema was externally evident in fetuses exposed to $(\text{PhTe})_2$ at GD17. The fetuses exposed at GD10 presented various evident abnormalities such as absent or short tail, malformation in the fore- and hind-limbs, subcutaneous blood clots, open or deformed eyes (cases in which the eye was externally protuded were designated as exophthalmia), hydrocephalus (also observed in GD17) and exencephaly. There was no fetal abnormality observed in GD6 treated and in the control groups.

Histological evaluation of the fetus heads exposed to $(\text{PhTe})_2$ at GD10 revealed displaced brain tissue, with absence of the cranial bone and cutaneous tissue, confirming the presence of exencephaly. No fetal head alteration was observed in the control group (Fig.4).

Histological evaluation of fetal heads exposed at GD17 revealed a decrease of the brain volume with consequent lateral ventricles dilation. As well, the adjacent tissues were found thinner than that of control group tissues (Fig.5).

As the main alteration visualized in the animals exposed at GD17 was the edema, at the level of the neck, histological blades of this region were produced. Microscopic histological evaluation confirmed the presence of subcutaneous weak embryonal connective tissue, responsible for apparent edema. Besides, the spinal cord of the animals treated with diphenyl ditelluride was sharply reduced when compared to control group (Fig.6). Although, the salivary glands of the group exposed to $(\text{PhTe})_2$ at GD17 were found dislocated and embedded in the connective tissue (Fig.7). There were no alterations observed on the control group tissues.

4. Discussion

The present study establishes that a single injection of $(\text{PhTe})_2$ induces reduction in fetal size and weight, and various morphologic abnormalities in fetuses of Wistar rats, when administered on specific day of gestation, in maternal rats. Teratogenic/fetotoxic effects are manifested by the presence of malformations in the fore- and hind-limbs, absent or short tail, subcutaneous blood clots, exophthalmia, hydrocephalus, exencephaly and edema caused by the tested compound.

In this study, maternal toxicity was defined by the reduction of the weight gain in the three days after the administration of $(\text{PhTe})_2$. Diphenyl ditelluride was noxious for maternal rats and was highly prejudicial for intrauterine development when administered in the second (represented by GD10) and in the third (represented by GD17) periods of the gestation. The administration of $(\text{PhTe})_2$ in the first period of the gestation (represented by GD6) was not toxic for the fetuses.

Tellurium has been described as an element that crosses placental barrier (Duckett, 1971), then the transfer and compartmentalization of the chemical from mother to fetus through the placenta is an important factor. Placental transfer is significantly moderated by free drug characteristics (such as lipid solubility, degree of ionization and molecular weight) and placental properties (maternal and fetal blood flow, drug metabolism and placental age). It is evident that chemicals with a molecular weight less than 600 may readily transmigrate through the placenta (Mirkin, 1973). Considering the chemistry characteristics of diphenyl ditelluride such as lipid solubility and molecular weight (MW 409), we infer that this compound could induce fetus abnormality by crossing placental barrier. In fact, to the best of our knowledge these data are the first evidence for $(\text{PhTe})_2$ -induced teratogenic/fetotoxic effects in rats.

In addition, apparition of malformations (at GD10), edema (at GD17) and hydrocephalus (at GD10 and at GD17) were incompatible with life, demonstrated through high incidence of fetal lethality. Edema was primarily localized in the neck, under the chin and in severe cases throughout the entire body. The edema altered the external appearance of the fetuses, suggesting the limb reduction in more advanced cases. Internal evaluation of these specimens demonstrated that the extremities were normal but were included in the distended subdermis.

In this study, exophthalmia and deformed eyes were present at GD20 in fetuses exposed to $(\text{PhTe})_2$ at GD10. In normal development of the rat, the primordium of the eye appears

between the 10th and 11th day of gestation and differentiates quickly. By the 15th day the double-walled optic cup, lens and hyaloid vessels are formed. By day 17 rapid growth of the eyelids take place. By the end of day 18 the fetal eyes are entirely covered by complete fusion of the lids. At that time the retina shows active differentiation and the ciliary body is formed (Altman and Dittmer, 1962).

Reduction in body size, kidney length and survival were also observed in fetuses exposed to (PhTe) at GD10. This generalized delay on development could be responsible for the severe compromise in viability of the fetuses exposed to (PhTe)₂. Fetal body weight is a common parameter for quantifying changes in growth. In this particular study, in cases where severe edema was present, an increase on weight was observed as determined by the abnormal accumulation of fluid. Subsequently, body weight was not a reliable indicator of growth. The utilization of external measurements of the fetal body described here is a more appropriate way to evaluate the growth. In fact, the body length measurements represent more sensitive parameters. Preferential localization of the edema at the level of the neck confirmed this abnormal increase in weight. According to Perez-D'Gregorio and Miller (1988), measurement at the level of the neck could be used as an indicator of the degree of the edema performed.

A mechanistic approach to the developmental toxicity of (PhTe)₂ is the next logical step in the study of (PhTe)₂-induced teratogenesis. Further studies that make possible localization of this element at the cerebral structures would be an indication that the metal is the responsible for changes at this level.

Injuries to the conceptus during embryonic life – the organogenetic period – result in malformed organs. Injuries during fetal life, when the formed organs are increasing their bulk, result in anomalies of growth (Murphy, 1965). Since, the morphological anomalies in congenital malformations are determined by the type and amount of the injurious agent and by a particular moment (target period) of injury to the embryo and fetus (Murphy, 1965), we can conclude that the two last fetal periods (GD10 and GD17) in the rat gestation are the critical periods for inducing alterations in CNS development as evidenced by the anomalies caused by (PhTe)₂. Thus, if extrapolated to the human it is reasonable to suppose that the second and third trimester of gestation could be the critical periods to (PhTe)₂ exposure.

Acknowledgements

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged. C.W.N., J.B.T.R. and G.Z. are the recipient of CNPq fellowships.

References

- Agnew, W.F., Fauvre, F.M., Pudenz, P.H. (1968). Tellurium hydrocephalus: Distribution of tellurium-127m between maternal, fetal and neonatal tissues of the rat. *Exp. Neurol.* 21, 120-131.
- Altman, P.L. and Dittmer, D.S. (1962). Growth. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., Washington, D.C.
- Andersson, C.-M., Brattsand, R., Hallberg, A. (1994). Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Radical Res.* 20, 401-410.
- Andersson, C.-M., Hallberg, A., Brattsand, R., Cotgrave, I.A, Engman, L., Persson, J. (1993). Glutathione Peroxidase-Like activity of diaryl tellurides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 2553-2558,
- Comasseto, J. V., Ling, L. W., Petragani, N., Stefani, H. A. (1997). Vinylic selenides and tellurides - Preparation, reactivity and synthetic applications. *Synthesis* 4, 373-403.
- Domingo, J.L. (1998). Developmental toxicity of metal chelating agents. *Reprod. Toxicol.* 12, 499-510.
- Duckett, S. & K.A.O. Ellem. (1971). The location of tellurium in fetal tissues, particularly the brain. *Exp. Neurol.* 32, 49-71.
- Duckett, S., Said, G., Streletz, L.G., White, R.G., Galle, P. (1979). Tellurium-induced neuropathy. Correlative physiological , morphological and electron microprobe studies. *Neuropath. Appl. Neuro.* 5, 265-278.
- Engman, L., Persson, J., Vessman, K., Ekstrom, M., Berglund, M., Andersson, C.M. (1995). Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Radical Bio. Med.* 19, 441-452.
- Engman, L., Stern, D., Cotgreave, I., Andersson, C.M. (1992). Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9737-9743.
- Fairhill, L.T. (1969). Tellurium. In: *Industrial Toxicology*, pp. 120. Hafner Publishing Co, New York & London.
- Goodrum, J.F. (1998). Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. *Neurochem. Res.* 23, 1313-1319.
- Harry, G.J., Goodrum, J.F., Bouldin, T.W., Wagner-Recio, M., Toews, A.D., Morell, P. (1989). Tellurium-induced neuropathy: metabolic alterations associated with demyelination and remyelination in rat sciatic nerve. *J. Neurochem.* 52, 938-945.

- Laden, B., Porter, T. (2001). Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds. Evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J. Lipid. Res.* 42, 235-240.
- Lampert, P.W., Garrett, R.S. (1971). Mechanism of demyelination in tellurium neuropathy. Electron microscopic observations. *Lab. Invest.* 25, 380-388.
- Maciel, E.N., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T. (2000). Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *J. Biochem. Mol. Toxic.* 14, 310-319.
- Meotti, F.C., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. (2003). Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol. Lett.* 143, 9-16.
- Mirkin, B.L. (1973). Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 14, 643-647.
- Morell, P., Toews, A.D., Wagner, M., Goodrum, J.F. (1994). Gene expression during tellurium-induced primary demyelination. *Neurotoxicology* 15, 171-180.
- Moretto, M.B., Rossato, J.I., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T. (2003). Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into brain synaptosomes is voltage-dependent. *J. Biochem. Mol. Toxic.* 17, 154-160.
- Murphy, L. (1965). In *Teratology* (Eds. J.G. Wilson and J. Warkany; University of Chicago Press, Chicago, 111).
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B.T. (2001a). Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.* 906, 157-163.
- Nogueira, C.W., Maciel, E.M., Zeni, G., Graça, D., Rocha, J.B.T. (2001b). Biochemical toxicology of simple diorganoyl chalcogenides. ECSOC Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry.; <http://www.mdpi.net/ecsoc-5/d0013>.
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Zeni, G., Souza, D. O., Rocha, J.B.T. (2002). Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 27, 283-288.
- Nyska, A., Waner, T., Pirak, M., Albeck, M., Sredni, B. (1989). Toxicity study in rats of a tellurium based immunomodulating drug, AS-101: a potential drug for AIDS and cancer patients. *Arch. Toxicol.* 63, 386-393.
- Petragnani, N. (1994). Preparation of the Principal Classes of Organic Tellurium compounds. In *Tellurium in Organic Synthesis* (A.R. Katritzky, O. Meth-Cohn, C.W. Rees), pp. 9-88. Academic Press, London.

- Perez-D'Gregorio, R.E., Miller, R.K. (1988). Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. *Teratology* 37, 307-316.
- Sredni, B., Caspi, R.R., Klein, A., Kalechman, Y., Danziger, Y., Ben Ya'akov, M., Tamari, T., Shalit, F., Albeck, M. (1987). A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. *Nature* 330, 173-176.
- Sredni B, Caspi RR, Lustig S, Klein A, Kalechman Y, Danziger Y, Ben Ya'akov M, Tamari T, Shalit F, Albeck M. (1988). The biological activity and immunotherapeutic properties of AS-101, a synthetic organotellurium compound. *Nat Immun Cell Grow.* 7, 163-168.
- U.S. Bureau of Mines, 1985. Mineral Year Book, (1984). U.S. Government Printing Office, Vol. I, pp. 1018-1021. Washington D.C.
- Wagner-Recio, M., Toews, A.D., Morell, P. (1991). Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: Preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. *J. Neurochem.* 57, 1891-1901.
- Zeni, G.; Braga, A. L.; Stefani, H. A. (2003). Palladium-catalyzed coupling of sp²-hybridized tellurides. *Accounts Chem. Res.* 10, 731-738.

Table 1- Evaluation of maternal body weight, fetal parameters, numbers of fetal deaths, numbers of live fetuses, numbers of litters with malformed fetuses and the characteristics of malformations.

	GD6		GD10		GD17	
	Control	(PhTe) ₂ 0.12 mg/kg	Control	(PhTe) ₂ 0.12 mg/kg	Control	(PhTe) ₂ 0.12 mg/kg
Maternal body weight at GD20 ^a	280.0 ± 8.2	302.0 ± 7.0	286.8 ± 9.9	268.0 ± 6.7	265.8 ± 15.6	249.6 ± 5.2
N ^o of litters	9	12	5	12	8	12
Mean of fetuses per litter ^a	9.3 ± 0.9	9.5 ± 0.9	9.4 ± 1.2	8.2 ± 1.1	8.4 ± 0.7	9.2 ± 0.5
Fetal parameters						
Live fetuses % ^b	100 (84 / 84)	100 (114 / 114)	100 (75 / 75)	27 (27 / 99)	100 (42 / 42)	6 (8 / 111)
Dead fetuses % ^b	0 (0 / 84)	0 (0 / 114)	0 (0 / 75)	73 (72 / 99)	0 (0 / 42)	94 (103 / 111)
Body weight (g) ^a	3.20 ± 0.072	3.27 ± 0.114	3.55 ± 0.164	2.42 ± 0.122*	3.47 ± 0.104	3.28 ± 0.144
Measurements (cm) ^a						
Body length	3.62 ± 0.030	3.50 ± 0.032	3.62 ± 0.057	2.89 ± 0.037*	3.60 ± 0.036	2.87 ± 0.054*
Occipito/nasal	1.56 ± 0.020	1.51 ± 0.024	1.59 ± 0.018	1.25 ± 0.052*	1.59 ± 0.013	1.57 ± 0.027
Neck	1.05 ± 0.010	0.98 ± 0.018	1.05 ± 0.023	0.89 ± 0.043*	1.07 ± 0.013	1.41 ± 0.027*
Abdomen umbilicus	1.24 ± 0.010	1.22 ± 0.018	1.27 ± 0.011	0.98 ± 0.082*	1.31 ± 0.022	1.35 ± 0.021
Kidney length	0.39 ± 0.007	0.36 ± 0.004	0.37 ± 0.006	0.26 ± 0.010*	0.37 ± 0.001	0.27 ± 0.012*
Organs weight (g) ^a						
Brain	0.15 ± 0.007	0.16 ± 0.005	0.14 ± 0.005	0.10 ± 0.014*	0.15 ± 0.001	0.09 ± 0.004*
Liver	0.22 ± 0.015	0.24 ± 0.011	0.23 ± 0.010	0.19 ± 0.011	0.26 ± 0.001	0.19 ± 0.020
Litters with malformations ^c						
Edema	0/9	0/12	0/5	1/12	0/8	10/12
Clot of blood s.c.	0/9	0/12	0/5	9/12	0/8	1/12
Absent or short tail	0/9	0/12	0/5	8/12	0/8	0/12
Exophthalmia	0/9	0/12	0/5	9/12	0/8	0/12
Exencephaly	0/9	0/12	0/5	9/12	0/8	0/12
Hydrocephalus	0/9	0/12	0/5	8/12	0/8	10/12
Fore- and hind-limbs	0/9	0/12	0/5	10/12	0/8	0/12

^aData are recorded as mean ± S.E.M of 5-12 animals per group.

