



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

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE
ORGANOCALCOGÊNIOS EM ERITRÓCITOS
HUMANOS**

Tese de Doutorado

Viviane Patrícia Pires Schiar

Santa Maria, RS, Brasil

2009

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE ORGANOCALCOGÊNIOS EM ERITRÓCITOS HUMANOS

por

Viviane Patrícia Pires Schiar

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

Orientador: Gilson Zeni
Co-orientador: João Batista Teixeira da Rocha

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado.

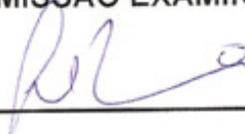
**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE ORGANOCALCOGÊNIOS
EM ERITRÓCITOS HUMANOS**

Elaborada por

Viviane Patrícia Pires Schiar

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

COMISSÃO EXAMINADORA

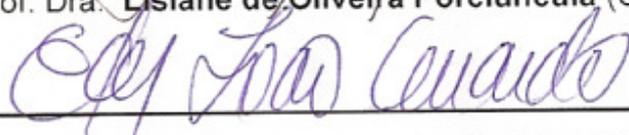


Prof. Dr. **Gilson Zeni** (UFSM)

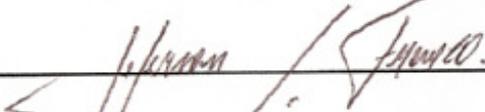
Presidente/Orientador



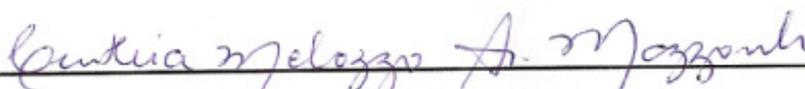
Prof. Dra. **Lisiane de Oliveira Porciúncula** (UFRGS)



Prof. Dr. **Éder João Lenardão** (UFPEL)



Prof. Dr. **Jeferson Luis Franco** (UFSM)



Prof. Dra. **Cinthia Melazzo Andrade Mazzanti** (UFSM)

Santa Maria, 18 de Julho de 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que está sempre presente em minha vida, por me proporcionar oportunidades e me fazer confiante o suficiente para desafiá-las.

Ao Prof. Gilson, meu orientador, pelo apoio, pelo incentivo e pela oportunidade, obrigada.

Ao Prof. João Batista, meu co-orientador, obrigado pela amizade, ensinamentos e pelas oportunidades que me proporcionaste. Sou muito grata por tudo o que fizeste por mim.

À professora Cristina pelo apoio e colaboração com o trabalho realizado.

À minha família que esta sempre ao meu lado.

Ao Sandro, meu marido, pelo carinho, paciência, incentivo e colaboração, e a nossa filha Laura, que é um presente que Deus nos deu.

A Danúbia que mais do que meu braço direito tornou-se uma grande amiga.

Aos amigos da química que forneceram os compostos químicos para o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus colegas e amigos do Banco de Sangue que me ajudaram com a coleta das amostras utilizadas: Olinto, Carmen, Sandra, Janete e Ivanir, obrigada.

A Marinei e aos demais amigos, pela convivência, pelas contribuições, pelo apoio, sobretudo pela amizade.

Ao curso, aos professores, a funcionária Angélica, a CAPES, a FAPERGS e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores da banca, pela disponibilidade e por aceitarem o convite para fazer a leitura desta tese e compor sua banca examinadora.

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

"A MENTE QUE SE ABRE A UMA NOVA IDÉIA JAMAIS
VOLTARÁ AO SEU TAMANHO ORIGINAL."

(Albert Einstein)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE ORGANOCALCOGÊNIOS EM ERITRÓCITOS HUMANOS

AUTORA: VIVIANE PATRÍCIA PIRES SCHIAR
ORIENTADOR: GILSON ZENI
CO-ORIENTADOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de Julho de 2009.

Nos últimos anos, os compostos organocalcogênios têm sido alvos de interesse em síntese orgânica em virtude da descoberta de suas aplicações industriais e de suas propriedades farmacológicas. No entanto, dados da literatura têm demonstrado que estes compostos apresentam atividade pró-oxidante ocasionando danos teciduais e inibição da atividade de enzimas. Sabe-se que o estresse oxidativo pode causar alterações em proteínas da membrana de eritrócitos, logo estas células representam um bom modelo para investigar danos induzidos por agentes oxidantes. Desta forma, no presente trabalho investigou-se a toxicidade de uma variedade de calcogênios sobre eritrócitos *in vitro* nas concentrações de 10, 40, 100 e 200 μM . Os resultados deste trabalho mostraram que para um hematócrito de 45% apenas os compostos de organotelúrio foram tóxicos causando hemólise e estes efeitos não foram correlacionados com a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, sugerindo deste modo não haver relação com a peroxidação lipídica. No entanto, utilizou-se um hematócrito de 1% e os compostos de organoselênio e organotelúrio testados apresentaram toxicidade causando hemólise. Esta hemólise foi relacionada com a oxidação da glutathiona intracelular (GSH) e uma possível produção de radicais livres. Portanto, os resultados apresentados nesta tese sugerem que os compostos orgânicos contendo selênio ou telúrio apresentaram toxicidade para os eritrócitos.

Palavras-chave: organocalcogênios, organoselênio, organotelúrio, eritrócitos, hemólise, peroxidação lipídica, GSH, oxidação.

ABSTRACT

Thesis of Doctors's Degree
Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF ORGANOCHALCOGENS IN HUMAN ERYTHROCYTES

AUTHOR: VIVIANE PATRÍCIA PIRES SCHIAR
ADVISOR: GILSON ZENI
CO-ADVISOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
Place and Date of the Defense: Santa Maria, July 18, 2009.

The interest in organochalcogen chemistry, biochemistry and pharmacology has increased in the last two decades mainly due to the fact that a variety of organochalcogen compounds possess biological activity and due the use of these compounds in industrial applications. However, literature data showed that these compounds present pro-oxidant properties, causing tissue damage and inhibition a variety of enzymes. Oxidative stress can induce complex alterations of membrane proteins in erythrocytes. Erythrocytes represent a good model to investigate the damage induced by oxidizing agents. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the toxicity induced by a variety of chalcogens at concentrations of 10, 40, 100 e 200 μM using erythrocytes *in vitro*. The present results showed that organotellurium compounds were toxic to erythrocytes for a hematocrit of 45%. The hemolytic effect of tellurides was not positively correlated with thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) production suggesting that lipid peroxidation is not involved in the hemolysis provoked by organotellurium compounds. However, for a hematocrit of 1% the organoselenium and organotellurium compounds increased the hemolysis rate and these results suggest a relationship between the oxidation of intracellular glutathione (GSH) and subsequent generation of free radicals with the hemolysis by chalcogen compounds. Therefore, the results presented in this study suggest that organochalcogen compounds presented toxicity for the erythrocytes.

Key words: organochalcogens, organoselenium, organotellurium, erythrocytes, hemolysis, lipid peroxidation, GSH, oxidation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO

Figura 1. Vaso sanguíneo.....	4
Figura 2. Modelo de mosaico bilipídico e fluídico da membrana celular.....	5
Figura 3. Equilíbrio entre geração de ROS e sistemas antioxidantes.....	19

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1

Figura 1. Chemical structure of compounds tested..	24
Figura 2. Effect of organochalcogens on lysis of erythrocytes.....	25
Figura 2. Effect of organochalcogens on TBARS in erythrocytes	26

Artigo 2

Figura 1. The formulas of the investigated compounds.	32
Figura 2. Influence of glucose on the hemolytic effect of chalcogens compounds..	33
Figura 3. Effects of chalcogen compounds (100 μ M) on the rate of DTT oxidation. .	35
Figura 4. Effects of chalcogen compounds (100 μ M) on the rate of CYS oxidation..	35
Figura 5. Redox cycle of selenides (RSe ⁻) generation superoxide.	35

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Valores de referência do eritrograma em adultos.....	6
---	---

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1

Tabela 1. Effect of compounds on hemolysis in human erythrocytes..	26
---	----

Tabela 2. Effect of compounds on lipid peroxidation in human erythrocytes	27
--	----

Tabela 3. Correlation of TBARS/hemolysis.....	27
--	----

Artigo 2

Tabela 1. The erythrocyte haemolysis in different compounds expressed as the time for 50% of maximal haemolysis (HT50 in min).	33
---	----

Tabela 2. Erythrocyte hemolysis caused by Se and Te compounds after 6 h of the incubation.	33
---	----

Tabela 3. Influence of GSH on the hemolytic effect of chalcogen compounds.	34
---	----

Tabela 4. Influence of glucose on the hemolytic effect of chalcogen compounds.....	34
---	----

Tabela 5. Chalcogen-induced DTT and cysteine oxidation.....	34
--	----

LISTA DE ESQUEMAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO

Esquema 1. Estados redox do selênio.....	7
Esquema 2. Metabolismo de selênio em animais.....	9
Esquema 3. Redução de hidroperóxidos pela GSH-Px.....	10
Esquema 4. Produção de superóxido pela redução do selenito com tióis.....	11
Esquema 5. Reação colorimétrica do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído....	18
Esquema 6. Remoção de peróxidos pela ação catalítica da GPx.....	18
Esquema 7. Via oxidativa da pentose fosfato.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina-5'-trifosfato
CAT	Catalase
CYS	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona
GSSG	Glutathiona oxidada
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
HO [•]	Radicais hidroxila
HepG2	Células de hepatoma humano
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
γGluCys	γ-L-glutamil-L-cisteína
δ-ALA-D	Delta aminolevulinato desidratase

SUMÁRIO

<i>Agradecimentos</i>	<i>iv</i>
<i>Resumo</i>	<i>vii</i>
<i>Abstract</i>	<i>viii</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>ix</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>x</i>
<i>Lista de Esquemas</i>	<i>xi</i>
<i>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos</i>	<i>xii</i>
<i>Apresentação</i>	<i>xv</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Características gerais do sangue</i>	3
2.1.1. Eritrócito	4
2.1.2. Hemólise	6
2.2. <i>Selênio</i>	7
2.2.1. Aspectos Gerais	7
2.2.1. Metabolismo e Atividade Metabólica	8
2.2.3. Toxicidade	10
2.3. <i>Telúrio</i>	12
2.3.1. Aspectos Gerais	12
2.3.2. Toxicidade	12
2.4. <i>Organocalcogênios</i>	13
2.4.1. Compostos orgânicos de Se: Propriedades Farmacológicas e Toxicológicas.....	13
2.4.2. Compostos orgânicos de Te: Propriedades Farmacológicas e Toxicológicas.....	15
2.5. <i>Glutathione</i>	16
2.6. <i>Danos Oxidativos</i>	17
3. OBJETIVOS	20
3.1. <i>Objetivo geral</i>	20
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	20

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS	21
4.1. <i>Artigos científicos: Capítulo 1</i>	22
4.1.1. Artigo 1.....	22
4.2. <i>Artigos científicos: Capítulo 2</i>	30
4.2.1. Artigo 2.....	30
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES.....	42
7. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO.....	43
8. PERSPECTIVAS.....	44
9. REFERÊNCIAS.....	45

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, está descrita uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta tese.

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos, os quais encontram-se no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS**. Esse item, por sua vez, está subdividido em Capítulo I- artigo 1 e Capítulo II- artigo 2. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES** encontrados no final desta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos para continuação do trabalho aqui descrito.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** citadas ao final da tese referem-se aos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO**.