^b() =Number of fetuses live or dead/total of fetuses.

^cNumber of litters with malformations/number total of litters.

* $P < 0.05$, as compared to the respective control group.

Legends

Figure 1- Structure of diphenyl ditelluride.

Figure 2- External measurements performed in day 20 rat fetuses.

Figure 3- Maternal body weight gain during the gestation. Data are recorded as % of initial weight x days of gestation. (a) dams that received $(\text{PhTe})_2$ or canole oil at GD6; (b) dams that received $(\text{PhTe})_2$ or canole oil at GD10; (c) dams that received $(\text{PhTe})_2$ or canole oil at GD17. Data are reported as mean \pm S.E.M. *Denote $p < 0.05$ as compared to control group.

Figure 4- Histological evaluation of the fetus heads (sagittal section), with 20 days of intrauterine life, exposed to $(\text{PhTe})_2$ at GD10. (a) Control fetus (canole oil at GD10): no fetal head alteration was observed; (b) Treated fetus (0.12 mg/kg of $(\text{PhTe})_2$ at GD10): displaced brain tissue, with absence of the cranial bone and cutaneous tissue, confirming: the presence of exencephaly, the main characteristic observed in these animals. (1)cerebral tissue; (2) cartilage; (3) muscular layer; (4) skin (40x magnification).

Figure 5- Histological evaluation of the fetus heads (sagittal section), with 20 days of intrauterine life, exposed to injury at GD17. (a) Control fetus (canole oil at GD17): no fetal head alteration was observed; (b) Treated fetus (0.12 mg/kg of $(\text{PhTe})_2$ at GD17): decrease of the brain volume with consequent lateral ventricles dilation, the adjacent tissues, whether found, were sharply altered (more thin) when compared to control group tissues. (1) cerebral tissue; (2) cartilage; (3) muscular layer; (4) skin (40x magnification).

Figure 6- Histological evaluation of the posterior half of the fetus neck, with 20 days of intrauterine life, exposed to $(\text{PhTe})_2$ at GD17. (a) Control fetus (canole oil at GD17): no fetal alteration was observed; (b) Treated fetus (0.12 mg/kg of $(\text{PhTe})_2$ at GD17): the presence of subcutaneous weak embryonal connective tissue (1), responsible for apparent edema; the spinal cord was sharply reduced. (2) spinal cord; (3) skin (40x magnification).

Figure 7- Histological evaluation of anterior half of the neck of the fetus, with 20 days of intrauterine life, exposed to $(\text{PhTe})_2$ at GD17. (a) Control fetus (canole oil at GD17): no fetal alteration was observed; (b) Treated fetus (0.12 mg/kg of $(\text{PhTe})_2$ at GD17): the presence of subcutaneous embryonal connective tissue (1), responsible for apparent edema; the salivary glands were found dislocated embedded by connective tissue. (2) salivary glands; (3) skin (40x magnification).

Figure 1

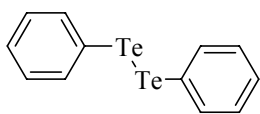


Figure 3a

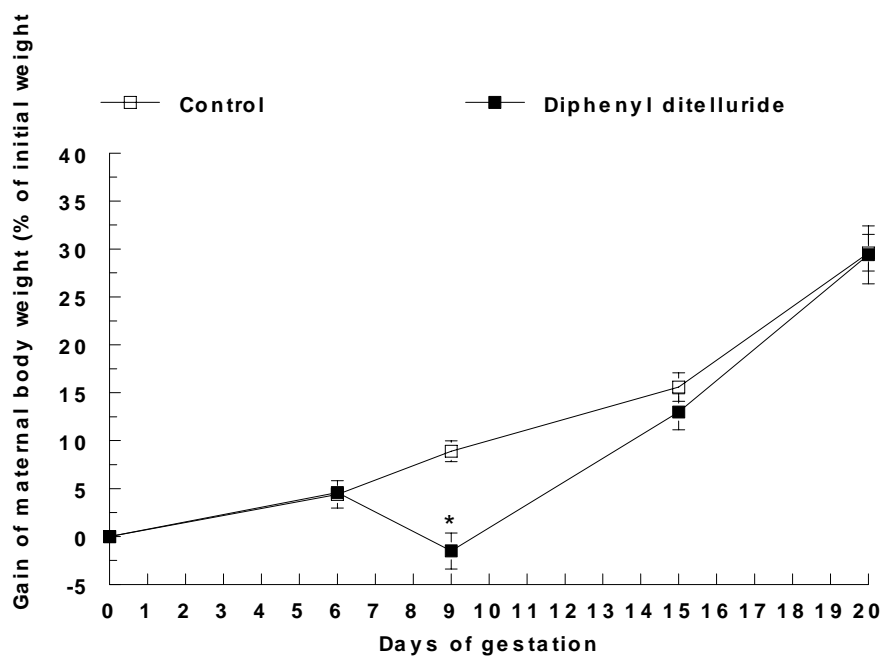


Figure 3b

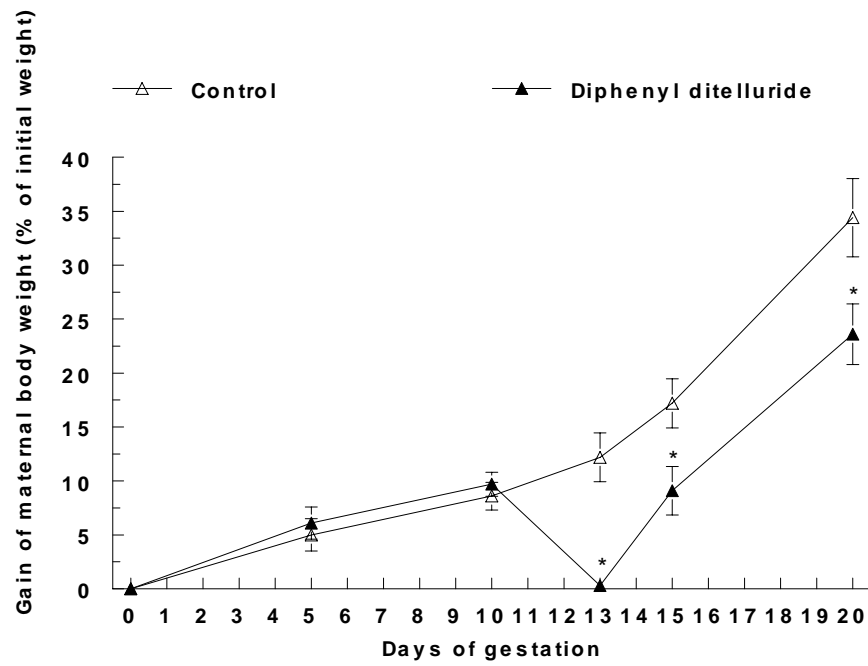


Figure 3c

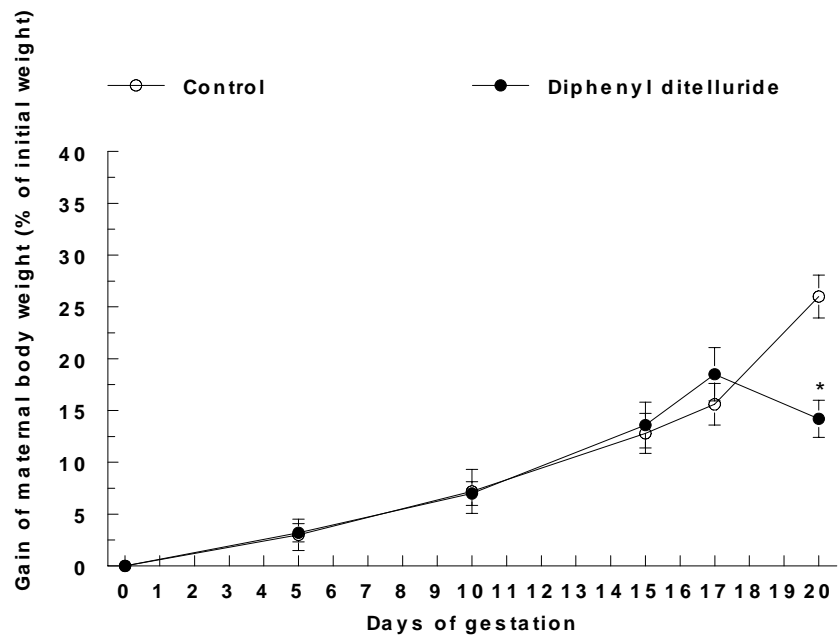


Figure 4

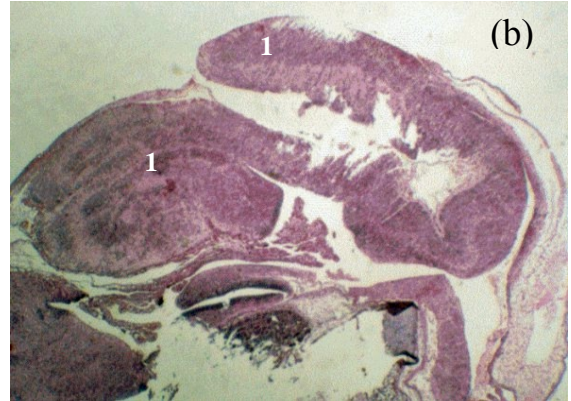
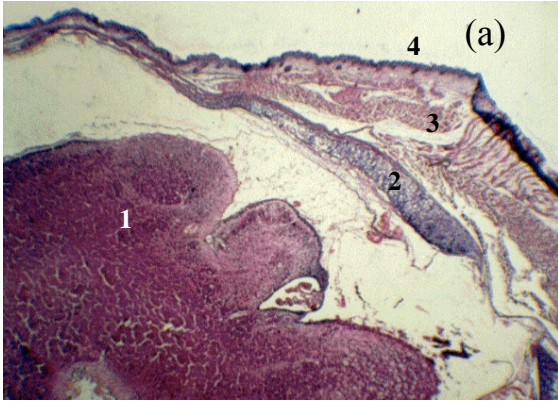


Figure 5

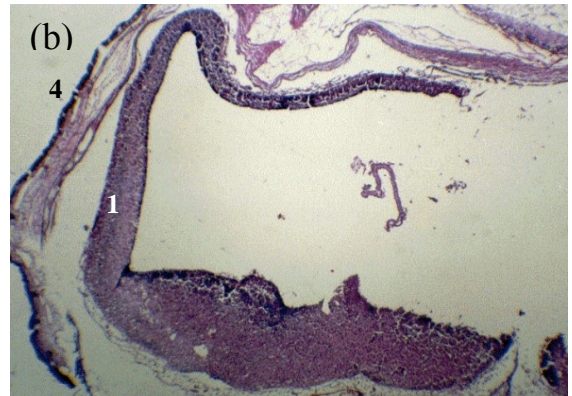
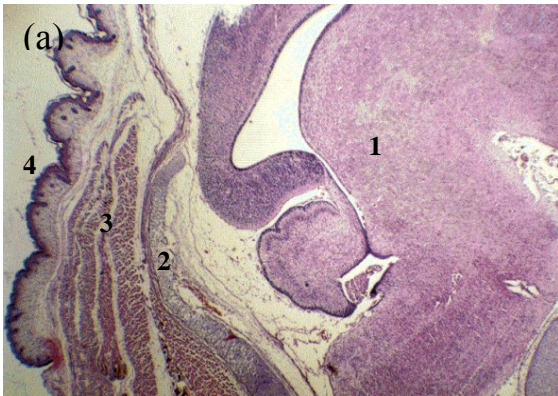


Figure 6

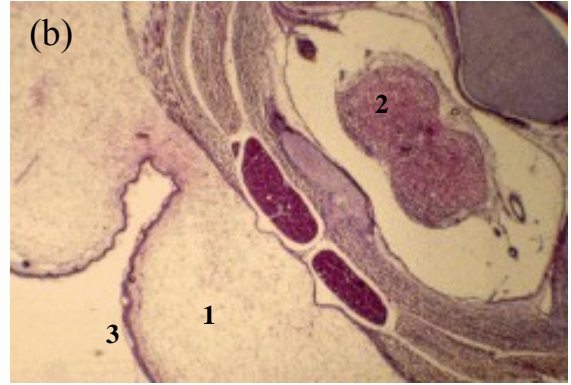
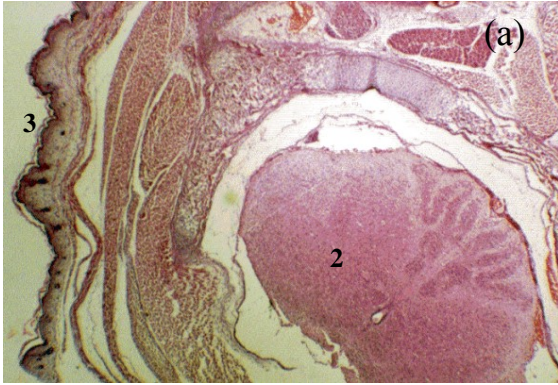
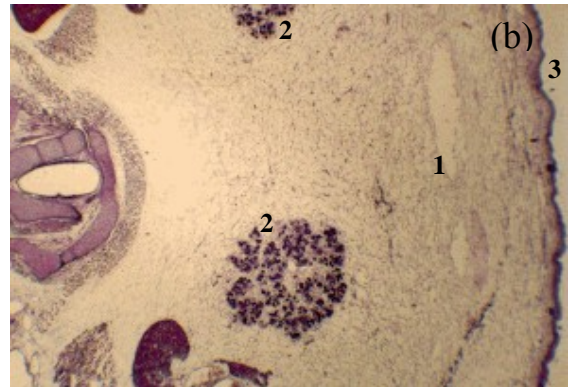
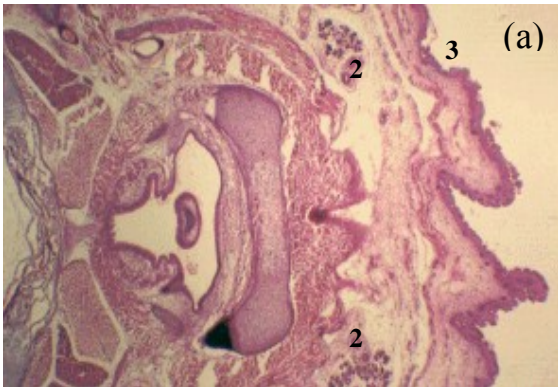


Figure 7



II.2. CAPÍTULO 2

EFEITO DE ORGANOCALCOGÊNIOS SOBRE O REPRODUÇÃO MASCULINA, EM RATOS WISTAR

II.2.1. Artigo 2

ABSENCE OF REPRODUCTIVE TOXICITY IN MALE RATS FOLLOWING ACUTE EXPOSURE TO DIPHENYL DISELENIDE AND DIPHENYL DITELLURIDE

Stangherlin, E.C.; Favero, A.M.; Rocha, J.B.T.;

Zeni, G.; Nogueira, C.W.

Submetido ao Toxicology

**ABSENCE OF REPRODUCTIVE TOXICITY IN MALE RATS
FOLLOWING ACUTE EXPOSURE TO DIPHENYL DISELENIDE AND
DIPHENYL DITELLURIDE**

Stangherlin, E.C.; Favero, A.M.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.*

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de
Santa Maria, SM, RS, CEP 97105-900 Santa Maria, Brazil

Correspondence should be sent to:

Cristina Wayne Nogueira

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de
Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Phone: 55-55 220-8140

FAX: 55-55-220-8978

E-mail: criswn@quimica.ufsm.br (Nogueira CW)

Abstract

Adult male rats were exposed acutely (single dose) to diphenyl diselenide ((PhSe)₂ - 400 μmol/kg, i.p.) or diphenyl ditelluride ((PhTe)₂ - 0.22 μmol/kg, i.p.), prior to mating. A number of biochemical parameters in rat testes were examined, such as δ-aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D) activity, lipid peroxidation, glycogen content and components of the antioxidant defenses (superoxide dismutase (SOD) activity and ascorbic acid concentration). Furthermore, a possible effect on fertility and reproductive performance in male rats were studied. No lethality was noted in any group. Clinical signs of toxicity following administration of drug were evidenced for reduction of body weight in the rats which received (PhTe)₂ and (PhSe)₂. However, eight days after organocalchogens exposure the mating and fertility indices were not affected in treated groups. Regarding to other parameters studied, except for a decrease in testes glycogen content on (PhSe)₂-treated group, no alterations were found on treated groups. Histological evaluation revealed no modification on the testicular tissue. Based on data of this study, there was no reproductive toxicity in male Wistar rats exposed acutely to (PhTe)₂ and (PhSe)₂.

Key words: Fertility, organoselenium, organotellurium, toxicity, testes.

1. Introduction

Selenium (Se^0) is known to be an essential trace element for mammalian species. A major focus of recent research has been the function and molecular biology of selenoproteins. It has been established that the selenium is present as selenocysteine residue in the active site of the enzymes glutathione peroxidase (Wingler and Brigelius-Flohé, 1999), thioredoxin reductase (Holmgren, 1985), 5'-deiodinase (Behne and Kyriakopoulos, 1990) and selenoprotein P (Ursini et al., 1990). The redox activity of the selenium has fundamental importance to the catalytic activity of the enzymes.

Recently, *in vitro* studies demonstrated that organoselenium compounds (alkyl and aryl diselenides) can be considered potential antioxidant compounds (Parnham and Graf, 1991; Meotti et al., 2004). Besides, our group has also demonstrated that diphenyl diselenide possess other pharmacological properties such as antiulcer (Trevisan et al., 2004), anti-inflammatory and antinociceptive agent (Nogueira et al., 2003a).

However, it is well known that inorganic selenium can be highly toxic to several species of mammals (Painter, 1941; Penrith, 1995). Organic compounds of selenium, including diphenyl diselenide, are also recognized for inducing toxicity *in vitro* and *in vivo*. In this regard, data from our laboratory have shown that organic forms of selenium can be neurotoxic (Nogueira et al., 2003b) for adult rodents (mice and rats), or noxious for proteins or enzymes of several tissues of mammals, such as δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001; Nogueira et al., 2003c). δ -ALA-D is a sulfhydryl-containing enzyme that catalyzes the condensation of two δ -aminolevulinic acid (ALA) molecules with the formation of porphobilinogen (PBG), which is a heme precursor (Jaffe, 1995). Consequently, δ -ALA-D inhibition may impair heme biosynthesis (Sassa et al., 1989) and can result in the accumulation of ALA, which may affect the aerobic metabolism and may have some pro-oxidant activity (Bechara et al., 1993).

Tellurium (Te) has a similar electronic configuration to selenium and, consequently, it shares some chemical properties with selenium. However, in contrast to the case of selenium, surprisingly little is known about the occurrence of tellurium in the biological systems. Besides, tellurium is used as an industrial component of many alloys. It is also used in the glass and steel production industries and as a gasoline antiknock additive (Fairhill, 1969). Inorganic and organotellurium compounds are highly toxic to the CNS of rodents (Tsen and Tappel, 1958; Hu and Tappel, 1987; Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2001; Widy-

Tyszewicz et al., 2002; Meotti et al., 2003) probably by disrupting cholesterol synthesis in Schwann cells through the inhibition of squalene monooxygenase (Wagner-Recio et al., 1991). Squalene monooxygenase is a sulfhydryl enzyme that could be also inhibited by selenium compounds, leading to inhibition of myelin formation and degeneration (Gupta and Porter, 2001). Besides, (PhTe)₂ at low dose can be teratogenic to the rat fetus without concomitant maternal toxicity. The two last fetal periods of development in the rat are the critical periods for induction of anomalies by (PhTe)₂ (Stangherlin et al., 2004).

In addition, tellurium and selenium compounds are simple synthetic intermediaries in organic synthesis (Braga et al., 1997; Zeni et al., 2001), which increases the risk of exposure in the workplace.

Following this reasoning, a variety of chemical compounds, including metals, are known to alter different phases of reproduction and development, leading to fertility impairment (Xu et al., 1993; Domingo, 1994). The oxidative stress is associated with reproductive impairment (Ahotupa and Huhtaniemi, 1992), and studies demonstrated that an increase in the formation of reactive oxygen species decrease fertility. In fact, the reactive oxygen species will attack the membranes of the spermatozoa, decreasing their viability (Irvine, 1996).

Besides, it is widely documented that vitamins and minerals play an important role in the growth of animals and their physiological functions, as well as their reproductive performance. Evidence suggests that selenium deficiency plays a role in numerous economically important livestock diseases. Selenium-responsive problems include impaired fertility, abortion, retained placenta and neonatal weakness (Gabryszuk and Klewicz, 2002).

In contrast, little is known about the possible effects of selenium and tellurium on the fertility and reproductive system of male rat. Therefore, the present study was designed to investigate the effects of acute exposure of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride on the testes and fertility of male rats.

2. Materials and Methods

2.1. Compounds

Diphenyl diselenide (Fig 1a) and diphenyl ditelluride (Fig 1b) were synthesized by the method previously described (Paulmier, 1986 and Petragani, 1994, respectively). Analysis of the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed that the compound obtained presented analytical

and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. These drugs were suspended in canole oil, which was obtained from standard commercial supplier. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Animals

Sexually mature male and female Wistar rats, weighing 200-300g, from our own breeding colony were used. The animals were kept on a 12 light/dark cycle, at a room temperature of 22°C, 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, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil. Male were considered sexually active if they previously breed with other females.

2.3. Exposure to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride

The control group received only vehicle (canole oil, 1mL/kg). Treated groups were exposed to (PhSe)₂ - 400 µmol/kg (1/3 DL₅₀) or (PhTe)₂ - 0.22 µmol/kg (1/3 DL₅₀), these compounds were suspended in an equivalent volume of canole oil administrated intraperitoneally (i.p.), one day prior to be paired with untreated female. The doses of drugs were selected on the basis of LD₅₀ studies (Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2003b).

2.4. Examination of male fertility

Fertility was estimated in adult male according the method of Manson and Kang (1989). Twenty four hours after exposure period, each male was placed in a separate cage with two virgin untreated female of the some strain. They are left together for 7 days, and during this period, one estrous cycle should have elapsed (Fox et al., 1970). Following positive identification of mating, female were placed to individual cages. Positive mating was confirmed by the presence of a copulatory plug or the presence of sperm in the vaginal smears. Each mating set was examined daily and when evidence of mating was identified that day was determined day 0 of pregnancy (GD0). The dams were sacrificed on GD20 for confirmation of pregnancy. The fertility index was analyzed, i.e. (n° of males that became sire/ n° of male placed with female) x 100.

2.5. Male toxicity

Male toxicity was evaluated by monitoring the body weight changes following period of acute exposure at mating. At the end of the mating period, the males were euthanized by chloroform and the testes were removed and weight. This organ was used for determination of the toxicological biochemical parameters (*ex vivo* experiments). Indeed, the fertility and reproductive performance was evaluated.

2.5.1. δ -Aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity

The effect of acute exposure to (PhSe)₂ and (PhTe)₂ on δ -ALA-D enzyme was investigated in testes of male rats according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation. Briefly, samples were homogenized in 0.9% NaCl in the proportion of 1/5 (w/v) and centrifuged at 2,400 g for 10 min. All experiments were carried out after 10 min of pre-incubation at 37°C. The reaction was started 10 min after the addition of the enzyme preparation by adding the substrate. The incubation was carried out for 2h at 37°C and was stopped by adding 10% trichloroacetic acid and 10 mM HgCl₂. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555nm.

2.5.2. Lipid peroxidation

Testes were rapidly homogenized in 50 mM Tris-Cl, pH 7.5 (1/10, w/v) and centrifuged at 2,400 g for 10 min. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were determined according to Ohkawa et al. (1979). Briefly, the reaction mixture contained 8.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), supernatant fraction (S1), 1.267 mol/L acetic acid, 270 mmol/L HCl, pH 3.5, and TBA 0.8%. TBARS were quantified by adding S1 directly to the above reaction medium. Samples were incubated at 95°C for 2 h. The amount of TBARS produced was spectrophotometrically measured at 532 nm, using MDA (malondialdehyde) to construct standard curves.

2.5.3. Superoxide dismutase (SOD) activity

Superoxide dismutase (SOD) activity in testes was assayed spectrophotometrically as described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the capacity of SOD to

inhibit autoxidation of adrenaline to adrenochrome at alkaline pH. The color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinefrine autoxidation by 50 % at 26 °C.

2.5.4. Ascorbic acid determination

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). Proteins (testes) were precipitated in 10 volumes of a cold 40% trichloroacetic acid solution. An aliquot of the sample in a final volume of 1 mL of the solution was incubated for 3 h at 37°C, then 1 mL H₂SO₄ 65 % (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using color reagent contained 4.5 mg/mL dinitrophenyl hydrazine and CuSO₄ (0.075 mg/mL).

2.5.5. Glycogen Content

Glycogen content was assayed by the method described by Krisman (1962). Briefly, 0.2 g of testes were treated with 2 ml of KOH 30%. After, 10 minutes in boiling water bath, 2 mL of ethanol was added to the tubes to precipitate glycogen. After precipitation, glycogen was resuspended in 0.2 mL 5N HCl and 0.8 mL distilled water. The glycogen content was measured with iodine reagent at 460 nm.

2.5.6. Protein estimation

Protein was measured following the method of Lowry (1951), using bovine serum albumin as standard.

2.5.7. Histological evaluation of testis

For qualitative analyses of testicular histology, one testis from each animal was fixed in Bouin's solution for 7 days. The Bouin's-fixed testes were embedded in paraffin wax and blocks were prepared. Testicular section were collected from each testis and stained with hematoxylin and eosin. Histological analysis was performed using light microscopy.

2.6. Statistical analysis

Data from *ex vivo* experiments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test when appropriate. Repeated measures were used to examine body weight changes. All differences with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1 Effect of diphenyl ditelluride administration on reproductive parameters in male rats

Figure 2 shows that (PhTe)₂-treated rats had loss of body weight at day 3. However, body weight gain was unaffected by drug administration throughout the study. As well, there was no change in testes weight on treated animals (data not shown).

A similar lack of effect was noted on reproductive performance. Mating and fertility index were comparable between treated and control groups. All males in the control and treated groups had evidence of mating litter. One male in the control group and 2 males on the (PhTe)₂-treated group sired more than one litter. However, 1 and 2 males in the control and treated groups, respectively, failed to sire a litter (Table 1).

3.2. Effect of diphenyl diselenide administration on reproductive parameters in male rats

Figure 3 shows that (PhSe)₂-treated rats presented loss of body weight in days 3, 5 and 8 after administration.

No significant effect was noted on reproductive performance. Mating and fertility index were comparable between (PhSe)₂-treated and control groups. All males in the control and (PhSe)₂- treated groups had evidence of mating litter. One male in the control group and 5 male on the (PhSe)₂-treated group sired more than one litter (Table 1).