1. INTRODUÇÃO

O selênio (Se) e o telúrio (Te) pertencem à família dos calcogênios, dessa forma compartilham algumas características químicas. Esses elementos podem ser incorporados a aminoácidos (Ramadan e cols., 1989, Budisa e cols. 1995) e ambos, Se (Painter, 1941) e Te são tóxicos a diferentes espécies de mamíferos (Larner, 1995, Tailor 1996).

Sabe-se que nenhuma função biológica é reconhecida para o Te em células animais (Chasteen e Bentley, 2003) e o mesmo é considerado um elemento dispensável (Kron, 1991). Recentemente, estudos mostraram que compostos orgânicos de Te e Se apresentaram efeito hemolítico e genotóxico em células sangüíneas de humanos (Santos e cols, 2009a). No entanto, foram descritas algumas propriedades farmacológicas para compostos orgânicos de Te, como imunomoduladoras (Nyska e cols., 1989) e propriedades antioxidantes (Engman e cols., 1995, Nogueira e cols., 2004). Além disso, são usados em indústria como estabilizadores de polímeros (Abed-Ali e cols., 1988, Engman e cols., 1996) e em fotografia (Kodak, 1985 e 1989).

O Se é considerado como elemento traço essencial, pois é componente de várias enzimas importantes, tais como as enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (Rotruck e cols., 1973; Ganther, 1999; Rayman, 2000). Há muitos estudos sobre a eficácia de compostos orgânicos de Se como antioxidantes e como agentes antiinflamatórios (Rayman, 2000; Mugeshe e cols., 2001; Klotz e Sies, 2003), mas em altas concentrações compostos de Se de antioxidantes tornam-se pró-oxidantes, com potentes efeitos inibitórios no crescimento celular. Como consequência induzem ao mecanismo conhecido como estresse oxidativo (Spallholz, 1997).

O estresse oxidativo causa modificações importantes a biomoléculas celulares (na membrana, no citoplasma e no núcleo) conduzindo a danos celulares, danos no citoesqueleto ou em tióis de proteína de membrana, alterando a capacidade funcional desses grupos na membrana, pela oxidação ou pelo bloqueio dos tióis, o que resulta em prematura destruição de células vermelhas *in vivo* (Ohmiya e Nakai, 1977; Baumann e cols., 2000). Neste aspecto, verificou-se que o ebselen, um composto orgânico de Se, induziu a apoptose em células de hepatoma

humano (HepG2), e este efeito parece estar relacionado a sua habilidade para depletar tióis (Yang e cols., 2000). Outros estudos sugerem que a diminuição de glutathione (GSH) e o dano oxidativo são eventos que sinalizam morte celular por apoptose (Kane e cols. 1993; Sato e cols., 1995).

As células vermelhas sanguíneas (eritrócitos), devido a sua suscetibilidade à peroxidação, têm sido usadas como um modelo para investigar o dano oxidativo em biomembranas (Zou e cols., 2001; Domanski e cols., 2005). A exposição de eritrócitos aos radicais livres pode conduzir a várias mudanças na membrana, tais como, peroxidação lipídica e oxidação da GSH celular (Rohn e cols., 1993; El-Missiry e Abou-Seif, 2000; Devasena e cols., 2001), mudanças na morfologia celular (Prasanthi e cols., 2005; Sicińska e cols., 2006) e ainda os torna suscetíveis a hemólise (Zavodnik e cols., 2002; Sicińska e cols., 2006). Os eritrócitos são utilizados como modelo para estudar o efeito de substâncias tóxicas, como íons mercúrio (Eisele e cols., 2006), teluretos e compostos orgânicos de Se (Tiano e cols., 2000), assim como o efeito tóxico do inseticida fenvalerate e seu metabólito que causam alterações morfológicas e bioquímicas em eritrócitos de ratos após exposição *in vitro* (Prasanthi e cols., 2005). Além disso, os eritrócitos servem de modelo experimental em situações associadas ao estresse oxidativo, como a adaptação do sistema antioxidante de eritrócitos de ratos treinados e expostos a hipóxia-hipobárica intermitente para duas altitudes (5700 m e 6300m) (Devi e cols., 2005).

Considerando o uso de eritrócitos humanos como modelo para investigar o dano oxidativo e também a necessidade de ampliar os estudos toxicológicos sobre os organocalcogênios, este estudo visa pesquisar a possível hemólise de eritrócitos humanos causada por organocalcogênios. Além disso, devido ao fato dos organocalcogênios serem comumente usados na síntese orgânica, é importante determinar o potencial tóxico dos mesmos para realizar prevenções durante a exposição ocupacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais do sangue

Um ser humano adulto possui cerca de 5 litros de sangue. Este é constituído por plasma e células sanguíneas. O plasma é o componente líquido do sangue, e contém (além de água) proteínas, nutrientes, hormônios, sais minerais e resíduos do metabolismo. As células sanguíneas (eritrócitos ou glóbulos vermelhos, leucócitos ou glóbulos brancos e plaquetas) circulam suspensas no plasma (Silva, 2002) (figura 1).

Os eritrócitos, leucócitos e plaquetas têm sua origem, após o nascimento, na medula de todos os ossos, mas, no adulto, apenas os ossos chatos (esponjosos como esterno, costelas, vértebras), que compreendem o órgão hematopoético (Verrastro e cols., 1996). Os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos B, linfócitos T e monócitos) constituem a primeira linha de defesa do sistema imune. Dessa forma, o sangue circula no corpo inteiro, está em constante estado de renovação, e provê uma barreira protetora entre os ambientes externos e internos (Liew e cols., 2006).

As células do sangue diferem umas das outras nas funções biológicas e nas características metabólicas. Os leucócitos lembram a maioria das células do organismo, já que contêm núcleo, mitocôndrias e ribossomos; em consequência podem sintetizar proteínas e lipídeos. A demanda de energia dos leucócitos é suprida pelo ciclo de Krebs (Burtis e Ashwood, 1998).

As plaquetas são de fundamental importância, pois quando ocorre lesão do endotélio de um vaso sanguíneo, elas são ativadas, aderem ao local da lesão e aglutinam-se umas às outras, promovendo a interrupção da perda sanguínea (processo de hemostasia) e participam ativamente da cascata da coagulação do sangue, liberando várias proteínas e lipoproteínas que ativam determinados fatores da coagulação (Souza e Rêgo, 1996).

Considerando que este estudo foi realizado com eritrócitos serão vistos a seguir alguns tópicos desta célula.

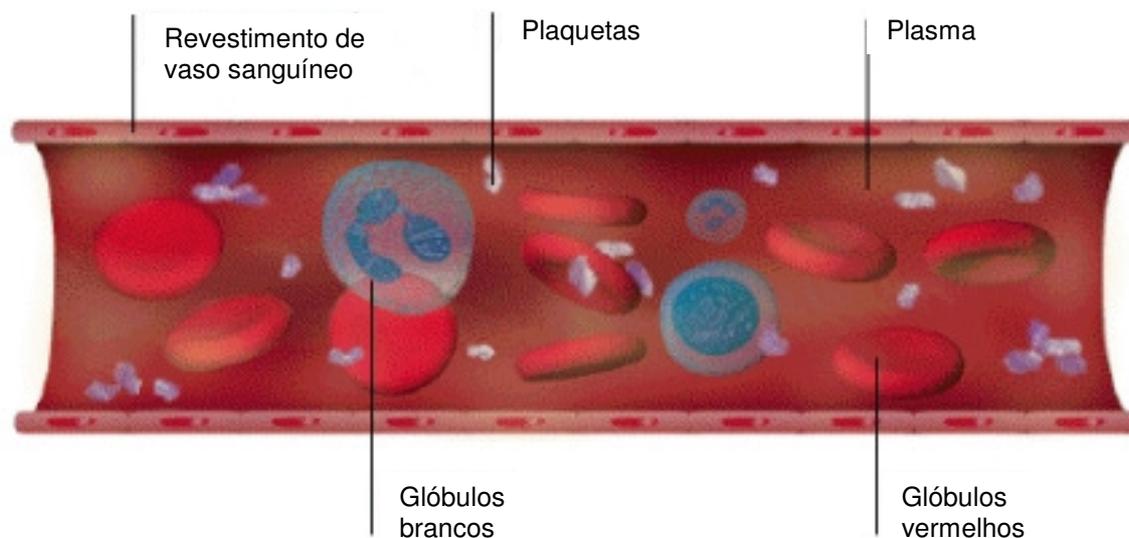


Figura 1: Vaso sanguíneo (cortado ao meio), onde aparecem os elementos figurados (plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos), suspensos sobre o plasma sanguíneo.¹

2.1.1. Eritrócito

O eritrócito é a unidade morfológica da série vermelha do sangue circulante, derivado de células pluripotentes (*stem cell*) na medula óssea por um processo de maturação chamado eritropoiese, os eritrócitos maduros são aproximadamente discos bicôncavos com 7.2 μm de diâmetro, 1.5 a 2.5 μm de espessura, com um volume médio de 90 fL. (Schwabbauer, 1998).

São as células sanguíneas que existem em maior quantidade e para a formação do eritrócito, é necessário ferro, ácido fólico e vitamina B₁₂. Os eritrócitos maduros são desprovidos de núcleo e organelas e são degradados (após cerca de 120 dias) no baço e fígado (Silva, 2002). A maturação dos eritrócitos é estimulada pelo hormônio eritropoietina, secretado pelos rins em resposta à diminuição do fornecimento de O₂². Os eritrócitos maduros não possuem núcleo, mitocôndrias, e ribossomos, são, portanto, incapazes de biossintetizar proteínas e por isso dependem principalmente da glicólise anaeróbica para suprir as suas necessidades energéticas (Burtis e Ashwood, 1998).

¹ Figura disponível em <http://www.webciencia.com/11_20composicao.htm>

² Manual Merck-Biologia do sangue disponível em <http://www.msd-brazil.com/msdbrazil/patients/manual_Merck/mm_sec14_152.html>

A membrana eritrocitária é essencialmente constituída de lipídeos e proteínas (Murador e Deffune, 2007). Esta membrana consiste em uma bicamada fosfolipídica, que representa aproximadamente 50% de sua massa total e forma a barreira entre dois compartimentos líquidos, intra e extracelular (Cooper, 1997). As trocas entre estes compartimentos são feitas através de bombas, canais de trocas de íons e transporte molecular como o da glicose (Wajcman e cols., 1984). O modelo estrutural de membrana eritrocitária mais aceito é o de mosaico bilipídico e fluídico proposto e descrito por Singer e Nicolson em 1972 como representado na Figura 2.

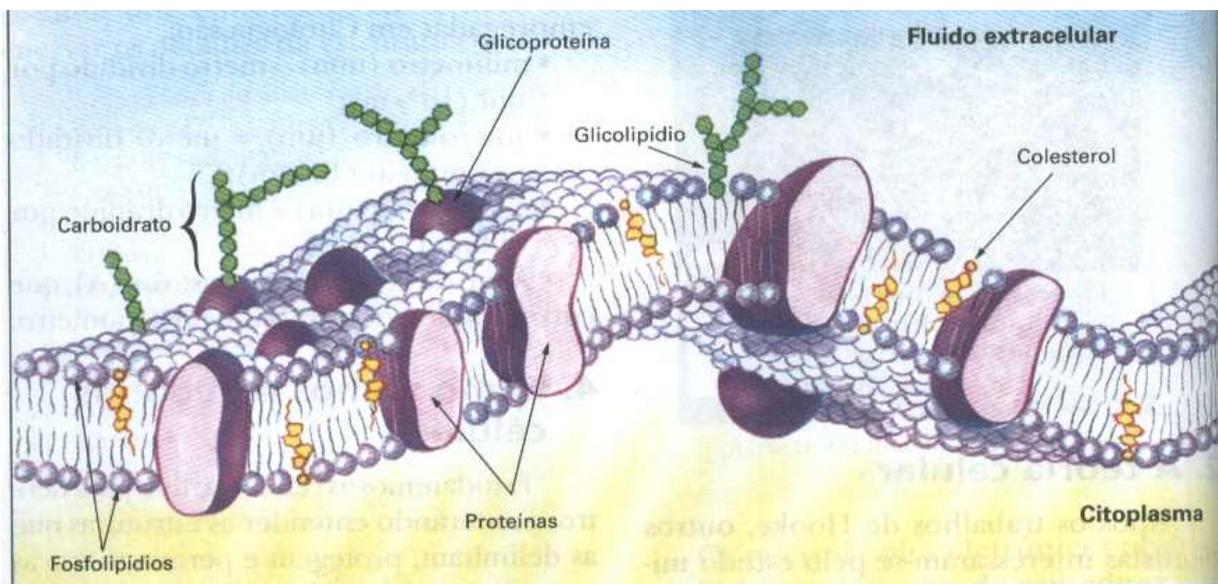


Figura 2. Modelo de mosaico bilipídico e fluídico da membrana celular.³

A principal função do eritrócito é transportar a hemoglobina. Esta por sua vez é uma proteína responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e pelo transporte do gás carbônico produzido pela respiração dos tecidos para os pulmões para ser exalado (Nelson e Cox, 2002). A função e a integridade dos eritrócitos são afetadas negativamente pelo estresse oxidativo. Os eritrócitos são utilizados em muitos estudos relacionados à composição e ao comportamento de membrana, devido, principalmente, à sua disponibilidade e acessibilidade. De fato, a mudança na permeabilidade da membrana aumenta a peroxidação lipídica (Rohn e cols., 1998), altera a morfologia da célula (Shinar e cols., 1989) e também pode

³ Figura disponível em < <http://paginas.ucpel.tche.br/~mflessa/bi6.html>>

causar hemólise (Visser e cols., 1994; Zou e cols., 2001). Além disso, qualquer alteração da membrana dos eritrócitos, seja em sua composição ou estabilidade, serve de ferramenta diagnóstica para uma série de doenças e para estudos de comportamentos celulares mediante ganho de idade, exercícios físicos, dieta ou a exposição a pesticidas da classe glicina substituída (Marigliano e cols., 1999; Mazzanti e cols., 2002; Srinivasan e Kempaiah, 2006; Batista e cols., 2007; Firmino, 2007).

O hematócrito é o volume da massa eritróide de uma amostra de sangue, expressa em porcentagem do volume desta (Failace, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de referência * do eritrograma em adultos.

	Homens	Mulheres
Eritrócitos (M/ μ L)	5,3 \pm 0,8	4,7 \pm 0,6
Hemoglobina (g/dL)	15,5 \pm 3,0	13,6 \pm 2,5
Hematócrito (%)	47,0 \pm 7,0	42,0 \pm 6,0

* Adultos brancos; 5% abaixo, em negros. (média \pm 2 DP).

Fonte: Hemograma: Manual de Interpretação (Failace, 2003, p.43).

2.1.2. Hemólise

O termo hemólise significa lise ou destruição do eritrócito. À medida que o eritrócito torna-se mais velho, certo número de enzimas glicolíticas diminui de atividade, a membrana torna-se comprometida, a concentração de hemoglobina celular aumenta e a plasticidade celular diminui. A deformabilidade do eritrócito é colocada à prova quando da sua passagem pelos capilares e, principalmente, pelos poros curtos do sistema reticuloendotelial, particularmente, o baço. Dessa maneira, os eritrócitos são forçados a ultrapassar aberturas de vários formatos geométricos encontrados no baço, caracterizando-o como um órgão de filtração mecânica (Rossetto e Abatti, 2005). Fisiologicamente, há permanente lise dos eritrócitos principalmente pelas células do baço. Esta lise é compensada pela formação de novos eritrócitos na medula óssea, de modo a manter estável o número de eritrócitos

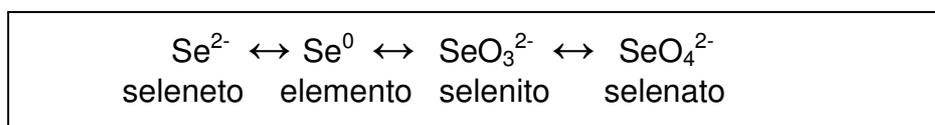
na circulação. É importante este equilíbrio entre a formação e a destruição fisiológica para não ocorrer anemia (Verrastro e cols., 1996).

A hemólise pode ser produzida por reações a certos medicamentos, como um processo auto-imune, devido à presença de hemoglobinas anormais ou, no caso mais freqüente da circulação extracorpórea, por trauma físico (Souza e Elias, 2006).

2.2. Selênio

2.2.1. Aspectos Gerais

Este elemento químico foi descoberto em 1817 pelo sueco Jons. J. Berzelius, pertence ao grupo 16 da tabela periódica, pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação: -II (seleneto), 0 (Se elementar), +IV (selenito), e +VI (selenato) (Esquema 1)(Chasteen e Bentley, 2003).



Esquema 1: Estados redox do selênio (Chasteen e Bentley, 2003).

O Se é distribuído largamente ao longo da crosta terrestre em rochas, minerais, combustíveis fósseis e material vulcânico. Os solos derivados desses materiais tem conteúdos de Se que variam de traços para potencialmente tóxico (Lockitch, 1989).

O interesse por esse elemento surgiu no começo da década de 30 quando foram detectados casos de toxicidade crônica e aguda em animais que viviam em regiões seleníferas, pois causava emagrecimento, perda de pêlos e anemia (Moxon e Rhian, 1943).

Em 1957 foi demonstrado em ratos, que o Se é um elemento traço essencial na dieta, e pode ser usado para prevenir estados de deficiência nutricional, particularmente quando usado em combinação com vitamina E e aminoácidos contendo enxofre (Schwartz e Foltz, 1957). A essencialidade de Se em humanos foi estabelecida em 1979, quando suplementos com Se foram usados com sucesso

para tratar um paciente com distrofia muscular que havia recebido previamente nutrição parenteral durante um longo período (van Rij e cols, 1979).

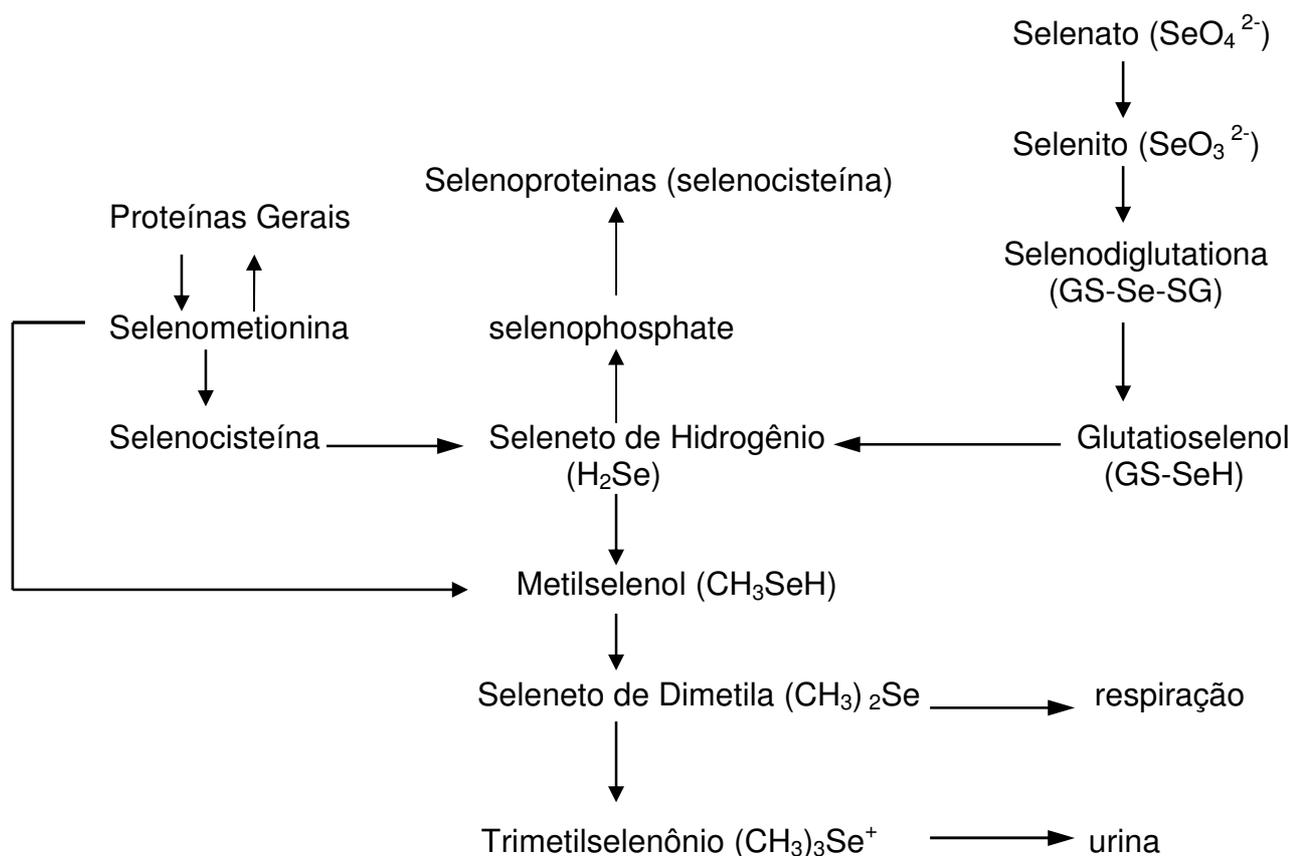
2.2.2. Metabolismo e Atividade biológica

A Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50-200 μg de Se na dieta, a qual é considerada segura e saudável para adultos (Food and Nutrition Board, 1989). Por outro lado, sabe-se que a concentração alimentar requerida de Se é muito próxima da dose que pode ser tóxica (Oldfield, 1987).

O Se aparece nas formas orgânica e inorgânica. A forma inorgânica que é mais utilizada na suplementação alimentar é o selenito de sódio (Na_2SeO_3), que é absorvido majoritariamente no intestino. As formas inorgânicas (selenito e selenato) são reduzidas a seleneto e imediatamente destinadas à síntese de selenoproteínas e o excesso é excretado (Navarro-Alarcón e López-Martinez, 2000).

A forma orgânica é encontrada predominantemente em grãos, peixe, carne, aves, ovos, e produtos derivados do leite e entra na cadeia alimentar pelo consumo de plantas (Navarro-Alarcón e López-Martinez, 2000, Muñiz-Naveiro e cols., 2005). Algumas pesquisas mostraram que leveduras enriquecidas com Se e algumas plantas como cebola, alho, chá e fungos podem atuar como suplementos orgânicos de Se (Ip e cols., 1992, Whanger e cols., 2000, Dumont e cols., 2006).