3.3. Evaluation of biochemical parameters

Regarding to other parameters studied, except for a decrease in testes glycogen content on (PhSe)₂-treated group (Fig. 4), no alterations were found on level of lipid peroxidation (Fig. 5), ascorbic acid concentration (Fig. 6), δ -ALA-D (Fig. 7) and superoxide dismutase (Fig. 8) activities in the groups that received (PhTe)₂ or (PhSe)₂.

3.3. Histological evaluation

Histological evaluation revealed that no modification was found on the testicular tissue. The testis of control and treated groups (Fig. 9) exhibited normal morphological architecture. The seminiferous tubule showed successive stages of transformation of spermatogonia into spermatozoa and lumen filled with spermatozoa.

4. Discussion

The present study establishes that no reproductive toxicity appear after diphenyl diselenide or diphenyl telluride acute administration, demonstrated by normal sexual behavioral and reproductive performance unaltered. Besides, the external appearance of the testicular tissue of the treated animals was unaffected after treatments. The small differences between the groups may be attributed to stress of the individuals and biological variations in this study.

There was no mortality in the group of male rats exposed to 1/3 DL₅₀ for (PhSe)₂ or (PhTe)₂, however loss body weight indicated general toxicity, which was recovered at the end of experimental period. Accordingly, selenium and tellurium compounds have been reported to affect body weight gain in animals (Tinggi, 2003; Stangherlin et al., 2004).

In addition, diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide appear not be noxious for rats in this protocol design, fact evidenced by the unchanged biochemical dosages. Similarly, in a preliminary study, we showed that 1/3 LD₅₀ for (PhSe)₂ or (PhTe)₂ acutely administrated in rats did not alter serum alanine and aspartate aminotransferase activities, and urea and creatinine (Meotti et al., 2003), suggesting absence of renal and hepatic toxicity.

Conversely, a decrease on the glycogen content was observed in animals treated with (PhSe)₂. Reduced glycogen level may be due to interference on glucose metabolism. Besides, absence of carbohydrates also suppresses Leydig cell function (Dixit and Joshi,

1987; Bedwal et al., 1994). Leydig cells produce the testosterone hormone, essential to growth and division of the germinative cells. In spite of the alteration on the glycogen level, (PhSe)₂ administration seem does not impair the reproductive performance of the animals, indicating that the tested dose of this compound was not deleterious.

The standard method for determining adverse effects of chemicals on fertility in animal experiments is based on mating trials to determine whether a given compound affects the reproduction. Sensitive endpoints for assessing male reproductive toxicity include histopathology and fertility (Mangelsdorf et al., 2002). As stated, histopathology is a sensitive endpoint for the analysis of reproductive toxicity, and the primary targets of a toxicant are cells at early stages of spermatogenesis, i.e., spermatogonia. After a single dose, spermatogonia are first affected, which can only be detected by histopathology. Subsequently, all other spermatogenic cells are affected and then depleted (Mangelsdorf et al., 2002). In this study, histological evaluation revealed that no modification was found on the testicular morphological architecture on (PhSe)₂ or (PhTe)₂-treated groups. The seminiferous tubule showed successive stages of transformation of spermatogonia into spermatozoa and lumen filled with spermatozoa.

Taking into account the importance of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide as intermediates in organic synthesis (Zeni et al., 2001; 2003), the possibility of occupational exposure to these compounds and their potential pharmacologic use, research is of the particular importance. In addition, we must emphasize that testicular toxicity of the diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide were tested by the first time in this study.

In conclusion, based on the present data there was no observed reproductive toxicity of both diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide in male Wistar rats when submitted to this experimental protocol.

References

- Agnew, W.F., Fauvre, F.M., Pudenz, P.H. (1968). Tellurium hydrocephalus: Distribution of tellurium-127m between maternal, fetal and neonatal tissues of the rat. *Exp. Neurol.* 21, 120-131.
- Altman, P.L. and Dittmer, D.S. (1962). Growth. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., Washington, D.C.
- Ahotupa, M., Huhtaniemi I., 1992 Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally criptorchid rat testis. *Biol. Reprod.* 46, 1114–8.

- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A.L., 1998. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 243-253.
- Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima Pereira, M., Demasi, B., Costa, M., Abdall, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.M.A., Masci, P.D., 1993. A free radical hypothesis of lead poisoning and in born porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quimica Nova* 16, 385-392.
- Bedwal, R.S., Edwards, M.S., Katosh, M., Babuguna, A., Dewan, R., 1994. Histological and biochemical changes in testes of Zinc deficient Bal B/C strain mice. *Indian J. Exp. Biol.* 32, 243-247.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., 1990. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 173, 1143-1149.
- Braga, A.L., Zeni, G., Andrade, L.H., Silveira, C.C., 1997. Stereoconservative formation and reactivity of δ -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinilyc chalcogens. *Synlett* 5, 595-596.
- Dixit, V.P., Joshi, S., 1987. Effect of chronic administration of garlic (*Allium salivum* Linn.) on testicular function. *Indian J. Exp. Biol.* 20, 534-536.
- Domingo J.L., 1994. Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review. *J. Toxicol. Environ. Health* 42, 123-141.
- Farina, M., Folmer, V., Bolzan, R.C., Andrade, L.H., Zeni, G., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2001. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol. Lett.* 119, 27-37.
- Fairhill, L.T., 1969. Tellurium. In: *Industrial Toxicology*. Hafner Publishing Co, New York & London, p. 120.
- Fox R.P., Laird C.W., 1970. Sexual cycles. In: Hafez ESE, editor. *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, p. 107-22.
- Gabryszuk, M., Klewicz, J., 2002. Effect of injecting 2- and 3-year-old ewes with selenium and selenium-vitamin E on reproduction and rearing of lambs. *Small Ruminant Res.* 43, 127-132.
- Gupta, N., Poter, T.D., 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by selenium compounds. *J. Biochem. Mol. Toxic.* 16, 18-23.
- Holmgren A., 1985. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54:237-271
- Hu, M.L., Tappel, A.L., 1987. Selenium as a sulphhydryl redox catalyst and survey of selenium-dependent enzymes. *J. Inorg. Biochem.* 30, 239-248.

- Irvine, D.S., 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.* 1, 6–12.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119-125.
- Jaffe, E.K., 1995. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 169-179.
- Krisman, C.R., 1962. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal. Biochem.* 4, 17-23.
- Lowry, O.H., Rosemburg, N.J., Farr, A.L., Roudall, R., 1951. Protein measurement with Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maciel, N., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects aminolevulinatase from liver, kidney and brain of mice. *J. Biochem. Mol. Toxic.* 14, 310-319.
- Mangelsdorf, I., Buschmann, J., Orthen, B., 2002. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul. Toxicol. Pharm.* 37, 356-369.
- Manson, J.M., Kang, Y.J., 1989. Test methods for assessment of female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes A.W., editor. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press; p. 311-361.
- Meotti, F.C., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2003. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol. Lett.* 143, 9-16.
- Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environm. Res.* 94, 276-282.
- Misra, H.P. and Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
- Nogueira, C.W., Maciel, E.M., Zeni, G., Graça, D., Rocha, J.B.T., 2001. Biochemical toxicology of simple diorganoyl chalcogenides. ECSOC Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, <http://www.mdpi.net/ecsoc-5/d0013>.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung., E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003a. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52, 56-63.
- Nogueira, C.W., Meotti, F.C., Curte, E., Pillissão, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003b. Investigations into potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 83, 29-37.

- Nogueira, C.W., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003c. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology*, 191, 169-178.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Painter, E.P., 1941. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. *Chem. Rev.* 28, 179-213.
- Parnham, M.J., Graf, E., 1991. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog. Drug Res.* 36, 9-47.
- Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, First ed. Pergamon Press, Oxford, England, pp. 25-51.
- Penrith, M.L., 1995. Acute selenium toxicosis as a cause of paralysis in pigs. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 66, 47-48.
- Petragnani, N., 1994. Preparation of the Principal Classes of Organic Tellurium compounds. In *Tellurium in Organic Syntesis* (A.R. Katritzky, O. Meth-Cohn, C.W. Rees), pp. 9-88. Academic Press, London.
- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*, 28, 133-145.
- Sassa, S., Fujita, H., Kappas, A., 1989. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: Kotik, A., Skoda, J., Paces, V., Kostka, V. (Eds.), *Highlights of modern biochemistry*, vol. 1., V.S.P., Utrecht, pp. 329-338.
- Stangherlin, E.C.; Favero, A.M.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W., 2004. Teratogenic vulnerability of rat fetuses to diphenyl ditelluride: prenatal assessment. *Toxicology*, *in press*
- Tinggi, U. 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol. Lett.* 137, 103-110.
- Trevisan, M., Savegnago, L., Alves, D., Zeni, G., Rocha, J. B. T., Nogueira, C.W. 2004. Antisecretory and Antiulcer Effects of Diphenyl Diselenide. *Inflamm. Res.*, *in press*.
- Tsen, C.C., Tappel, A.L., 1958. Catalytic oxidation of glutathione and other sulphhydryl compounds biselenite. *J. Biol. Chem.* 233, 1230-1232.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohé, L., 1990. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285, 1393-1396.

- Wagner-Recio, M., Toews, A.D., Morell, P., 1991. Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: Preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. *J. Neurochem.* 57, 1891-1901.
- Widy-Tyszewicz, E., Piechal, A., Gajkowska, B., Smialek, M., 2002. Tellurium-induced cognitive deficits in rats are related to neuropathological changes in the central nervous system. *Toxicol. Lett.* 131, 203-214.
- Wingler, K., Brigelius-Flohé, R., 1999. Gastrointestinal glutathione peroxidase. *Biofactors* 10, 245-249.
- Xu B., Chia S.E., Tsakok M., Ong ChN., 1993. Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reprod. Toxicol.* 7, 613–618.
- Zeni, G., Panatieri, R.B., Lissner, E., Menezes, P.H., Braga, A.L., Stefani, H.A., 2001. Synthesis of polyacetylenic acids isolated from *Heisteria Acuminata*. *Org. Lett.* 6, 819-821.
- Zeni, G.; Braga, A. L.; Stefani, H. A. 2003. Palladium-catalyzed coupling of sp(2)-hybridized tellurides. *Accounts Chem. Res.* 10, 731-738.

Table 1. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide acute exposure on fertility and reproductive performance of male Wistar rats

Parameters	Treatment - ($\mu\text{mol/kg}$)		
	Control ^a	0.22 (PhTe) ₂	400 (PhSe) ₂
No. evaluated	10	10	10
No. died or sacrificed moribund	0	0	0
No. with evidence of mating	10	10	10
No. not siring 1 litter	1	2	0
No. siring at least 1 litter	8	6	5
No. siring more than 1 litter	1	2	5
No. of fertile males	9	8	10
Mating index (%)	100	100	100
Fertility index (%)	90	80	100

^aControl animals received canole oil (1mL/Kg).

Legends

Figure 1. Structure of diphenyl diselenide (a) and diphenyl ditelluride (b)

Figure 2. Effect of diphenyl ditelluride acute exposure on body weight gain in male rats.

Animals received diphenyl ditelluride (0.22 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), one day prior (Day 0) to be paired with untreated female. Data are presented as mean \pm SEM (control: n=5; treated: n=8). *Denote $p < 0.05$ as compared to control group.

Figure 3. Effect of diphenyl diselenide acute exposure on body weight gain in male rats.

Animals received diphenyl diselenide (400 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), one day prior (Day 0) to be paired with untreated female. Data are presented as mean \pm SEM (control: n=5; treated: n=10). *Denote $p < 0.05$ as compared to control group.

Figure 4. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on testicular glycogen content.

Data are expressed as mean \pm SEM of 7-9 animals per group. *Denote $p < 0.05$ as compared to control group.

Figure 5. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on lipid peroxidation.

The reaction mixture contained 8.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), supernatant fraction (S1), 1.267 mol/L acetic acid, 270 mmol/L HCl, pH 3.5, and TBA 0.8%. TBARS were quantified by adding S1 directly to the above reaction medium. Samples were incubated at 95°C for 2 h. Data are expressed as mean \pm SEM of 9-10 animals per group.

Figure 6. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on testis ascorbic acid level.

An aliquot of the sample in a final volume of 1 mL of the solution was incubated for 3 h at 37°C, then 1 mL H₂SO₄ 65 % (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using color reagent contained 4.5 mg/mL dinitrophenyl hydrazine and CuSO₄. Data are expressed as means \pm SD of 10 animals per group.

Figure 7. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on δ -ALA-D activity.

Tissues were pre-incubated at 37°C for ten minutes. Enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) to a final concentration of 2.2 mM in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 10 animals per group.

Figure 8. Effect of diphenyl ditelluride and diphenyl diselenide on superoxide dismutase activity in rats.

One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinefrine autoxidation by 50 % at 26 °C. Data are expressed as mean \pm S.D. of 8-10 animals per group.

Figure 9. Testicular sections of control rat (a and d), diphenyl ditelluride (b and e) and diphenyl diselenide (c and f) treated rats. Note the normal morphological architecture. The seminiferous tubule showed successive stages of transformation of spermatogonia into spermatozoa and lumen filled with spermatozoa. Hematoxylin and eosin, (a), (b) and (c): 40 x; (d), (e) and (f) 400x.