O Se orgânico está presente como selenocisteína e selenometionina (Esquema 2). Estes aminoácidos são metabolizados para seleneto pela beta-liase (Burk e Hill, 1993). Este seleneto também é utilizado na síntese de selenoproteínas, e pode ser excretado nas formas mono -, di -, ou tri-metilados, sendo que a principal forma excretada encontrada na urina é a trimetilada (Vadhanavikit e cols., 1993) (Esquema2).



Esquema 2: Metabolismo de selênio em animais (Tinggi, 2003).

Recentemente, foi demonstrado que dentro dos níveis normais de Se, ou seja, não tóxicos, a principal forma encontrada na urina é como seleno-açúcar (1 β -metilseleno-*N*-acetil-D-galactosamina (Suzuki e col., 2005).

O Se é amplamente distribuído em tecidos do corpo e é um componente importante de muitas enzimas antioxidantes. Sabe-se que o Se está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas tioredoxina redutase (Holmgren, 1985), iodotironinas desiodases (Behne e Kyriakopoulos, 1990) e GPx (Wingler e Brigelius-Flohé, 1999). A incorporação de Se no organismo, especialmente como cofator de enzimas do sistema antioxidante, depende, além da quantidade absorvida, da sua conversão a uma forma biologicamente ativa (Foster e Sumar, 1995).

A função biológica mais conhecida do Se é sua ação antioxidante, por formar o sítio ativo da GPx que é responsável pela remoção de peróxidos. O ciclo de reação proposto para a enzima GPx ocorre em três etapas (Esquema 3). Inicialmente a

selenocisteína presente no sítio ativo da enzima reage com um hidroperóxido orgânico para formar o ácido selenênico; a seguir, ocorre uma redução seqüencial (duas etapas) da enzima com oxidação da GSH (Sies, 1993).



Esquema 3: Redução de hidroperóxidos pela GSH-Px (Sies, 1993).

A deficiência de Se na dieta pode causar doenças musculares em carneiros e gado (Wolf e cols., 1963), além de algumas patologias humanas, como doenças cardiovasculares (Alissa e cols., 2003), câncer, cirrose, esclerose e diabetes (Navarro-Alarcón e López-Martinez, 2000). Em adição a sua essencialidade nutricional, o Se tem apresentado importantes benefícios à saúde. Estes incluem a redução de incidência de algumas desordens, aperfeiçoando a função imune (McKenzie e cols., 2001), reduzindo a infecção virótica (Beck e cols., 2003) e também sua ação como um agente preventivo do câncer, quando administrado em doses farmacológicas (Whanger, 2004).

2.2.3. Toxicidade

A toxicidade de compostos de Se não depende apenas da forma química e da quantidade consumida deste elemento, mas também de uma variedade de outros fatores incluindo a covaia, a idade, o estado fisiológico, a nutrição e a rota de administração (Tinggi, 2003). Quando a ingestão diária de Se excede à capacidade corporal de eliminação, algum tipo de intoxicação pode ocorrer e os sintomas crônicos mais comuns são: irritação severa das vias respiratórias, gosto tipicamente metálico na boca, edema pulmonar e cheiro característico de alho (Bedwall e cols., 1993; Diaz e cols., 1997).

Na década de 60, especulava-se sobre os efeitos tóxicos do Se, onde seu excesso causaria a inativação das enzimas sulfidrílicas (Tsen e Collier, 1959; Schwarz, 1961). A toxicidade do Se (Selenosis) foi estudada em humanos e também em animais. Doses altas de Se (> 900µg/ dia) produzem uma síndrome tóxica de

dermatite, perda de cabelo, unhas doentes e neuropatia periférica (Beers e Berkow, 1999). Da mesma forma, foi relatado que o excesso de Se causa morte em aves adultas, deformações e morte embrionária (Ohlendorf, 1999) e ainda, causa teratogenicidade em ratos (Usami e cols., 1999).

Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do Se ainda não estarem completamente esclarecidos, foi proposto que a toxicidade está envolvida com a sua interação com grupos tiólicos. Segundo Seko e cols. (1989), a reação do selenito com GSH produziria radical superóxido, conforme ilustrado no Esquema 4.



Esquema 4: Produção de superóxido pela redução do selenito com tióis (Seko e cols., 1989).

Além do trato gastrointestinal, o Se pode ser absorvido por tecidos cutâneos ou por inalação. Estas duas últimas vias de absorção de Se estão relacionadas com a exposição e intoxicação ocupacional por compostos de Se (Whanger e cols., 1976). Após a absorção, os maiores níveis de Se 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 e Gerlack, 1972).

O Se pode ser eliminado do organismo pelas vias excretoras - urina, fezes e ar expelido. Os rins têm um papel importante, 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 desse elemento (Valentine e cols., 1978). A excreção de selênio pelo ar expirado é realizada basicamente pelo composto volátil seleneto de dimetila e tem sido detectado na respiração de indivíduos expostos acidentalmente a níveis altos desse elemento (Mozier e cols., 1988).

2.3. Telúrio

2.3.1. Aspectos Gerais

O elemento Te foi descoberto em 1782. Entretanto, a síntese de moléculas orgânicas contendo Te ocorreu no início do século XIX. O primeiro composto foi relatado há mais de 150 anos atrás com a síntese de teluretos de dietila (Wöhler, 1840). Assim como o Se, o Te também pertence ao grupo 16 da tabela periódica e apresenta-se sob quatro estados de oxidação: $-II$ (telureto), 0 (Te elementar), $+IV$ (telurito), e $+VI$ (telurato) (Scansetti, 1992).

O Te elementar é encontrado em muitos minérios, junto com o Se, e é obtido comercialmente como um sub-produto no refinamento do cobre, do chumbo, do bismuto e de outros metais (U.S. Bureau of Mines, 1985). Este elemento apresenta a propriedade de interagir com metais (Painter, 1941; Khayat e Dencher, 1984) sendo utilizado na produção industrial de vidro e aço, e como teluretos de chumbo e bismuto são dispositivos semicondutores utilizados em termelétricas (Chasteen e Bentley, 2003).

Sabe-se que o Te metálico está presente na composição de organismos vegetais, tais como o alho (Larner, 1995) e também está presente na forma de telurocisteína e telurometionina em muitas proteínas de bactérias (Boles e cols., 1995; Budisa e cols., 1995), leveduras (Yu e cols., 1993) e fungos (Ramadan e cols., 1989). Mas até o presente momento, proteínas contendo Te não foram identificadas em células animais. Por isso, o Te não apresenta função fisiológica descrita até o momento, em mamíferos (Taylor, 1996).

2.3.2. Toxicidade

Casos de intoxicação ocupacional aguda por Te 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 e cols., 1989; Taylor e cols., 1996).

A toxicidade desse elemento parece estar relacionada ao seu estado de oxidação. O mecanismo proposto para explicar essa toxicidade envolve a

oxirredução de grupos –SH de moléculas biologicamente ativas (Blais e cols., 1972; Young e cols., 1981; Deuticke e cols., 1992).

O dióxido de Te, 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 sub-cutâneas, na mãe, do 15º ao 19º dia da gestação (Perez-D'Gregório e Miller, 1988).

2.4. Organocalcogênios

Os organocalcogênios têm sido alvos de interesse como intermediários e reagentes em síntese orgânica (Comasseto e cols., 1997; Braga e cols., 1997; Zeni e cols., 2003), em virtude de suas aplicações sintéticas e de suas propriedades farmacológicas (Parnham e Graf, 1991; Kanda et al., 1999; Nogueira et al., 2004). Dessa forma, o risco de contaminação ocupacional por organocalcogênios motiva estudos toxicológicos.

2.4.1. Compostos orgânicos de Se: Propriedades Farmacológicas e Toxicológicas

Vários trabalhos têm demonstrado que compostos orgânicos de Se exibem propriedades farmacológicas, que vão desde a ação como potentes agentes terapêuticos contra o câncer (El-Bayoumy e Sinha, 2004; Das e cols., 2005; Klein, 2006), retardar o processo de envelhecimento (Soriano - Garcia, 2004), e experimentalmente foi demonstrado também que o ebselen possui efeito neuroprotetor em vários modelos de neurotoxicidade (Daiber e cols., 2000; Rossato e cols., 2002).

Assim como o ebselen, o disseleneto de difenila também possui atividade antiinflamatória, antinociceptiva e neuroprotetora (Nogueira e cols., 2003a; 2004; Ghisleni e cols., 2003). Nos últimos anos, tem sido descrito que este composto orgânico de Se apresenta propriedades antiúlcera (Savegnago e cols., 2006) e hepato-protetora (Borges e cols., 2005a; 2006). Além disto, diversos trabalhos têm demonstrado que o disseleneto de difenila possui efeito protetor contra a

lipoperoxidação em ratos e camundongos (Meotti e cols. 2004; Santos e cols., 2004; 2005). Da mesma forma, Nogueira e cols. (2004) sugerem que, pelo fato de o disseleneto de difenila possuir atividades semelhantes as da GPx, este composto é um bom candidato a ser um agente antioxidante.

No entanto, apesar de suas propriedades farmacológicas Parnham e Graf (1991) relataram que compostos orgânicos de Se apresentam toxicidade *in vivo* e esta toxicidade é dependente da estabilidade da ligação carbono-selênio. Santos e cols. (2009b) mostraram que compostos orgânicos de Se foram citotóxicos e genotóxicos em leucócitos humanos *in vitro*, pois induziram perda da viabilidade celular e danos no ácido desoxirribonucléico (DNA). Outros estudos relatam que o ebselen apresenta toxicidade quando administrado por via subcutânea durante 21 dias em filhotes de ratos, induzindo a danos oxidativos no fígado dos mesmos (Farina e cols., 2004). Além do ebselen, pesquisas mostram que o disseleneto de difenila também apresenta toxicidade, pois quando administrado de forma crônica e em altas doses pode causar danos cerebrais em camundongos (Maciel e cols., 2000; Jacques-Silva e cols., 2001). De fato, Nogueira e cols. (2003b) demonstraram que o disseleneto de difenila pode causar efeitos neurotóxicos em camundongos quando administrado via intraperitoneal, sugerindo que a neurotoxicidade depende da rota de administração.

Além disso, o disseleneto de difenila pode causar inibição da enzima Na^+ , K^+ -ATPase cerebral de ratos (Borges e cols., 2005b) e afetar o sistema glutamatérgico em plaquetas humanas (Borges e cols., 2004). Dados da literatura também indicam que o disseleneto de difenila possui vários efeitos tóxicos como teratogênico, causando má-formação óssea e outras anomalias em fetos de ratas tratadas com este composto (Favero e cols., 2005), efeito pró-oxidante em leveduras (Rosa e cols., 2005) e efeitos mutagênicos em salmonella (Rosa e cols., 2004). Em sangue humano foi demonstrado que o $(\text{PhSe})_2$ inibe a atividade da enzima delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), devido à interação com os grupos $-\text{SH}$ da enzima (Nogueira e cols., 2003c). Além disto, foi demonstrado que camundongos tratados com cloreto de mercúrio (HgCl_2) e $(\text{PhSe})_2$, simultaneamente, apresentam alta taxa de letalidade (Brandão e cols., 2006).

2.4.2. Compostos orgânicos de Te: Propriedades Farmacológicas e Toxicológicas

Alguns autores têm sugerido o uso de compostos orgânicos de Te como antioxidantes e antiinflamatórios (Engman e cols., 1995; Nogueira e cols., 2004; Souza e cols., 2009), como drogas antitumor e antivirais (Sredni e cols., 1988; Nyska e cols., 1989; Sun e cols. 1996) e mimetizadores da atividade da enzima GPx (Engman e cols., 1992; Anderson e cols., 1993), uma importante enzima endógena que participa de reações de neutralização de agentes pró-oxidantes.

Pesquisadores estudaram o efeito de alguns teluretos em eritrócitos, quando expostos ao estresse oxidativo; em baixas concentrações, estes compostos apresentaram efeito protetor sobre danos no DNA sem alterar a taxa de hemólise. Entretanto o mesmo não ocorreu em altas concentrações, nas quais, esses teluretos aceleraram a taxa de hemólise e dois deles foram fortemente genotóxicos (Tiano e cols., 2000).

Dados sobre a toxicidade destes compostos ainda são raros na literatura, mas existem alguns trabalhos do nosso grupo demonstrando que compostos orgânicos de Te são mais tóxicos que os de Se (Maciel e cols., 2000, Meotti e cols., 2003; Borges e cols., 2004).

Os compostos orgânicos de Te são potentes agentes neurotóxicos, pois bloqueiam a síntese do colesterol, que é um precursor da mielina, inibindo a atividade da enzima esqualeno monooxigenase, responsável pela conversão do esqualeno a 2,3-epoxiesqualeno, um precursor do colesterol. A sensibilidade da enzima aos compostos orgânicos de Te deve-se à reação desses compostos com grupamentos sulfidrílicos e com a ligação de cisteínas vicinais (Landen e Porter, 2001). Sendo assim, os compostos orgânicos de Te inibem 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 e cols., 1994).

Alguns autores observaram que o ditelureto de difenila, um organotelureto, é neurotóxico para camundongos (Nogueira e cols., 2002; Moretto e cols., 2003), produz toxicidade hepática e renal para roedores (Meotti e cols., 2003), reduz o tamanho fetal e o peso e induz várias anormalidades morfológicas, em fetos de ratos

de Wistar (Stangherlin e cols., 2005). Além disso, este composto e outros compostos orgânicos também são citotóxicos *in vitro* (Iwase e cols., 2004; Sailer e cols., 2004).

2.5. Glutathiona

O tripeptídeo glutathiona (g-L-glutamil-L-cisteinilglicina) é o tiol celular que está presente em concentrações até 12 mM em células mamíferas (Cooper, 1997). A Glutathiona é sintetizada *in vivo* pela ação sucessiva de duas enzimas (Meister, 1974). A enzima γ -glutamilcisteína sintetase usa glutamato e cisteína como substrato para formar o dipeptídeo γ GluCys (g-L-glutamil-L-cisteína) que é combinado com glicina em uma reação catalisada por glutathiona sintetase para gerar GSH. O trifosfato de adenosina (ATP) é um co-substrato para ambas as enzimas. O nível intracelular da glutathiona é regulado pela inibição do *feedback* da γ GluCys sintetase pelo produto final, a GSH (Richman e Meister, 1975; Misra e Griffith, 1998). Assim, a síntese e o consumo celular da glutathiona são balanceados.

A GSH apresenta funções importantes, como antioxidante, participa da reação de detoxificação de xenobióticos, é um co-fator em reações de isomerização, e é armazenada e transportada na forma de cisteína (Meister e Anderson, 1983; Cooper, 1997). Além disso, é essencial para a proliferação celular (Poot e cols., 1995) e conserva o potencial redox de tióis em células, mantendo os grupos sulfidrila das proteínas na forma reduzida (Cotgreave e Gerdes, 1998).

O sistema da glutathiona é muito importante para a defesa celular contra espécies reativas de oxigênio (ERO). A alta concentração intracelular de glutathiona protege contra uma variedade de diferentes EROs.

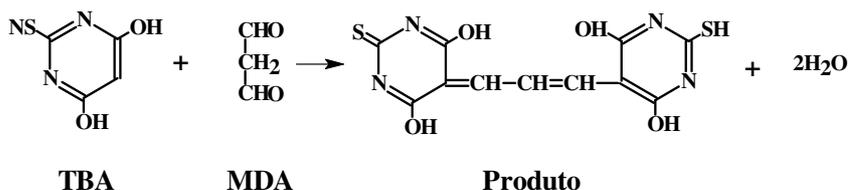
Durante a detoxificação de ERO, a GSH é envolvida em dois tipos de reações: (1) GSH reage não enzimaticamente com radicais como ânion superóxido, óxido nítrico ou o radical hidroxila (Saez e cols., 1990; Clancy e cols., 1994; Winterbourn e Metodiewa, 1994; Singh e cols., 1996) e (2) GSH é o doador de elétron para a redução de peróxidos na reação de GPx (Chance e cols., 1979). O produto final da oxidação da GSH é o dissulfeto de glutathiona (GSSG). Dentro das células a GSH é regenerada a partir do GSSG pela reação catalisada pela glutathiona redutase (GR) (Dringen, 2000).

A GSH é um marcador da viabilidade celular e sua diminuição é indicativa de lesão oxidante. Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações, da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em animais (Halliwell e Gutteridge, 1985).

2.6. Danos oxidativos

As EROs são produzidas normalmente durante o metabolismo celular. As ERO incluem radicais livres, que apresentam elétron desemparelhado centrado no átomo de oxigênio como radicais hidroxila (HO^\bullet) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), e também oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não radicalares entre outros (Halliwell, 2000; Pietta, 2000). Os radicais livres possuem uma grande reatividade, causando lipoperoxidação e oxidações de proteínas e DNA (ácido desoxirribonucleico) (Poli e cols., 2004).

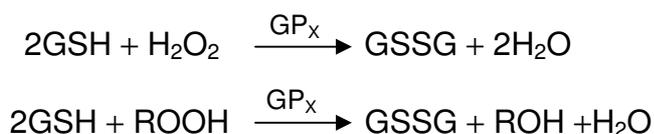
As membranas celulares, as quais contem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, podem sofrer danos mediados por radicais livres. A lipoperoxidação é iniciada por algum radical que, ao reagir com os lipídios insaturados das biomembranas, resulta na formação de hidro ou lipoperóxidos, que são altamente reativos e podem iniciar uma cascata oxidativa, com severas conseqüências à integridade da membrana. Nestas reações ocorre a liberação de produtos da degradação de ácidos graxos, tais como o malondialdeído (MDA) (Marnett, 1999). A quantificação de tal composto têm sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Esta quantificação pode ser feita pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), a qual tem sido usada como uma medida de lipoperoxidação (Ohkawa e cols., 1979) (Esquema5).



Esquema 5: Reação colorimétrica do TBA com o MDA, que é um produto secundário da peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados, levando a um produto final de coloração rosa e duas moléculas de água.

O excesso de ERO no organismo é combatido por antioxidantes endógenos ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (2000) “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”. Os antioxidantes produzidos endogenamente podem agir enzimaticamente, a exemplo da GPx, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou, não enzimaticamente como a glutatona, peptídeos de histidina e proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) (Finkel, 2000). Além dos antioxidantes endógenos, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C) e selênio (Brzezinska-Slebodzinska e cols., 1994; Halliwell, 1995; Pietta, 2000; Anderson e cols., 2005; Valko e cols., 2006).

Entre as peroxidases que contém selênio, a que se destaca é a GPx. Esta enzima catalisa a redução de peróxidos utilizando grupos tiólicos (principalmente glutatona) como doadores de elétrons (agente redutor), protegendo dos danos oxidativos (Matés, 2000). Como já visto, os peróxidos são espécies reativas de oxigênio e estão relacionados com a propagação da lipoperoxidação; portanto, a remoção de peróxidos atenua os danos oxidativos nas membranas celulares (Esquema 6).



Esquema 6: Remoção de peróxidos pela ação catalítica da GPx (Valko cols. 2005).

Sob condições normais, tem-se um equilíbrio, ou seja, os sistemas antioxidantes celulares minimizam os danos causados pelas ERO. Porém, quando a produção de radicais livres excede a capacidade protetora da célula, têm-se o estresse oxidativo (Figura 3) (Schulz e cols., 2000). Alterações neste equilíbrio entre pró- e anti- oxidantes no organismo, implicam em vários processos biológicos e patológicos, como envelhecimento, inflamação, carcinogênese, isquemia, hipertensão, catarata, enfisema pulmonar, diabetes, doenças neurodegenerativas e doenças autoimunes (Lerman e cols., 2001; Salganik, 2001 e Aksenov e cols., 2001; Senthila e cols., 2004; Zhou e cols., 2004; Sarban e cols., 2005; Kotlyar e cols., 2006;).

Este desequilíbrio pode ser causado por espécies de origem endógena, pelo metabolismo de xenobióticos ou por compostos de origem exógena (Wieslander, e cols., 1998), como pode ocorrer na presença de altas concentrações de organocalcogênios (Nogueira e cols., 2004).