Figure 1



Figure 2

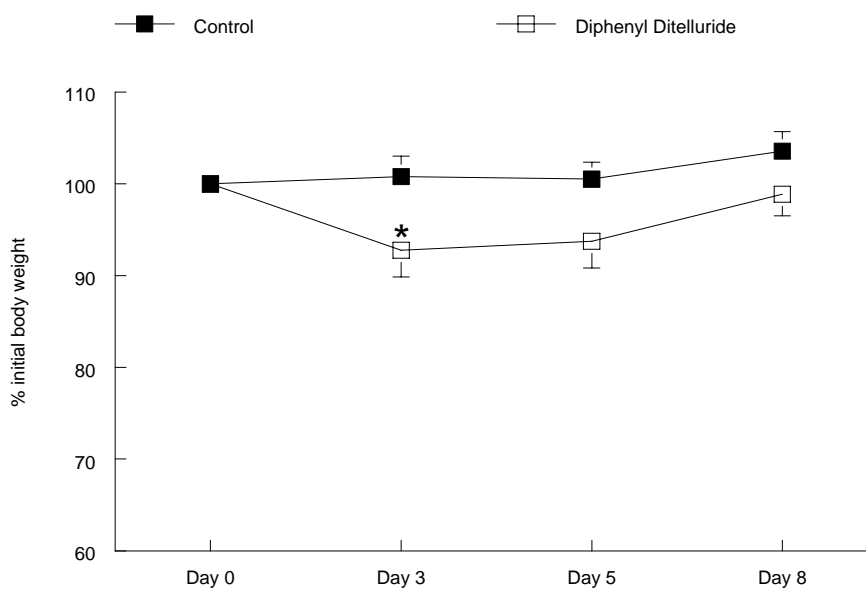


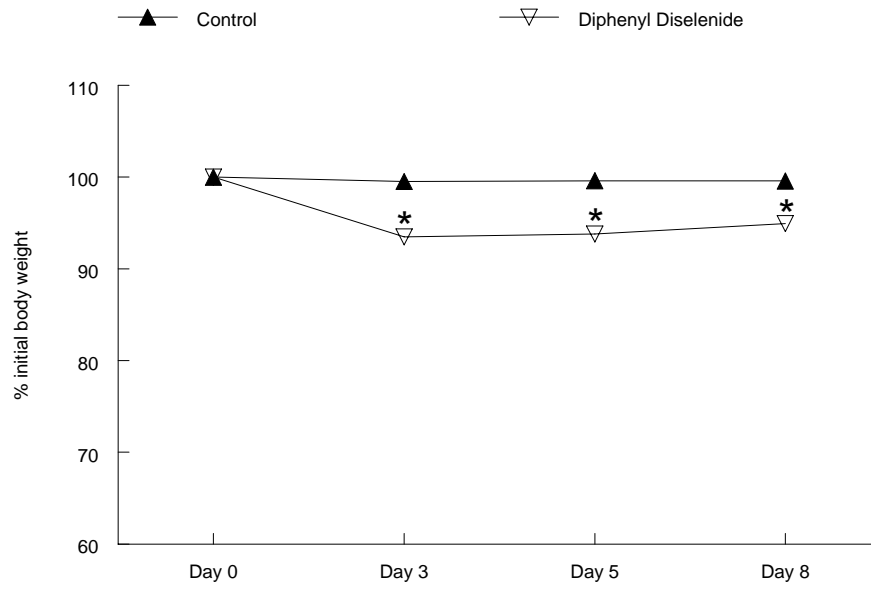
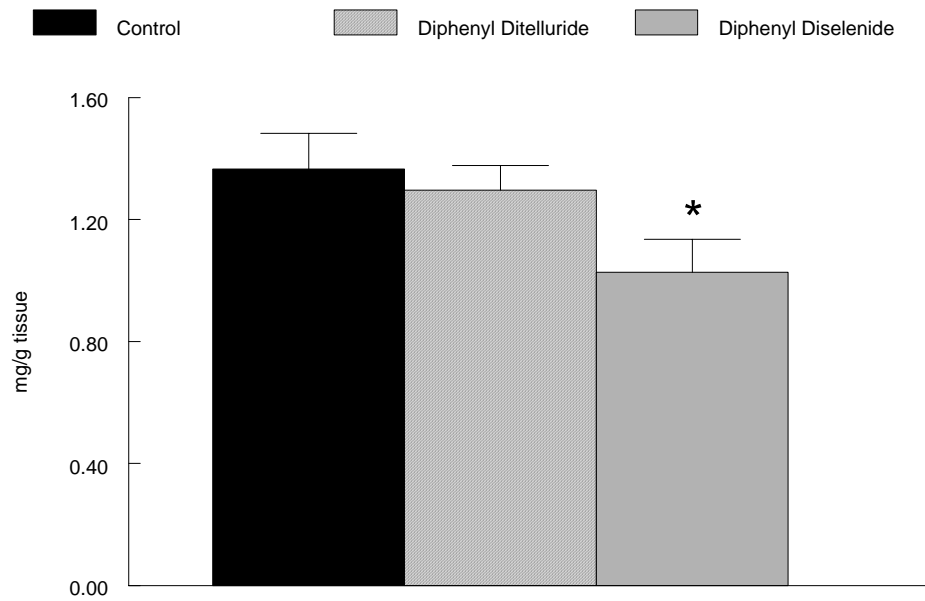
Figure 3**Figure 4**

Figure 5

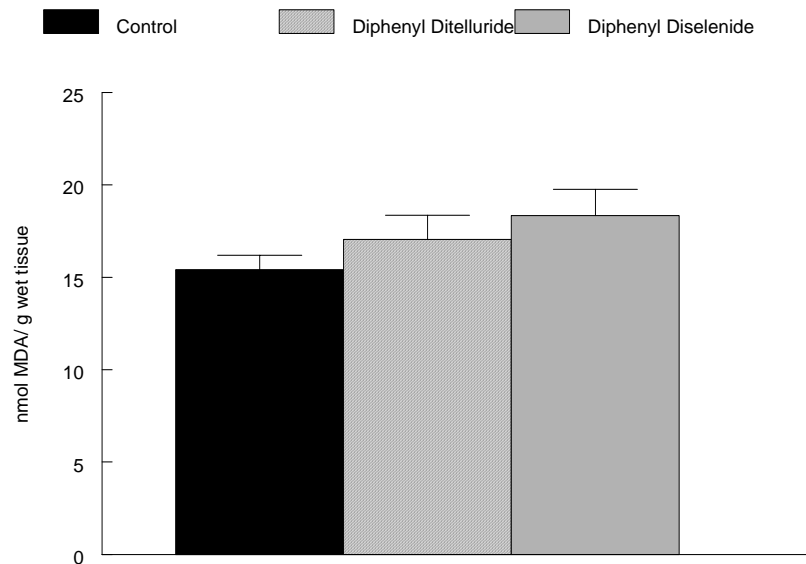


Figure 6

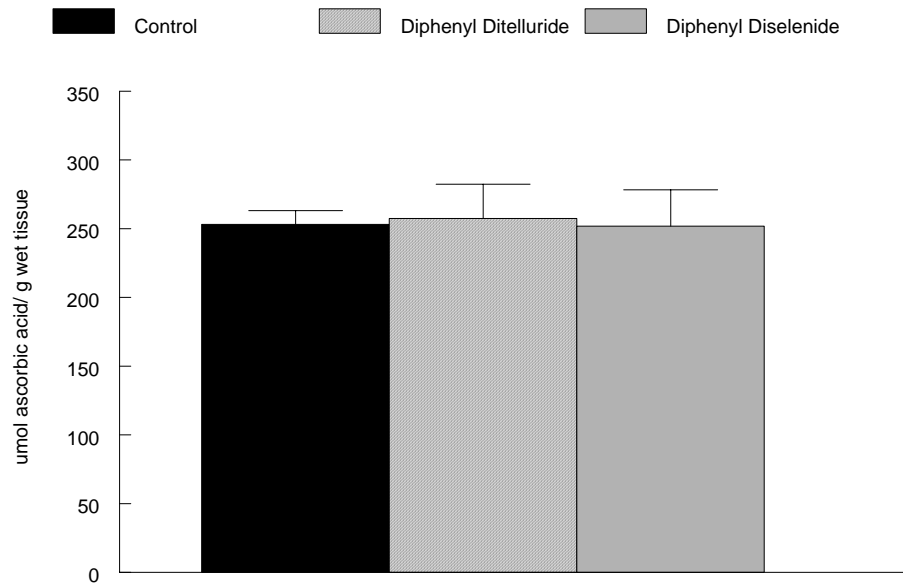


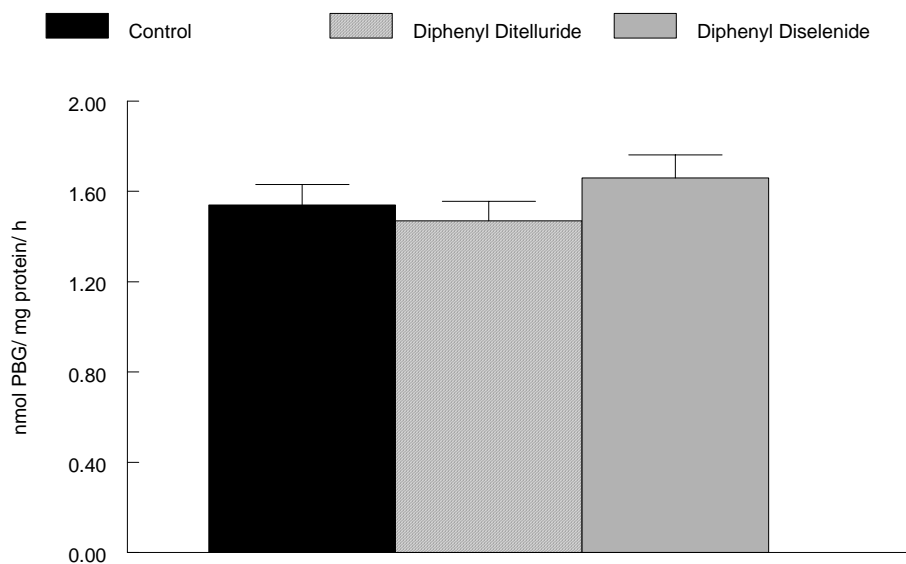
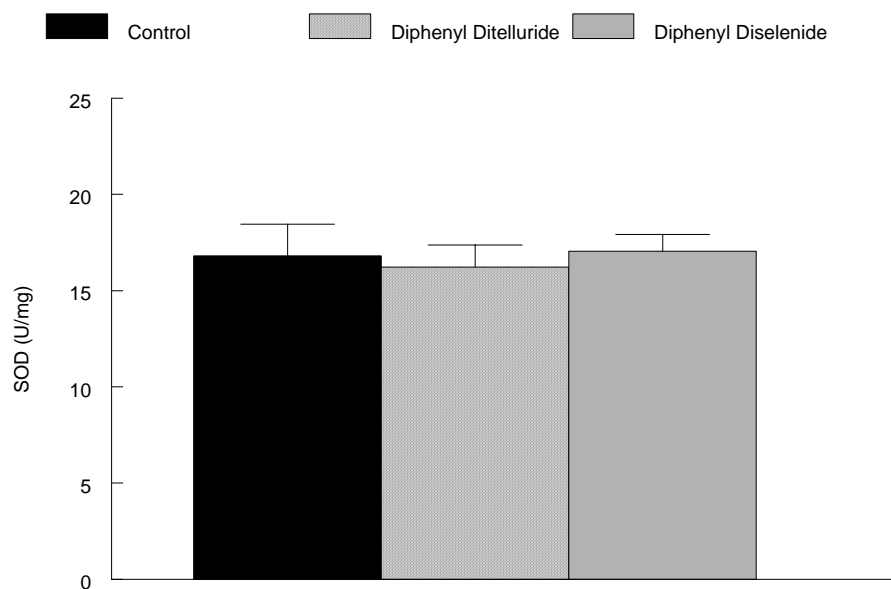
Figure 7**Figure 8**

Figure 9

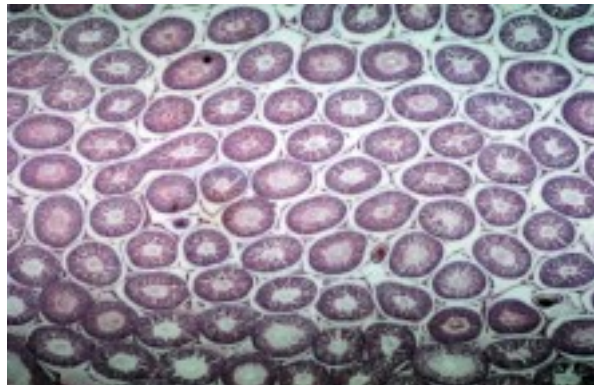


Figure 9a

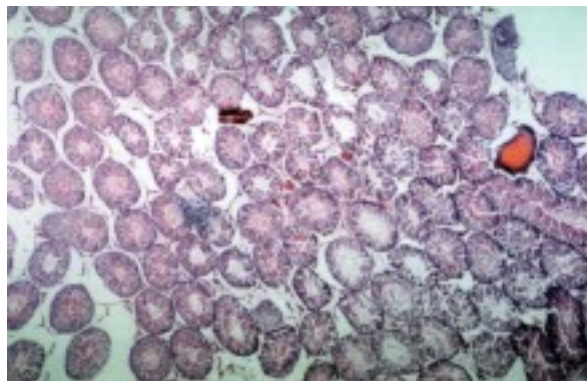


Figure 9b

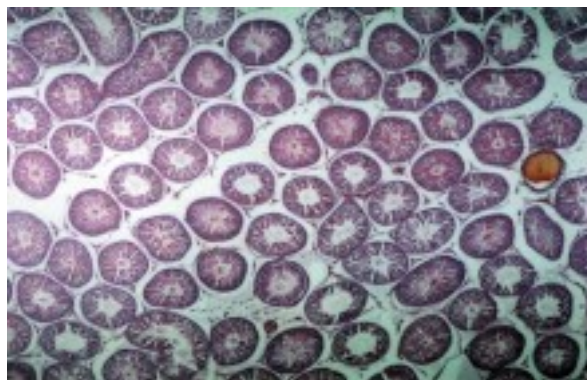


Figure 9c

Figure 9d

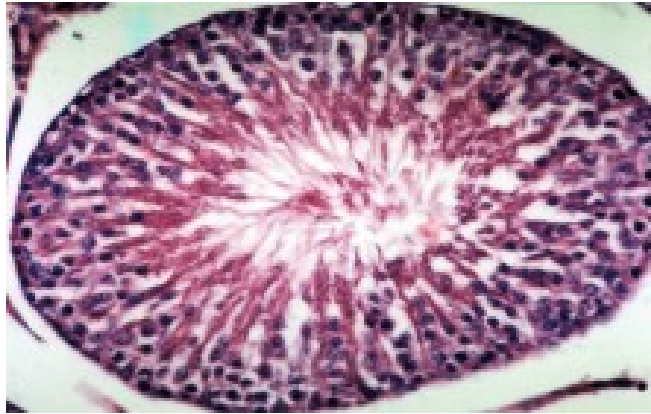


Figure 9e

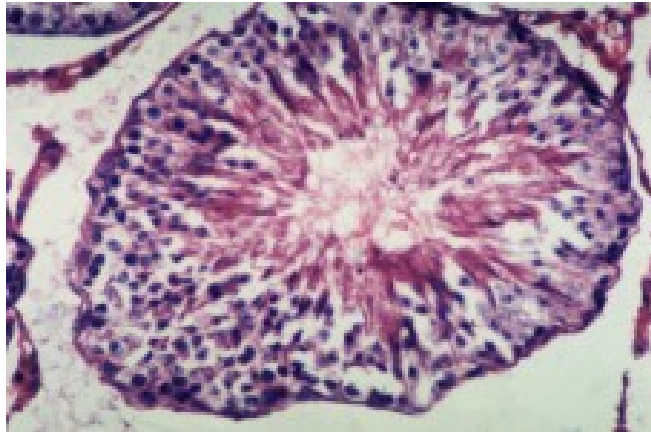
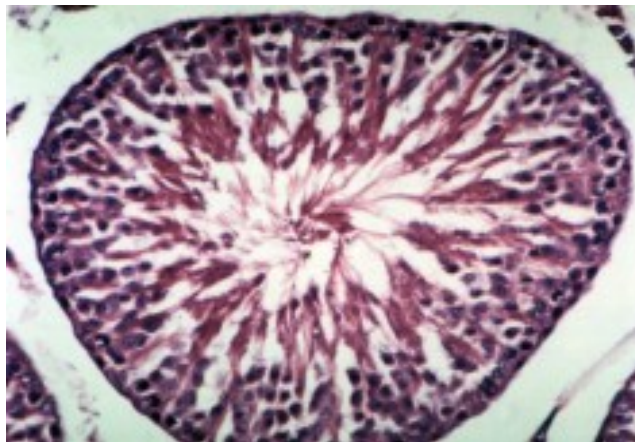


Figure 9f



III. DISCUSSÃO

III. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou o potencial teratogênico do composto orgânico de telúrio, o ditelureto de difenila, quando administrado de forma s.c., em dias específicos da gestação de ratas Wistar.

As injúrias ao conceito durante a vida embriônica, o período de formação dos órgãos, resultam em malformações desses órgãos. As injúrias que se procederem durante a vida fetal, quando os órgãos estão formados, resultam em anomalias de crescimento. Então, as anormalidades morfológicas presentes nas malformações congênitas são determinadas pelo tipo e pela quantidade do agente indutor da injúria, e pelo momento particular em que a injúria ao embrião ou ao feto é realizada (Murphy, 1965).

A dose escolhida para ser administrada neste trabalho foi 1/3 da DL₅₀ (Meotti et al., 2003), por se tratar de uma dose considerada segura para a administração, já que dificilmente causaria a morte dos animais. Não houve, portanto, mortalidade entre as fêmeas prenhas.

No entanto, essa dose de ditelureto de difenila causou inúmeras malformações nos fetos que receberam esse composto nos dias 10 e 17 da prenhez. Os efeitos teratogênicos/fetotóxicos se manifestaram pela presença de malformações nos membros inferiores e superiores, ausência de cauda ou cauda reduzida, coágulos sanguíneos subcutâneos, exoftalmia, hidrocefalia, cérebro exposto e edema. Além disso, houve um índice de mortalidade fetal de 73% e 94% nos animais tratados nos dias 10 e 17 da gestação, respectivamente. Isso sugere que as alterações causadas pelo ditelureto de difenila, ou seja, as malformações (principalmente decorrentes da administração no dia 10 da gestação), o edema (conseqüência da administração no dia 17) e a hidrocefalia (conseqüência das administrações nos dias 10 e 17), foram incompatíveis com a vida.

Nos fetos tratados no dia 10 de vida intra-uterina, observou-se uma redução no tamanho do corpo, do cérebro, e no comprimento dos rins. Esse retardo generalizado no crescimento foi responsável, também, pela viabilidade comprometida dos fetos.

O edema, primariamente localizado na região do pescoço, sob a pele, em alguns casos afetou o corpo inteiro do feto. Esse edema alterou a aparência externa, muitas vezes sugerindo redução do tamanho dos membros. A localização preferencial do edema na região do pescoço faz com que os fetos tenham um aumento anormal de peso. Segundo Perez-D'Gregorio and Miller (1988), a medida externa dessa região pode ser usada como um indicador do nível de edema produzido.

O peso corporal é um parâmetro comumente usado para quantificar as alterações no crescimento. Mas, nesse estudo em particular, onde casos com edema estão presentes, o aumento do peso foi determinado como sendo um acúmulo anormal de fluido. Conseqüentemente, o peso corporal, neste caso, não é um indicador confiável de alteração no crescimento, pois pode esconder uma alteração importante. Por isso, a utilização de medidas externas da dimensão corporal é um parâmetro mais apropriado para se avaliar o desenvolvimento.

As ratas prenhas demonstraram uma perda de peso logo após a administração do composto. Mas é interessante salientar que essas fêmeas não apresentaram nenhum parâmetro alterado no dia do sacrifício.

Então, como já havia sido descrito, o telúrio tem a capacidade de atravessar a barreira placentária e afetar os fetos em desenvolvimento (Duckett & Ellem, 1971). Com o ditelureto de difenila pode acontecer da mesma forma. A transferência de substâncias químicas pela placenta depende das características das drogas (tais como solubilidade, estado de ionização e peso molecular) e das propriedades da placenta (fluxo sanguíneo materno e fetal, metabolismo de drogas e idade da placenta). Existem evidências que moléculas químicas com peso molecular menor que 600 podem migrar através da placenta rapidamente (Mirkin, 1973). Considerando as características químicas do ditelureto de difenila, tais como solubilidade lipídica e peso molecular (PM 409), pode-se sugerir que esse composto pode induzir anormalidades fetais por atravessar a barreira placentária.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que os dois últimos períodos fetais de desenvolvimento são os períodos críticos para a indução das alterações congênitas, evidenciadas pelas anomalias causadas pelo ditelureto de difenila.

Quando se avalia a toxicidade reprodutiva em ratos machos, nas mesmas doses utilizadas no estudo com as fêmeas, observa-se que o ditelureto de difenila não tem efeito nocivo sobre esses animais. O mesmo acontece com o disseleneto de difenila.

Após a administração aguda desses compostos organocalcogênicos, nas doses equivalentes a 1/3 das respectivas DL_{50} , o comportamento sexual e a performance reprodutiva dos animais permaneceram inalterados. Além disso, a aparência externa e interna do tecido testicular dos animais tratados não foi afetada depois do tratamento.

Apesar dos animais perderem peso logo após a administração do composto, evidenciando sinais clínicos de toxicidade geral, no final do experimento as condições vitais aparentes estavam normais. A mortalidade não foi observada em nenhum dos grupos

experimentais. É descrito na literatura que compostos de selênio e telúrio afetam o ganho de peso corporal em animais (Tinggi, 2003).

A falta de efeito tóxico dos organocalcogênios sobre o sistema reprodutivo se confirma com as dosagens bioquímicas, que permaneceram inalteradas. Esses dados estão de acordo com estudos preliminares do nosso grupo, onde o ditelureto de difenila e o disseleneto de difenila foram administrados, de forma aguda, nas doses equivalentes a 1/3 LD₅₀, e não alteraram as atividades séricas das enzimas alanina e aspartato aminotransferases, tampouco alteraram os níveis séricos de uréia e creatinina (Meotti et al., 2003), o que sugere a ausência de toxicidade renal ou hepática.

Foi observada uma diminuição no conteúdo de glicogênio testicular nos animais tratados com disseleneto de difenila. Níveis reduzidos de glicogênio podem revelar alguma interferência no metabolismo da glicose. Além disso, a ausência de carboidratos suprime a função das células de Leydig (Dixit and Joshi, 1987; Bedwal et al., 1994). Essas células produzem o hormônio testosterona, essencial para o crescimento e divisão das células germinativas. No entanto, a administração do disseleneto de difenila não causou nenhum prejuízo para o acasalamento ou para a performance reprodutiva dos animais testados, nem alteração nos outros parâmetros bioquímicos estudados. Isso indica que este composto, apesar de causar uma diminuição nos níveis de glicogênio, não causa toxicidade reprodutiva em ratos Wistar machos.

Para se avaliar com maior segurança se um composto químico causa algum tipo de efeito tóxico sobre um organismo ou um órgão, é preciso que se façam vários testes. Esses testes incluem avaliações comportamentais, como por exemplo os índices de acasalamento, testes de fertilidade, como por exemplo a performance reprodutiva, testes bioquímicos e testes histológicos. A histopatologia é um aparato de grande sensibilidade para a detecção das alterações causadas por agentes químicos. Esses tóxicos podem agir nos primeiros estágios da espermatogênese, atingindo as células primárias, as espermatogônias, ou atuar sobre outras células da diferenciação, que podem ser afetadas ou depletadas. A visualização dessas alterações só é possível através de lâminas histológicas (Mangelsdorf et al., 2003).

Neste estudo, a avaliação histológica não revelou modificações na arquitetura morfológica dos testículos dos animais tratados com os organocalcogênios. Os túbulos seminíferos mostraram os estágios sucessivos da transformação de espermatogônias em espermatozóides, sendo que os lúmens desses túbulos se encontraram repletos de gametas masculinos.

Por fim, baseado nos resultados deste estudo, não foi observada toxicidade reprodutiva seguida da administração de ditelureto de difenila ou disseleneto de difenila em ratos Wistar machos, quando submetidos ao protocolo experimental utilizado.

Sendo assim, é importante salientar as diferenças existentes entre os organismos adulto e fetal quanto à suscetibilidade a agentes químicos. Fica evidente que o organismo fetal é extremamente sensível à ação do ditelureto de difenila, mesmo em doses baixas. Já o organismo adulto parece ser mais resistente à ação dos organocalcogênios. Fica evidente, ainda, que a gestação é um período onde se deve ter o máximo de cuidado para proteger o feto de possíveis agentes teratogênicos.

IV. CONCLUSÕES

IV. CONCLUSÕES

→ O composto orgânico de telúrio, ditelureto de difenila, possui potencial teratogênico, já que a administração subcutânea desse composto induziu ao aparecimento de fetos de rato com malformações em diversas partes do corpo, em especial no sistema nervoso central.

→ Os períodos-alvo de indução das malformações fetais, pelo ditelureto de difenila, foram o segundo e o terceiro estágios gestacionais em ratas Wistar, representados pela administração do composto nos dias 10 e 17 do período de prenhez, respectivamente. No primeiro estágio, representado pela administração no dia 6 da gestação, o ditelureto de difenila não demonstrou efeito tóxico.

→ Foram identificadas alterações histológicas significativas nos tecidos fetais, quando o ditelureto de difenila foi administrado nos dias 10 e 17 da gestação de ratas Wistar. Esses resultados demonstram que o composto foi capaz de interferir no desenvolvimento normal dos tecidos fetais *in utero*.

→ Os compostos organocalcogênicos testados, ditelureto de difenila e disseleneto de difenila, não alteraram os índices de acasalamento e performance reprodutiva em ratos machos Wistar, demonstrando que esses compostos não afetam o comportamento sexual dos animais testados.

→ Exceto por uma diminuição no conteúdo de glicogênio testicular dos animais tratados com disseleneto de difenila, os compostos organocalcogênicos testados não alteraram os parâmetros bioquímicos estudados, em testículos de ratos Wistar, demonstrando que não são compostos tóxicos para esse tecido, no modelo experimental estudado.

→ Não foram identificadas alterações histológicas no tecido testicular de ratos Wistar, demonstrando que os compostos testados, ditelureto de difenila e disseleneto de difenila, não induzem toxicidade nesse nível.

V. PERSPECTIVAS

V. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, faz-se necessário uma pesquisa mais intensa sobre o assunto. Estudos que visam entender o mecanismo pelo qual o ditelureto de difenila induz das alterações e a identificação desse composto nos tecidos fetais são válidos. Estão sendo realizados trabalhos no nosso laboratório que avaliam a toxicidade desenvolvimental do disseleneto de difenila, mas os resultados ainda não são conclusivos. Ainda, seria interessante testar esses mesmos compostos em outros dias da gestação, para que se pudesse mapear melhor os efeitos dos organocalcogênios durante todo o período gestacional. Outro trabalho a ser investigado inclui protocolos de administração crônica. As possibilidades são inúmeras, já que este é o primeiro trabalho que testa a toxicidade desenvolvimental do composto orgânico de telúrio, ditelureto de difenila. Pode-se fazer também um estudo de comparação do efeito entre espécies animais, e então se trabalhar também com camundongos.

Em relação ao estudo com os machos, as possibilidades também são numerosas. Pode-se testar os compostos organocalcogênios em camundongos, para se fazer um estudo comparativo entre as espécies. Pode-se também fazer um estudo da possível toxicidade sobre uma segunda geração de animais. Pode-se ainda testar as funções das glândulas sexuais acessórias, para ver se os compostos teriam algum efeito sobre elas.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNEW, W.F., FAUVRE, F.M., PUDENZ, P.H. Tellurium hydrocephalus: Distribution of tellurium-127m between maternal, fetal and neonatal tissues of the rat. **Exp. Neurol.** v. 21, p. 120-131, 1968.

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

AHOTUPA M. & HUHTANIEMI, I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally criptorchid rat testis. **Biol. Reprod.** v. 46, p. 1114-8, 1992.