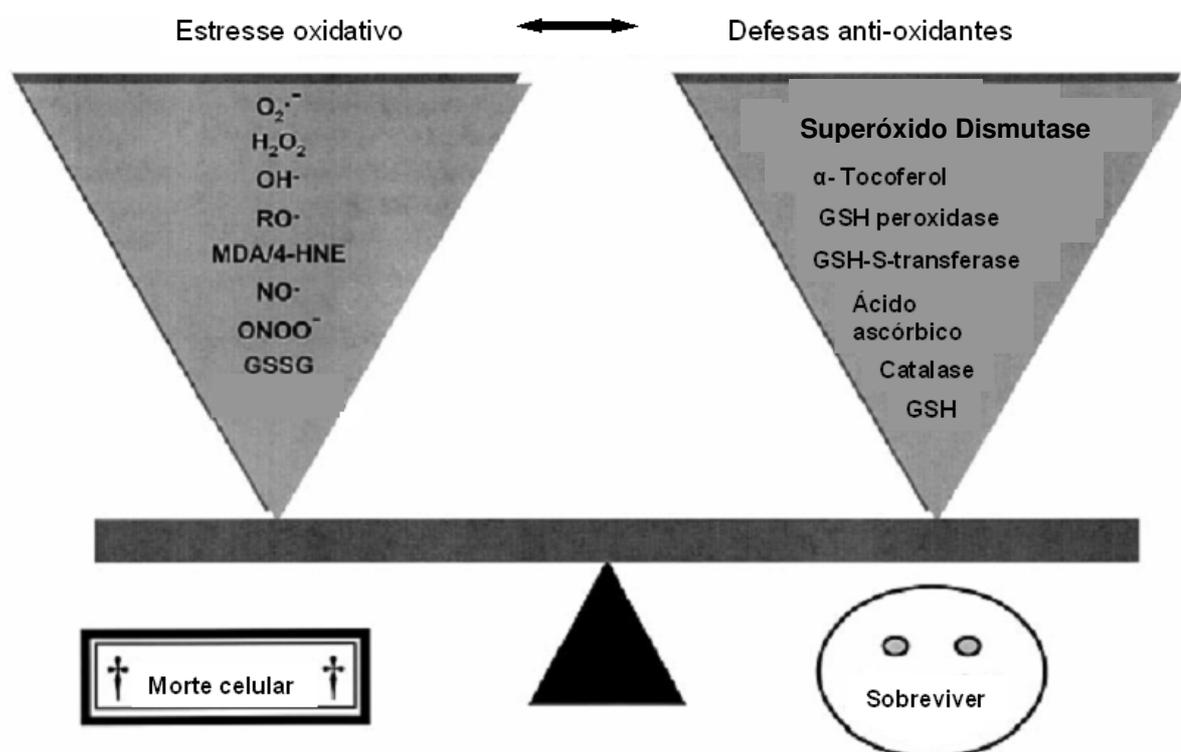


Figura 3. Equilíbrio entre geração de EROs e sistemas antioxidantes. Um desequilíbrio de ambos os sistemas devido a qualquer produção excessiva de ROS (esquerda) ou redução de defesas antioxidantes (direita) conduz ao estresse oxidativo (Schulz et al., 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de organocalcogênios, por meio de um sistema *in vitro*, utilizando eritrócitos humanos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar se os organocalcogênios [(*S*)-2-fenil-4-(fenilselenometil)-4,5-dihidrooxazol (**1**), (*R*)-2-fenil-4-(2-(fenilselenoetil)-4,5-dihidrooxazol (**2**), seleneto de difenila (**3**), telureto de difenila (**4**), (*S*)-*tert*-butil 1-disseleneto-3-metilbutano-2-*N*-(carbamato) (**5**), (*S*)-*tert*-butil 1-disseleneto-3-fenilpropano-2-*N*-(carbamato) (**6**), 1-telurobutil-estirila (**7**), 2-dicloreto de butiltelúro-penteno-1-fosfonato (**8**), telureto de bis-estirila (**9**), 2 - (butiltelúrio) tiofeno (**10**), 2-(butiltelúrio) furano (**11**), disseleneto de difenila (**12**), ditelureto de dinaftila (**13**), ditelureto de difenila (**14**)] e os compostos inorgânicos: selenito de sódio (**15**) e dióxido de selênio (**16**) causam hemólise em eritrócitos *in vitro*.
- Verificar os níveis de peroxidação lipídica em eritrócitos na presença dos organocalcogênios (**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14**) e dos compostos inorgânicos (**15, 16**) através da medida das espécies reativas ao ácido tio barbitúrico (TBARS) *in vitro*, em eritrócitos humanos.
- Investigar o efeito da GSH e da glicose nas propriedades hemolíticas dos diorganocalcogênios: (*S*)-*tert*-butil1-disseleneto-3-metilbutano-2-*N*-(carbamato) (**5**), (*S*)-*tert*-butil 1-disseleneto-3-fenilpropano-2-*N*-(carbamato)(**6**), disseleneto de difenila(**12**), ditelureto de dinaftila (**13**), ditelureto de difenila (**14**) em eritrócitos humanos *in vitro*.
- Determinar a oxidação de grupamentos tióis pelos compostos diorganocalcogênios (**5, 6, 12, 13, 14**) *in vitro*.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram organizados neste item. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo. Os artigos 1 e 2 estão dispostos na forma que foram publicados na edição da revista científica.

4.1 – ARTIGOS CIENTÍFICOS: CAPÍTULO 1

4.1.1. Artigo 1

INVESTIGAÇÃO DA POTENCIALIDADE TÓXICA DE CALCOGÊNIOS EM ERITRÓCITOS

SCREENING OF POTENTIALLY TOXIC CHALCOGENS IN ERYTHROCYTES

VIVIANE PATRÍCIA P. SCHIAR, DANÚBIA B. DOS SANTOS,
DIOGO S. LÜDTKE, FABRÍCIO VARGAS, MÁRCIO W. PAIXÃO,
CRISTINA W. NOGUEIRA, GILSON ZENI, JOÃO BATISTA T. ROCHA.

Toxicology in Vitro 21 (2007) 139–145.

Available online at www.sciencedirect.com

Toxicology in Vitro 21 (2007) 139–145

www.elsevier.com/locate/toxinvit

Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes

Viviane Patrícia P. Schiar, Danúbia B. dos Santos, Diogo S. Lüdtkke, Fabrício Vargas, Márcio W. Paixão, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni, João Batista T. Rocha *

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

Received 30 March 2006; accepted 29 August 2006
Available online 6 September 2006

Abstract

Previous literature reports have demonstrated that a number of human diseases, including inflammation and cancer, can be caused by environmental and occupational exposure to toxic compounds, via DNA damage, protein modifications, or lipid peroxidation. The present study was undertaken to screen the toxicity of a variety of chalcogens using erythrocytes as a model of cell injury. The toxicity of these compounds was evaluated via quantification of hemolysis and lipid peroxidation. The present investigation shows that diphenyl ditelluride and phenyl tellurides are toxic to erythrocytes. The organoselenium compounds were not toxic to erythrocytes even when tested at high concentrations and with a hematocrit of 45%. The hemolytic effect of tellurides was not positively correlated with thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) production suggesting that lipid peroxidation is not involved in the hemolysis provoked by organotellurium compounds. The results suggest that chalcogen compounds may be toxic to human erythrocytes, depending on their structure.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Organotellurium; Organoselenium; Hemolysis; Erythrocytes; Lipid peroxidation; Toxicity

1. Introduction

Selenium and tellurium both belong to the metalloid family of elements and, therefore, share some similar chemical characteristics. Similar to selenium (Painter, 1941), inorganic tellurium is toxic to mammalian species (Taylor, 1996). This compound is considered a non-essential element for life (Chasteen and Bentley, 2003; Kron et al., 1991), but it is used in the industry in glass and steel production and as a gasoline antiknock additive (Fairhill, 1969). Similarly, organotellurium compounds are also used as stabilizers for polymers (Engman et al., 1996) and in the photography industry (Kodak, 1989).

Research has focused on the ability of organoselenium (Meotti et al., 2004; Nogueira et al., 2004) and organotellurium compounds to act as antioxidants (Nogueira et al., 2004; Kanski et al., 2001; Wieslander et al., 1998; Engman

et al., 1995). However, data from our research group has suggested that diphenyl ditelluride, an organotellurium compound, is neurotoxic to mice, produces renal and hepatic toxicity in rodents (Nogueira et al., 2004), reduces fetal size and weight, as well as inducing other morphological abnormalities (Stangherlin et al., 2005). In contrast to ditelluride, diphenyl diselenide is less toxic to rodents, but can increase the incidence of skeletal anomalies in developing rats (Favero et al., 2005) and also has pro-oxidative effects on yeast (Rosa et al., 2005) and mutagenic effects on *Salmonella* (Rosa et al., 2004).

In spite of this, organoselenium compounds have been considered as potential therapeutic agents for cancer (El-Bayoumy and Sinha, 2004) and ebselen and diphenyl diselenide have neuroprotective effects in several models of neurotoxicity (Nogueira et al., 2004) as well as enhancing memory in mice (Rosa et al., 2003).

The erythrocyte is a type of cell that contains high concentrations of polyunsaturated fatty acids, molecular oxygen and ferrous ions in the ligand state (Niki et al., 1991). For this reason, it can be expected to be highly vulnerable

* Corresponding author. Tel.: +55 55 32208140; fax: +55 55 32208031.
E-mail address: jbrocha@yahoo.com.br (J.B.T. Rocha).

to reactions involving free radicals, and can be very susceptible to lipid peroxidation and hemolysis in the cell membrane (Brandão et al., 2005; Bosi et al., 2004; Devasena et al., 2001; El-Missiry and Abou-Seif, 2000). However, these cells possess an efficient antioxidant system at the cytoplasmic level which makes them exceptionally resistant to peroxidation when the radicals are produced within the cell (Clemens and Wailer, 1987). Of particular importance, erythrocytes provide a simple model to study the protective or toxic effect of a great variety of substances or situations associated with oxidative stress (Lexis et al., 2006; Eisele et al., 2006; Muñoz-Castañeda et al., 2006). Furthermore, to the best of our knowledge, there is no data in the literature about the anti- or pro-oxidative effect of organochalcogens on human erythrocytes.

In the present investigation, we compared the ability of different organochalcogens to induce erythrocyte hemolysis after in vitro exposure and attempted to correlate the hemolytic activity with the pro-oxidative effect of these compounds.

2. Experimental

2.1. Reagents

All reagents were of pure analytical grade. The compounds investigated are shown in Fig. 1. All compounds were prepared according to published procedures (1) (*S*)-2-phenyl-4-(phenylselenanylmethyl)-4,5-dihydrooxazole (Braga et al., 2005), (2) (*R*)-2-phenyl-4-(2-(phenylselenanyl)ethyl)-4,5-dihydrooxazole (Braga et al., 2005), (3) Diphenylselenide (Paulmier, 1986), (4) Diphenyltelluride (Petragnani, 1994),

(5) (*S*)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-methylbutan-2-ylcarbamate (Braga et al., 2003a), (6) (*S*)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (Braga et al., 2003a), (7) butyl(styryl)telluride (Petragnani, 1994), (8) diorganotellurium dichloride phosphonate (Braga et al., 2003b), (9) bistyryltelluride (Petragnani, 1994), (10) 2-(butyltellurium)thiophene (Zeni et al., 2001a), (11) 2-(butyltellurium)furan (Zeni et al., 2001b), (12) diphenyl diselenide (Paulmier, 1986), (13) dinaphthalen ditelluride (Petragnani, 1994), (14) diphenyl ditelluride (Petragnani, 1994). All other chemicals, such as (15) sodium selenite, (16) selenium dioxide, (17) biphenyl, (18) sodium hypochlorite were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. The compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), excepting compound 15 and 18 that were dissolved in phosphate buffered saline (PBS).

2.2. Samples

Cells used in this study were obtained from healthy volunteer donors from the Hospital da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil (age 30 ± 10). Venous blood was collected into heparinized tubes. The erythrocytes (RBCs) were separated by centrifugation (2000 rpm for 10 min at room temperature) and the plasma was aspirated. The cell pellet was washed three times with PBS (6.1 mM and pH 7.4, containing 150 mM NaCl) and suspended in PBS, 5.0 mM glucose for a hematocrit of 45%. Because Ca^{2+} is necessary to maintain the integrity of the cell membrane, the toxicity studied under Ca^{2+} -free conditions (PBS) may be different from that under normal conditions. Thus, for compounds that cause

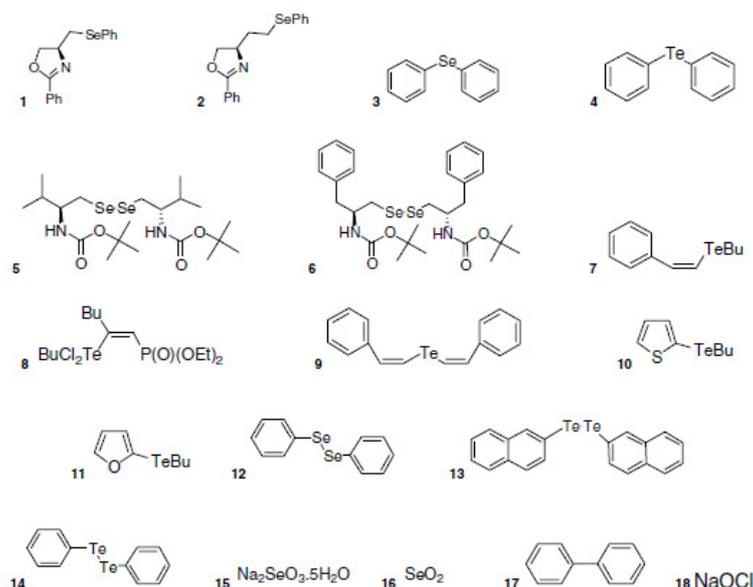


Fig. 1. Chemical structure of compounds tested.

hemolysis, we performed the experiments in the presence of 2.5 mM CaCl₂ and 0.85 mM MgCl₂. Cells were exposed to vehicle (DMSO or PBS) or to the compounds (10–200 μM) for 48 h at (27–29)°C. We attempted to use 37°C, but the rate of hemolysis in control samples was too high. The protocol study was reviewed and approved by the appropriate institutional review board.