ALFORD, C.A., PASS, R.F., STAGNO, S. Chronic congenital infections: common environmental causes for severe and subtle birth defects. **Birth Defects** v. 9, p. 87-96, 1983.

ALKALAY, A.L., POMERANCE, J.J., RIMOIN, D.L. Fetal varicella syndrome. **J Pediatr** v. 111, p. 320-323, 1987.

ANDERSSON, C.-M., HALLBERG, A., BRATTSAND, R., COTGRAVE, I.A, ENGMAN, L., PERSSON, J. Glutathione Peroxidase-Like activity of diaryl tellurides. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 3, p. 2553-2558, 1993.

ANDERSSON, C.-M., BRATTSAND, R., HALLBERG, A. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. **Free Radical Res.** v. 20, p. 401-410, 1994.

ARVIN, A.M. & MALDONADO, Y.A. Other viral infections of the fetus and newborn. In: Remington, J.S., Klein, J.O., editors. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** Philadelphia, PA: Saunders, p. 745-756, 1995.

BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M. C.; BRAGA, A. L. Effect of inorganic forms of selenium on delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 149, p. 243-253, 1998.

BARKELEY, M.S. & GOLDMASS, B.D. A quantitative study of sperm testosterone. Sex accessory organ growth and the development of inter male aggression in the mouse. **Horm. Behav.** v. 8, p. 208-218, 1977.

BECHARA, E.J.H., MEDEIROS, M.H.G., MONTEIRO, H.P., HERMES-LIMA PEREIRA, M., DEMASI, B., COSTA, M., ABDALL, D.S.P., ONUKI, J., WENDEL, C.M.A., MASCI, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and in born porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quimica Nova** v. 16, p. 385-392, 1993.

BEDWALL, R. S.; NAIR, N.; SHARMA, M. P.; MATHUR, R. S. Selenium its biological perspectives. **Med. Perspect.** v. 41, p. 150-159, 1993.

BEDWAL, R.S., EDWARDS, M.S., KATOSH, M., BABUGUNA, A., DEWAN, R. Histological and biochemical changes in testes of Zinc deficient Bal B/C strain mice. **Indian J. Exp. Biol.** v. 32, p. 243-247, 1994.

BEHNE, D. & KYRIAKOPOULOS, A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochem. Biophys. Res. Co.** v. 173, p. 1143-1149, 1990.

BEHNE, D., WEILER, H., KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **J. Reprod. Fertil.** v. 106, p. 291-297, 1996.

BLAIS, F. X.; ONISCHUK, R. T.; DE MEIO, R. H. Hemolysis by tellurite: I: The tellurite test for hemolysis. **J. AOA** p. 73, 1972.

BLINZINGER, K. & HAGER, H. Uber die zellulare Speicherung von Tellur und ihre Beziehung zu den unter dem Lysosomenbegriff zusammengefassten intrazytoplasmatischen Korpern. **Verh. Deut. Ges. Pathol.** v. 49, p. 357-362, 1965.

BOLES, J.O.; LEBIODA, L.; DUNLAP, R.B.; ODUM, J.D. Telluromethionine in structural biochemistry. **SAAS Bull. Biochem. Biotechnol.** v. 8, p. 29-45, 1995.

BOLZAN, R. C.; FOLMER, V.; FARINA, M.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T. Aminolevulinic acid dehydratase inhibition by phenyl selenoacetilene: Effect of reaction with hydrogen peroxide. **Pharmacol. Toxicol.** v. 90, p.214-219, 2002.

BORGES, V.C.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. **Neurochem. Res.** v. 29, p. 1505-1509, 2004.

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

BRAGA, A. L.; ZENI, G.; ANDRADE, L. H.; SILVEIRA, C. C. Stereoconservative formation and reactivity of α -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromovinyllic chalcogens. **Synlett** v. 5, p. 595-596, 1997.

BROWN, D. G.; BURK, R. F.; SEELY, R. J.; KIKER, K. W. Effects of dietary selenium on the gastrointestinal absorption of (^{75}Se)₂ in rat. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** v. 42, p. 588-591, 1972.

BUDISA, N.; STEIPE, B.; DEMANGE, P.; ECKERSKORN, C.; KELLERNMAN, J.; HUBER, R. High level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogues 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.** v. 230, p. 788-796, 1995.

CADENAS, E. & SIES, H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. **Adv. Enzyme Regulation** v. 23, p. 217-237, 1985.

CARLTON, W.W. & KELLY, W.A. Tellurium toxicosis in Pekin ducks. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 2, p. 203-214, 1967.

CARTER, C.O. Incidence and aetiology. In: Norman AP, editor. Congenital Abnormalities in Infancy. Oxford: Blackwell; p. 1– 20, 1963.

CHIA, S.E. Endocrine disruptors and male reproductive function – a short review. **Ind. J. Androl.** v. 23, p. 45-46, 2000.

CLARK, R.L.; ANTONELLO, J.M.; GROSSMAN, S.J.; WISE, L.D.; ANDERSON, C.; BAGDON, W.J.; PRAHALADA, S.; MacDONALD, J.S.; ROBERTSON, R.T. External genitalia abnormalities in male rats exposed in utero to finasteride, a 5α -reductase inhibitor. **Teratology** v. 42, p. 91-100, 1990.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann. Intern. Med.** v. 111, p. 918-931, 1989.

COMASSETO, J. V. Vinylic selenides. **J. Organomet Chem.** v. 253, p. 131-181, 1983.

COMASSETO, J. V.; LO, W. L.; PETRAGNANI, N.; STEFANI, H. A. Vinylic selenides and tellurides – preparations, reactivity and synthetic applications. **Synthesis** p. 373, 1997.

CRAGAN, J.D., ROBERTS, H.E., EDMONDS, L.D., et al. Surveillance for anencephaly and spina bifida and the impact of prenatal diagnosis—United States, 1985–1994. **Morb. Mort. Week Rep.** v. 44, p. 1– 13, 1995.

DEUTICKE, B.; LÜTKEMEIER, P.; POSE, B. Tellurite-induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. **Biochem. Biophys. Acta** v. 1109, p. 97-107, 1992.

DIAZ, J. P.; NAVARRO, M.; LOPEZ, H.; LOPEZ, M. C. Determination of selenium levels in dairy products and drinks by hydride generation atomic absorption spectrometry: correlation with daily dietary intake. **Food Addit Contam.** v. 14, p. 109-114, 1997.

DIXIT, V.P., JOSHI, S. Effect of chronic administration of garlic (*Allium salivum* Linn.) on testicular function. **Indian J. Exp. Biol** v. 20, p. 534-536, 1987.

DOMINGO J.L. Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review. **J. Toxicol. Environ. Health** v. 42, p. 123–41, 1994.

DUCKETT, S. & ELLEM, K.A.O. The location of tellurium in fetal tissues, particularly the brain. **Exp. Neurol.** v. 32, p. 49-71, 1971.

DUCKETT, S. The morphology of tellurium-induced hydrocephalus. **Exp. Neural.** v. 31, p. 1-16, 1971a.

DUCKETT, S. & SCOTT, T. The target period during fetal life for the production of tellurium hydrocephalus. **Experientia** v. 27, p. 1064-1065, 1971.

DUCKETT, S. Teratogenesis caused by tellurium. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 192, p. 220-226, 1972.

DUCKETT, S. & WHITE, R. Cerebral lipofuscinosis induced with tellurium: electron dispersive x-ray spectrophotometry analysis. **Brain Res.** v. 73, p. 205-214, 1974.

DUCKETT, S., SAID, G., STRELETZ, L.G., WHITE, R.G., GALLE, P. Tellurium-induced neuropathy. Correlative physiological, morphological and electron microprobe studies. **Neuropath. Appl. Neuro.** v. 5, p. 265-278, 1979.

ENGMAN, L.; STERN, D.; COTGREAVE; I. A.; ANDERSSON, C. M. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ^1H NMR method. **J. Am. Chem. Soc.** v. 114, p. 9737-9743, 1992.

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

EHLERS, K., STÜRJE, H., MERKER, H.J. Valproic acid-induced spina bifida: a mouse model. **Teratology** v. 45, p. 145-154, 1992.

FAIRHILL, L.T. Tellurium. In: **Industrial Toxicology**, pp. 120. Hafner Publishing Co, New York & London, 1969.

FARINA, M.; FOLMER, V.; BOLZAN, R.; ANDRADE, L. H.; ZENI, G. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicol. Lett.** v. 119, p. 27-37, 2001.

FAWCETT, D.W., editor. Bloom and Fawcett: **A textbook of histology**, Philadelphia: W.B. Saunders; p. 796-850, 1986.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.** v. 4, p. 2587-2597, 1990.

FRANKE, K. W. A new toxicant occurring naturally in certain samples of plants foodstuffs. I. Results obtained in preliminary feeding trials. **J. Nutr.** v. 8, p. 597-608, 1934.

FRIES, H. Lithium in pregnancy. **Lancet** 1233, 1970.

GABRYSZUK, M., KLEWIEC, J. Effect of injecting 2- and 3-year-old ewes with selenium and selenium-vitamin E on reproduction and rearing of lambs. **Small Rum. Res.** v. 43, p. 127-132, 2002.

GANTHER, H. E. Selenotrisulfides. Formation by reaction of thiols with selenious acid. **Biochem.** v. 7, p. 2898-2905, 1968.

GERSHON, A.A. Chickenpox, measles, and mumps. In: Remington J.S., Klein J.O., editors. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** Philadelphia, PA: Saunders p. 565–618, 1995.

GIUSTI, R.M., IWAMOTO, K., HATCH, E.E. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Int Med* v. 122, p. 778–788, 1995.

GMELIN, C. H. R. Versuche über die Wirkungem des Baryts, Strontians, u.s.w auf den thierischen organismus. Tübingen 1824, 43. (Cited by Challenger, Frederick: Biological methylation). **Chem. Rev.**, v. 36, p. 315, 1945, 1824.

GOLDSTEIN, L. & MURPHY, D.P. Microcephalic idiocy following radium therapy for uterine cancer during pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.18, p. 89 – 95, 1929.

GUYTON, A.C. Funções reprodutivas e hormonais no homem. In: Tratado de Fisiologia Médica. Ed. Guanabara Koogan, R.J., 8^oEd., 1992.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Met. Enzimol.** v. 186, p. 1-5, 1990.

HARADA M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Crit. Rev. Toxicol.** v. 25, p. 1–24, 1995.

HARRY, G.J., GOODRUM, J.F., BOULDIN, T.W., WAGNER-RECIO, M., TOEWS, A.D., MORELL, P. Tellurium-induced neuropathy: metabolic alterations associated with demyelination and remyelination in rat sciatic nerve. **J. Neurochem.** v. 52, p. 938-945, 1989.

HIGA, K., DAN, K., MANABE, H. Varicella-zoster virus infections during pregnancy: hypothesis concerning the mechanisms of congenital malformations. **Obstet Gynecol** v. 69, p. 214– 222, 1987.

HOFFMAN, J. L. & McCONNELL, K. P. Periodate-oxidized adenosine inhibits the formation of dimethylselenid and trimethylselenium ion in mice treated with selenite. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 254, n. 2, p. 534-540, 1986.

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

IMPERATO-McGINLEY, J.; BINIENDA, Z.; ARTHUR, A.; MININBERG, D.T.; VAUGHAN, E.D.Jr.; QUIMBY, F.W. The development of a male pseudohermaphroditic rat using an inhibitor of the enzyme 5 α -reductase. **Endocrinology** v. 116, p. 807-812, 1985.

IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Rev. Reprod.** v. 1, p. 6–12, 1996.

JANSSEN, A. M.; BOSMAN, C. B.; SIER, C. F.; GRIFFIOEN, G. SODs in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. **Br. J. Cancer** v. 78, p. 1051-1057, 1998.

JONES, M.M., XU, C., LADD, P.A. Selenium suppression of cadmium-induced testicular apoptosis. **Toxicology** v. 116, p. 169-175, 1997.

JOST, A.; VIGER, B., PREPIN, J.; PERCHELLET, J.P. Studies on sex differentiation in mammals. **Recent Prog. Horm. Res.** v. 29, p. 1-41, 1973.

KALTER H. Case reports of malformations associated with maternal diabetes: history and critique. **Clin. Genet.** v. 43, p. 174– 179, 1993.

KALTER, H. Teratology in the 20th century. Environment causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neurotol. Teratol.** v. 25, p. 131-282, 2003.

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

KHAYAT, A. & DENCHER, L. Interactions between tellurium and mercury in murine lung and other organs after metallic mercury inhalation: a comparison with selenium. **Chem. Biol. Interac.** v. 50, p. 123-133, 1984.

KLAYMAN, D. L. & GÜNTHER, W. H. (eds.). Organic selenium compounds: their chemistry and biology. New York: John Wiley and sons p. 68-157, 1973.

KOLLER, L.D., WHITBECK, G.A., SOUTH, P.J. Transplacental transfer and colostrum concentrations of selenium in beef cattle. **Am. J. Vet. Res.** v. 45, p. 2507-2510, 1984.

LADEN, B. & PORTER, T. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds. Evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. **J. Lipid. Res.** v. 42, p. 235-240, 2001.

LAMPERT, P.W. & GARRETT, R.S. Mechanism of demyelination in tellurium neuropathy. Electron microscopic observations. **Lab. Invest.** v. 25, p. 380-388, 1971.

LARNER, A.J. How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis. **Med. Hypothesis** v. 44, p. 295-297, 1995.

LEVY, H.L., GULDBERG, P., GUTTLER, F., et al. Congenital heart disease in maternal phenylketonuria: report from the Maternal PKU Collaborative Study. **Pediatr Res** v. 49, p. 636– 642, 2001.

LEVY, H.L., LENKE, R.R., CROCKER, A.C. Maternal PKU: Proceedings of a Conference. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services; 1982.