2.3. Methods

2.3.1. Hemolysis

After 48 h of exposure to chalcogenides, blood was centrifuged (2000 rpm for 3 min at room temperature), the supernatant was discharged and 1 ml of PBS was added to 1 ml erythrocytes. The extent of hemolysis was analyzed by adding 24 μL of blood to 4 mL of saline-phosphate buffer. The concentration of hemoglobin was determined spectrophotometrically at 590 nm. The value of 100% hemolysis was determined by adding 24 μL of blood to 4 mL of PBS containing 0.01% Triton X-100 and this corresponded to absorbances of 0.14–0.15. These values were used as the blank for individual experiments.

2.3.2. Lipid peroxidation and thiobarbituric acid reactions

Lipid peroxidation in human erythrocytes was quantified by measuring the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (Stock and Dormandy, 1971) with some modifications. After 48 h of exposure to chalcogenides, blood was washed twice with PBS and was mixed with 10% trichloroacetic acid (1:1). Samples were centrifuged (10 min). Sodium chloride (150 μL, 150 mM), 600 μL of 1% phosphoric acid and 600 μL thiobarbituric acid (0.8%) were added to the supernatant. Samples were heated at 100°C for 60 min. The amount of TBARS produced was measured at 532 nm, using MDA to construct standard curves. Lipid peroxidation was expressed as nmol/L MDA formed.

2.4. Statistical analysis

Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by SNK test when appropriate. All values were presented as mean ± SEM and the value of *p* < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Hemolysis

Statistical analysis indicated that compounds 8 (*p* < 0.001) (Fig. 2b), 4 (*p* < 0.001), 13 (*p* < 0.001), 14 (*p* < 0.001) and 16 (*p* < 0.01) significantly enhanced the hemolysis when compared to the control (Fig. 2). Compound 18 (*p* < 0.001) was used as a positive control for hemolysis (Yamaguchi et al., 2001) (Fig. 2b) and compound 17 (*p* > 0.10) was used to check the possible involvement of the phenyl structure in the chalcogenides' hemolytic effect

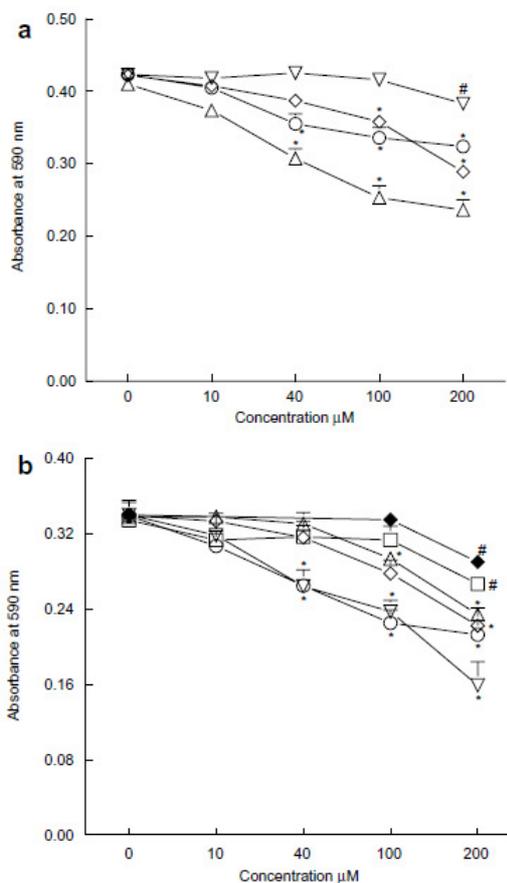


Fig. 2. Effect of organochalcogens on lysis of erythrocytes. Erythrocytes were incubated for 48 h at (27–29) °C varying the concentrations of chalcogens (10–200 μM). Data are reported as mean ± SEM; * denote *p* < 0.001; # denote *p* < 0.01 as compared to the control group (one-way ANOVA/ SNK). (a) Erythrocytes incubated with chalcogens 4 –○– (n = 5–8), 13 –○– (n = 7–11), 14 –Δ– (n = 8–11), 16 –▽– (n = 4) in PBS (pH 7.4) and 5.0 mM glucose. (b) Erythrocytes incubated with chalcogens 4 –○– (n = 4), 8 –○– (n = 4), 13 –Δ– (n = 3), 14 –▽– (n = 4), 16 –□– (n = 3), 18 –◆– (n = 3) in PBS containing Ca²⁺ and Mg²⁺ (pH 7.4), 5.0 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂ and 0.85 mM MgCl₂.

(Table 1). Compound 14 demonstrated the highest hemolytic potential when compared to the other compounds tested (Fig. 2). The hemolytic potential of compound 16 was lower than that of compounds 4, 13 and 14 (Fig. 2). All the other compounds tested did not modify the hemolysis (*p* > 0.10) (Table 1).

3.2. Lipid peroxidation

The incubation of erythrocytes with compounds 15 (*p* < 0.001) and 6 (*p* < 0.01) for 48 h resulted in a significant increase in TBARS production (Fig. 3). In contrast,

Table 1
Effect of compounds on hemolysis in human erythrocytes

Concentration (μM)	C1	C2	C3	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C15	C17 ^a
0.0	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.00	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.01	0.34 ± 0.02
100	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.34 ± 0.02
400	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.34 ± 0.02
1000	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.34 ± 0.02
2000	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.36 ± 0.02

Erythrocytes were incubated with various concentrations of chalcogens (10–200 μM) in PBS (pH 7.4), 5.0 mM glucose at (27–29) °C for 48 h. The chalcogens and C17 do not cause significant increase in erythrocytes hemolysis. C1 ($n=7$), C2 ($n=6$), C3 ($n=6$), C5 ($n=7$), C6 ($n=6$), C7 ($n=6$), C8 ($n=5$), C9 ($n=5$), C10 ($n=6$), C11 ($n=7$), C12 ($n=7$), C15 ($n=4$), C17 ($n=4$). Data are reported as mean \pm SEM, (one-way ANOVA/SNK). The absorbance of hemoglobin was measured at 590 nm and the readings of the tube with Triton X-100 (0.14–0.15) were used to adjust zero of absorbance.

^a With 2.5 mM CaCl_2 and 0.85 mM MgCl_2 in medium.

compounds 14 ($p < 0.001$) and 13 ($p < 0.01$) caused a decrease in TBARS production when compared to the control (Fig. 3). Compound 8 ($p < 0.01$) caused an increase in TBARS production (Fig. 3a) when tested in the absence of Ca^{2+} and Mg^{2+} , but in the presence of CaCl_2 and MgCl_2 , it caused a significant decrease ($p < 0.05$) when compared to the control (Fig. 3b). In the absence of Ca^{2+} and Mg^{2+} , compounds 4 ($p < 0.001$) and 2 ($p < 0.01$) caused a decrease in TBARS production (Fig. 3a), but they had no effect when tested in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} (Table 2). Compound 18 ($p < 0.001$) was used as a positive control for lipid peroxidation (Fig. 3b) and compound 17 ($p > 0.10$)

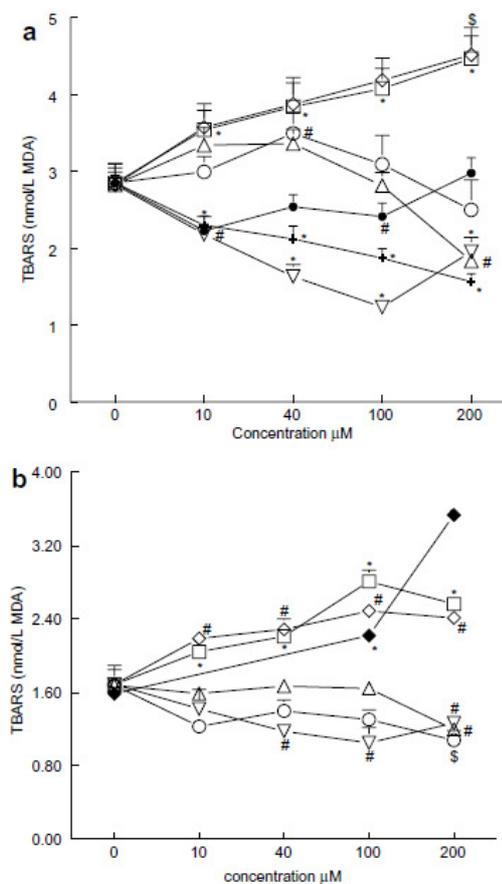


Fig. 3. Effect of organochalcogens on TBARS in erythrocytes. Erythrocytes were incubated for 48 h at (27–29) °C varying the concentrations of chalcogens (10–200 μM). Data are reported as mean \pm SEM; * denote $p < 0.001$, # denote $p < 0.01$, § denote $P < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA/SNK). (a) Erythrocytes incubated with chalcogens 2 \bullet ($n=6$), 4 \blacktriangle ($n=5-8$), 6 \diamond ($n=6$), 8 \square ($n=4$), 13 Δ ($n=7-11$), 14 ∇ ($n=8-11$), 15 \square ($n=4$) in PBS (pH 7.4) and 5.0 mM glucose. (b) Erythrocytes incubated with chalcogens 6 \diamond ($n=3$), 8 \square ($n=4$), 13 Δ ($n=3$), 14 ∇ ($n=4$), 15 \square ($n=4$), 18 \blacklozenge ($n=3$) in PBS containing Ca^{2+} and Mg^{2+} (pH 7.4), 5.0 mM glucose, 2.5 mM CaCl_2 and 0.85 mM MgCl_2 .

Table 2
Effect of compounds on lipid peroxidation in human erythrocytes

Concentration (μM)	C1	C2 ^a	C3	C4 ^a	C5	C7	C9	C10	C11	C12	C16	C17 ^a
0.0	2.95 ± 0.3	1.69 ± 0.1	2.76 ± 0.1	1.69 ± 0.1	2.90 ± 0.2	2.85 ± 0.3	2.85 ± 0.1	2.85 ± 0.4	2.85 ± 0.3	2.83 ± 0.2	2.81 ± 0.4	1.68 ± 0.2
10.0	2.56 ± 0.2	1.40 ± 0.1	2.74 ± 0.1	1.93 ± 0.2	2.94 ± 0.1	2.90 ± 0.2	2.54 ± 0.2	2.45 ± 0.4	2.98 ± 0.3	2.56 ± 0.1	2.91 ± 0.5	1.73 ± 0.2
40.0	3.00 ± 0.2	1.64 ± 0.2	2.80 ± 0.2	2.33 ± 0.1	2.66 ± 0.2	2.68 ± 0.2	2.99 ± 0.2	2.08 ± 0.2	2.80 ± 0.2	2.63 ± 0.1	3.20 ± 0.4	1.80 ± 0.2
100.0	3.08 ± 0.2	1.48 ± 0.2	3.01 ± 0.2	1.90 ± 0.3	2.99 ± 0.3	3.45 ± 0.3	2.99 ± 0.3	2.16 ± 0.2	2.88 ± 0.4	2.70 ± 0.2	3.60 ± 0.3	1.60 ± 0.2
200.0	2.90 ± 0.3	1.72 ± 0.2	3.06 ± 0.1	1.62 ± 0.3	3.12 ± 0.3	3.46 ± 0.1	3.08 ± 0.3	2.14 ± 0.3	2.06 ± 0.3	2.64 ± 0.1	3.30 ± 0.4	1.74 ± 0.1

Erythrocytes were incubated with various concentrations of chalcogens (10–200 μM) in PBS (pH 7.4), 5.0 mM glucose at (27–29) °C for 48 h. The chalcogens and C17 do not caused significant increase in erythrocyte Lipid peroxidation. C1 (n = 7), C2 (n = 5), C3 (n = 5–7), C4 (n = 4), C5 (n = 6), C7 (n = 6), C9 (n = 5), C10 (n = 5), C11 (n = 6), C12 (n = 7), C16 (n = 4), C17 (n = 4). Data are reported as mean ± SEM, (one-way ANOVA/SNK). Lipid peroxidation was expressed as nmol/L MDA formed.