LITTLE, J. & ELWOOD, J.M. Epidemiology of neural tube defects. In: Kiely M, editor. **Reproductive and Perinatal Epidemiology**. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 251–336, 1991.

MACIEL, N., BOLZAN, R.C., BRAGA, A.L., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxic.** v. 14, p. 310-319, 2000.

MAHALIK, M.P., HITNER, H.W., PROZIALECK W.C. Teratogenic effects and distribution of cadmium (Cd²⁺) administered via osmotic minipumps to gravid CF-1 mice. **Toxicol. Lett.** v. 76, p. 195-202, 1995.

MANGELSDORF, I., BUSCHMANN, J., ORTHEN, B. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 37, p. 356-369, 2003.

MARTIN, J. L. & GERLACK, M. L. Selenium metabolism in animals. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 192, p. 193-199, 1972.

MELOV, S.; SCHNEIDER, J. A.; DAY, B, J.; HINERFELD, D.; COSKUN, P. A novel serological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Nat. Genet.** v. 18, p. 159-163, 1998.

MEOTTI, F.C., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., 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.

MEOTTI, F.C., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environm. Res.** v. 94, p. 276-282, 2004.

MIRKIN, B.L. Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 14, p. 643-647, 1973.

MIZUNO, R. Electron microscopic study on the cerebral cortex of rabbits intoxicated with tellurium. **Yokohama Med. J.** v. 20, p. 101-121, 1969.

MOREIRA, E.G., VASSILLIEFF, I., VASSILLIEFF, V.S. Developmental lead exposure: bahavioral alterations in the short- and long-term. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 23, p. 489-495, 2001.

MORELL, P., TOEWS, A.D., WAGNER, M., GOODRUM, J.F. Gene expression during tellurium-induced primary demyelination. **Neurotoxicology** v. 15, p. 171-180, 1994.

MORETTO, M.B., ROSSATO, J.I., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into brain synaptosomes is voltage-dependent. **J. Biochem. Mol. Toxic.** v. 17, p. 154-160, 2003.

MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 26, p. 471-483, 2002.

MOZIER, N. M.; McCONNELL, K. P.; HOFFMAN, J. L. S-adenosyl-L-methionine: thioether S-methyltransferase, a new enzyme in sulfur and selenium metabolism. **J. Biol. Chem.** v. 263, p. 4527-4531, 1988.

MÜLLER, R.; ZSCHIESCHE, W.; STEFFEN, H. M.; SCHALLER, K. H. Tellurium intoxication. **Klin. Wochenschr.** v. 67, p. 1152-1155, 1989.

MURPHY, L. In Teratology. Eds. Wilson, J.G. and Warkany, J.; University of Chicago Press, Chicago, 111, 1965.

MURPHY, M., SEAGROATT, V., HEY, K., ET AL. Neural tube defects 1974–94 down but not out. **Arch. Dis. Child.** v. 75, p. 133–4, 1996.

MURPHY, D.P. Outcome of 625 pregnancies in women subjected to pelvic radium or roentgen irradiation. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 18, p. 79–87, 1929.

MYERS, G.J. & DAVIDSON, P.W. Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and behavioral research. **Environ. Health. Perspect.** v. 106, p. 41–47, 1998.

NAU, H., HAUCK, R.S., EHLERS, K. Valproic acid induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug mechanism, pharmacokinetics and possible mechanisms. **Pharmacol. Toxicol.** v. 69, p. 310–321, 1991.

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

NELSON, N., BYERLY, T.C., KOLBYE, A.C. et al. Hazards of mercury: special report to the Secretary's Pesticide Advisory Committee, Department of Health, Education, and Welfare, November 1970. **Environ. Res.** v. 4, p. 1–69, 1971.

NEWMAN, R.A.; OSBORN, S.; SIDDIK, Z.H. Determination of tellurium in biological fluids by means of electrothermal vapourization-inductively coupled to plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS). **Clin. Chim. Acta** v. 179, p. 191-196, 1989.

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

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

NOGUEIRA, C.W., QUINHONES, E.B., JUNG., E.A.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm. Res.** v. 52, p. 56-63, 2003a.

NOGUEIRA, C.W., MEOTTI, F.C., CURTE, E., PILLISSÃO, C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Investigations into potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology** v. 83, p. 29-37, 2003b.

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

NYSKA, A., WANER, T., PIRAK, M., ALBECK, M., SREDNI, B. Toxicity study in rats of a tellurium based immunomodulating drug, AS-101: a potencial drug for AIDS and cancer patients. **Arch. Toxicol.** v. 63, p. 386-393, 1989.

OAKLEY, G.P., ERICKSON, J.D., JAMES, L.M., et al. Prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. In: Bock G, Marsh J, editors. **Neural Tube Defects**. Chichester: Wiley. p. 212–31, 1994.

PAINTER, E. P. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. **Chem. Rev.** v. 28, p. 179-213, 1941.

PARKES, T. L.; ELIA, A. J.; DICKINSON, D.; HILLIKER, A. J. Extension of *Drosophila* lifespan and by overexpression of human SOD1 in motorneurons. **Nat. Genet.** v. 19, p. 171-174, 1998.

PARNHAM, M. J. & GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog. Drug Res.** v. 36, p. 10-47, 1991.

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

PENTSCHEW, A.; EBNER, F.; KOVATCH, R. In: Proceedings of Fourth International Congress of Neuropathology. H. Jacobs, Ed. 3:300. George Thieme Verlag. Stuttgart, Germany, 1962.

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

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

PETRAGNANI, N. In *comprehensive Organometallic Chemistry II* (Ed. A. Mckillop), vol. LI, Pergamon Press, Exeter, UK, 1995.

PLATT, L.D., KOCH, R., HANLEY, W.B., et al. The international study of pregnancy outcome in women with maternal phenylketonuria: report of a 12-year study. **Am J Obstet Gynecol** v. 182, p. 326– 333, 2000.

PRATICÒ, D. & DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **Physiology in Medicine** v. 109, p. 577-585, 2000.

RAMADAN, S.E.; RAZAK, A.M.; RAGAB, A.M.; el-MELEIGY, M. Incorporation of tellurium into amino acids and proteins in a tellurium-tolerant fungi. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 20, p. 225-232, 1989.

RAWLINS, F.A. & SMITH, M.E. Myelin synthesis in vitro: a comparative study of central and peripheral nervous tissue. **J. Neurochem.** v. 18, p. 1861-1870, 1971.

REMINGTON JS, MCLEOD R, DESMONTS G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. Philadelphia, PA: Saunders; p. 140– 267, 1995.

ROUSE B, LOCKHART L, MATALON R, et al. Maternal phenylketonuria pregnancy outcome: preliminary report of facial dysmorphism and major malformations. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 13, p. 289–291, 1990.

ROUSE, B., MATALON, R., KOCH, R., et al. Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly, and developmental outcomes. **J. Pediatr.** v. 136, p. 57– 61, 2000.

SASSA, S., FUJITA, H., KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: Kotik, A., Skoda, J., Paces, V., Kostka, V. (Eds.), *Highlights of modern biochemistry*, vol. 1., V.S.P., Utrecht, pp. 329-338, 1989.

SCANSETTI, G. Exposure to metals that have recently come into use. **Science Total Environ.** v. 120, p. 85-91, 1992.

SCHÜLER, L., PASTUSZAK, A., SANSEVERINO, M.T.V., ORIOLI, I.M., BRUNONI, D., ASHTON-PROLLA, P., COSTA, F.S., GIUGLIANI, R., COUTO, A.M., BRANDAO, S.B,

KOREN, G. Pregnancy outcome after exposure to misoprostol in Brazil: a prospective, controlled study. **Reprod. Toxicol.** v. 13, p. 147-151, 1999.

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

SCHWARZ, K. A. A possible site of action for vitamin E in intermediary metabolism. **Amer. J. Clin. Nutr.** v. 9, p. 71, 1961.

SHEMIN, D. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function and mechanism. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** v. 273B, p. 109-115, 1976.

SIDDIK, Z.H.; NEWMAN, R.A. Use of platinum as a modifier in the sensitive detection of tellurium in biological samples. **Anal. Biochem.** v. 172, p. 190-196, 1988.

SILVERMAN, J.A., WINTERS, R.W., STRANDE, C. Lithium carbonate therapy during pregnancy: apparent lack of effect upon the fetus. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 109, p. 934-936, 1971.

SMITHELLS, R.W. NEWMAN CGH. Recognition of thalidomide defects. **J. Med. Genet.** v. 29, p. 716-723, 1992.

SOPRANO, D.R., SOPRANO, K.J. Retinoids as teratogens. **Annu. Rev. Nutr.** v. 15, p. 111-132, 1995.

SPALLHOLZ, J. E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Rad. Biol. Med.** v. 20, p. 131-143, 1993.

SPENCER, J.R.; TORRADO, T.; SANCHEZ, R.S.; VAUGHAN, E.D.Jr.; IMPERATO-McGINLEY, J. Effects of flutamine and finasteride on rat testicular descent. **Endocrinology** v. 129, p. 741-748, 1991.

SREDNI, B.; CASPI, R.R.; KLEIN, A.; KALECHMAN, Y.; DANZIGER, Y.; BEN YA'AKOV, M.; TAMARI, T.; SHALIT, F.; ALBECK, M. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. **Nature** v. 330, p. 173-176, 1987.

SREDNI, B.; CASPI, R.R.; LUSTIG, S.; KLEIN, A.; KALECHMAN, Y.; DANZIGER, Y.; BEN YA'AKOV, M.; TAMARI, T.; SHALIT, F.; ALBECK, M. The biological activity and

immunotherapeutic properties of AS-101, a synthetic organotellurium compound. **Nat. Immun. Cell Grow.** v. 7, p. 163-168, 1988.

STAGNO, S. Cytomegalovirus. In: Remington, J.S., Klein, J.O., editors. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** Philadelphia, PA: Saunders; p. 312– 53, 1995.

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

STEWART, N. G. & CROOKS, R. N. Long-range travel of the radioactive cloud from the accident at Windscale. **Nature** v. 182, p. 627-628, 1958.

SUN, X.; WONG, J. R.; SONG, K. & CHEN, L. B. Anticarcinoma activity of a novel drug, 3-ethyl-3'-methyl-thiatelluracarbo-cyanine iodite (Te) a tellurium-containing cyanine targeted at mitochondria. **Clin. Canc. Res.** v. 2, p. 1335-1340, 1996.

SWAN, C. & TOSTEVIN, A.L. Congenital abnormalities in infants following infectious diseases during pregnancy, with special reference to rubella: a third series of cases. **Med. J. Aust.** v. 1, p. 645–659, 1946.

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

TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. **Toxicol. Lett.** v. 137, p. 103-110, 2003.

TREVISAN, M., SAVEGNAGO, L., ALVES, D., ZENI, G., ROCHA, J. B. T., NOGUEIRA, C.W. Antisecretory and Antiulcer Effects of Diphenyl Diselenide. **Inflamm. Res.** *in press*, 2004.

TSEN, C. C. & COLLIER, H. B. Selenite as a relatively weak inhibitor of some sulphhydryl enzyme systems. **Nature** v. 183, p. 1327, 1959.

TSEN, C. C. & TAPPEL, A. L. Catalytic oxidation of glutathione and other sulphhydryl compounds biselenite. **J. Biol. Chem.** v. 233, p. 1230-1232, 1958.

URSINI, F. & BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chem. Phys. Lipids.** v. 44, p. 255-276, 1987.

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

U.S. Bureau of Mines, 1985. Mineral Year Book. U.S. Government Printing Office, Vol. I, pp. 1018-1021. Washington D.C., 1985.

VALENTINE, J. L.; KANG, H. K.; SPIVEY, G. H. Selenium levels in human blood, urine and hair in response to exposure via drinking water. **Environ. Res.** v. 17, p. 347-355, 1978.

VAN VLEET, J. F. V. & FERRANS, V. J. Ultrastructural alterations in skeletal muscle of ducklings fed selenium-vitamin E-deficient diet. **Am. J. Vet. Res.** v. 38, p. 1399-1405, 1982.

WAGNER-RECIO, M., TOEWS, A.D., MORELL, P. Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: Preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. **J. Neurochem.** v. 57, p. 1891-1901, 1994.

WARKANY, J. Etiology of congenital malformations. **Adv Pediatr** v. 2, p. 1–63, 1947.

WARKANY, J., LEMIRE, R.J., COHEN, M.M. Mental Retardation and Congenital Malformations of the Central Nervous System. Chicago, IL: Year Book Medical; 1981.

WHANGER, P. D.; PEDERSEN, N. D.; HATFIELD, J.; WESWING, P. H. Absorption of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 153, p. 295-297, 1976.

WILBER, C. G. Toxicology of selenium: a review. **Clinical Toxicology** v. 17, n. 2, p. 171-230, 1980.

WILEY, J., editor. **International Dictionary of Medicine and Biology**, New York, 1986.

WILSON J.G. & WARKANY J., editors. Teratology: Principles and Techniques. Chicago, IL: University of Chicago; 1965.

WINGLER, K., BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. **Biofactors** v. 10, p. 245-249, 1999.

XU B., CHIA S.E., TSAKOK M., ONG CHN. Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. **Reprod. Toxicol.** v. 7, p. 613–8, 1993.

YU, L.; HE, K.; CHAI, D.; YANG, C.; ZHENG, O. Evidence for telluroamino acid in biological materials and some rules for assimilation of inorganic tellurium by yeast. **Anal. Biochem.** v. 209, p. 318-322, 1993.

YOUNG, V. R.; NAHAPETIAU, A.; JONGHORBONI, M. Selenium bioavailability with reference to human nutrition. **American J. Clin. Nutrion** v. 35, p. 1076-1088, 1981.

ZENI, G., BRAGA, A. L., STEFANI, H. A. Palladium-catalyzed coupling of sp(2)-hybridized tellurides. **Accounts Chem. Res.** v. 10, p. 731-738, 2003.