^a With 2.5 mM CaCl₂ and 0.85 mM MgCl₂ in medium.

Table 3
Correlation of TBARS/hemolysis

Medium	2	4	6	8	13	14	15	16
<i>Panel A^a</i>								
Without Ca/Mg	No	Yes***	Yes**	No	No	Yes*	No	No
	4	6	8	13	14	15	16	18
<i>Panel B^b</i>								
With Ca/Mg	No	No	Yes*	Yes**	No	No	No	No

^a Correlations were significant at $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$.

^b Correlations were significant at $p < 0.05^*$, $p < 0.001^{**}$.

was used to check the possible involvement of the phenyl group in the chalcogens' effects on TBARS production (Table 2). All the other tested compounds did not modify the erythrocyte contents of TBARS ($p > 0.10$) (Table 2).

The quantitative relation between the hemolytic effect and TBARS production were analyzed (Table 3) for those compounds which caused significant changes in hemolysis or TBARS. In the absence of Ca²⁺ and Mg²⁺, there was not a significant correlation between TBARS and hemolysis for compounds 2, 8, 13, 15 and 16. In contrast, there was a significant negative correlation for compounds 4 and 14 and there was a significant positive correlation for compound 6. In the presence of Ca²⁺ and Mg²⁺, there was no significant correlation for compounds 4, 6, 14, 15, 16 and 18; whereas a negative correlation was found for compounds 8 and 13 (Table 3).

4. Discussion

The present study demonstrated that some organochalcogens exhibit a hemolytic effect on human erythrocytes after 48 h of exposure. The effects of chalcogens were not modified by dimethylsulfoxide or PBS. The phenyl group of the organochalcogens cannot account for their hemolytic effects or changes in TBARS because biphenyl did not modify these parameters (Tables 1 and 2). Chalcogens induced hemolysis in a concentration-dependent manner and at a low concentration (10 μM) they did not alter hemolysis (Fig. 2). Similar results have been obtained using trout erythrocytes (Tiano et al., 2000). In this study, authors demonstrated that the presence of low concentrations

(≤ 10 μM) of chalcogens caused no alteration in the hemolysis rate; however, at a higher concentration (30 μM), they increased hemolysis. In general, organotellurium compounds tend to be more nucleophilic than their corresponding selenium and sulfur derivatives (Wada et al., 1999). The order of reactivity (telluride > selenide) correlates with hemolytic potentials, because four of the compounds that caused hemolysis presented Te in their moiety (4, 8, 13 and 14), whereas the two analog selenium molecules (3 and 12) did not cause hemolysis.

The concentrations (100–200 μM) of organochalcogens used were relatively high. In fact, one of the objectives of this study was to determine whether exposure of human erythrocytes to high doses of organochalcogens could be used as an early step in screening for the potential toxicity of these compounds in vitro. Although these doses can be considered of supra-toxicological significance in vivo, they are of significance in vitro due to the relatively short periods of exposure (up to 48 h).

In addition, we investigated the effect of these compounds on lipid peroxidation in erythrocytes because the peroxidation of membrane lipids has been considered an important factor in hemolysis (Dumaswala et al., 1999; Niki et al., 1988). The oxidation of erythrocyte membranes induced by free radicals depends on the balance of anti- and pro-oxidant mechanisms. Here we determined TBARS as an indicator of lipid peroxidation (Stock and Dormandy, 1971), and only compounds 6 and 15 presented a pro-oxidant effect. The toxicity of selenite (C15) has been shown to be related to the oxidation of intracellular thiols, generating superoxide and other ROS (Spallholz, 1994; Kramer and Ames, 1988). Thus, it is possible that the pro-oxidant effects of these compounds are related to thiol depletion and free radical formation during thiol oxidation.

In this study, the effects of compounds 2, 4 and 8 varied depending on the presence of Ca²⁺ and Mg²⁺ in the incubation medium. Tellurium compounds 13 and 14 presented antioxidant activity, and this is in accordance with the results of other investigators who have found organotellurium to have antioxidative effects on lipid peroxidation (Anderson et al., 1994; Engman et al., 1995; Nogueira et al., 2004). However, the potency of these chalcogenides was quite different. In fact, compound 14 inhibited lipid

peroxidation with a concentration of 40 μM while compound 13 inhibited lipid peroxidation only at the high concentration of 200 μM . In spite of this, the possible potential therapeutic use of organotellurium compounds 13 and 14 should be investigated, since they presented a hemolytic effect. Furthermore, diphenyl ditelluride and other organotellurium compounds presented cytotoxic effects *in vitro* (Sailer et al., 2004; Iwase et al., 2004).

The present investigation showed that diphenyl ditelluride, diphenyltelluride, diorganotellurium dichloride, dinaphthalen ditelluride, sodium selenite and (*S*)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-phenylpropan-2-ylcarbamate were toxic to erythrocytes and that the organoselenium compounds were not hemolytic to erythrocytes even when tested at high concentrations. The hemolytic effect of the organotellurium compounds did not correlate positively with TBARS production. Possibly, lipid peroxidation is not involved in the hemolysis provoked by organotellurium compounds. In a similar way, dehydroepiandrosterone induced the lysis of human red blood cells and did not induce lipid peroxidation *in vitro* (Hu et al., 1997). In conclusion, our results suggest that chalcogen compounds were toxic to human erythrocytes, but further studies are needed to elucidate the molecular mechanism responsible for the effects produced by these compounds.

References

- Anderson, C.M., Brattsand, R., Hallberg, A.R., Engman, L., Persson, J., Moldéus, P., Cotgreave, I., 1994. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Radical Research* 20, 401–410.
- Bosí, S., Feruglio, L., Da Ros, T., Spalluto, G., Gregoret, B., Terdoslavich, M., Decorti, G., Passamonti, S., Moro, S., Prato, M., 2004. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 6711–6715.
- Braga, A.L., Paixão, M.W., Ludtke, D.S., Silveira, C.C., Rodrigues, O.E.D., 2003a. Synthesis of new chiral aliphatic amino diselenides and their application as catalysts for the enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes. *Organic Letters* 5, 2635–2638.
- Braga, A.L., Ludtke, D.S., Vargas, F., Donato, R.K., Silveira, C.C., Stefani, M.A., Zeni, G., 2003b. Sonogashira cross-coupling reaction of organotellurium dichlorides with terminal alkynes. *Tetrahedron Letters* 44, 1779–1781.
- Braga, A.L., Ludtke, D.S., Sehnem, J.A., Alberto, E.E., 2005. Modular chiral selenium-containing oxazolines: synthesis and application in the palladium-catalyzed asymmetric allylic alkylation. *Tetrahedron* 61, 11664–11671.
- Brandão, R., Lara, F.S., Pagliosa, L.B., Soares, F.A., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Farina, M., 2005. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. *Drug and Chemical Toxicology* 28, 397–407.
- Chasteen, T.G., Bentley, R., 2003. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chemical Reviews* 103, 1–25.
- Clemens, M.R., Wailer, H.D., 1987. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids* 45, 251–268.
- Devasena, T., Lalitha, S., Padma, K., 2001. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Clinica Chimica Acta* 308, 155–161.
- Dumaswala, U.J., Zhuo, L., Jacobsen, D.W., Jain, S.K., Sukalski, K.A., 1999. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 1041–1049.
- Eisele, K., Lang, P.A., Kempe, D.S., Klarl, B.A., Niemoller, O., Wieder, T., Huber, S.M., Duranton, C., Lang, F., 2006. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicology and Applied Pharmacology* 210, 116–122.
- El-Bayoumy, K., Sinha, R., 2004. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutation Research* 551, 181–197.
- El-Missiry, M.A., Abou-Seif, M., 2000. Photosensitization induced reactive oxygen species and oxidative damage in human erythrocytes. *Cancer Letters* 158, 155–163.
- Engman, L., Persson, J., Vessman, T.K., Ekstrom, M., Berglund, M., Andersson, C.-M., 1995. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Radical Biology and Medicine* 19, 441–452.
- Engman, L., Stern, D., Stenberg, B., 1996. Organotellurium compounds as stabilizers for polymeric materials. *Journal of Applied Polymer Science* 59, 1365–1370.
- Fairhill, L.T., 1969. Tellurium, *Industrial Toxicology*. Hafner Publishing Co, New York, p. 120.
- Favero, A.M., Weis, S.N., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reproductive Toxicology* 20, 561–568.
- Hu, M.-L., Ng, H.P., Shih, M.-K., 1997. Hemolytic effects of dehydroepiandrosterone *in vitro*. *Life Sciences* 61, 2137–2142.
- Iwase, K., Tatsuishi, T., Nishimura, Y., Yamaguchi, J.Y., Oyama, Y., Miyoshi, N., Wada, M., 2004. Cytometric analysis of adverse action of diphenyl ditelluride on rat thymocytes: cell shrinkage as a cytotoxic parameter. *Environmental Toxicology* 19, 614–619.
- Kanski, J., Drake, J., Aksenova, M., Engman, L., Butterfield, D.A., 2001. Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(*N,N*-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Research* 9, 12–21.
- Kodak, E., USA assignee., 1989. Cyclic dichalcogenide fog inhibitor for silver halide photographic material. US Patent 4861703, Washington, DC.
- Kramer, G.F., Ames, B.N., 1988. Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na_2SeO_3) in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research* 201, 169–180.
- Kron, T., Wittmaack, K., Hansen, C., Werner, E., 1991. Stable isotopes for determining biokinetic parameters of tellurium in rabbits. *Analytical Chemistry* 63, 2603–2607.
- Lexis, L.A., Fassett, R.G., Coombes, J.S., 2006. α -Tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A-treated rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 98, 68–73.
- Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environmental Research* 94, 276–282.
- Muñoz-Castañeda, J.R., Muntané, J., Muñoz, M.C., Bujalance, I., Montilla, P., Tunes, I., 2006. Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. *Toxicology Letters* 160, 196–203.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Takahashi, M., Yamamoto, K., Komuro, E., Miki, M., Yasuda, H., Mino, M., 1988. Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 34, 507–512.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., Sato, K., 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition* 53, S201–S205.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews* 104, 6255–6285.
- Painter, E.P., 1941. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. *Chemical Reviews*, 179–213.
- Paulmier, C., 1986. *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*. Pergamon, Oxford, pp. 25–51.

- Petraghani, N., 1994. Tellurium in Organic Synthesis. Academic Press, London, pp. 9–88.
- Rosa, R.M., Flores, D.G., Appelt, H.R., Braga, A.L., Henriques, J.A.P., Roesler, R., 2003. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neuroscience Letters* 341, 217–220.
- Rosa, R.M., Sulzbacher, K., Picada, J.N., Roesler, R., Saffi, J., Brendel, M., Henriques, J.A.P., 2004. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutation Research* 563, 107–115.
- Rosa, R.M., Oliveira, R.B., Saffi, J., Braga, A.L., Roesler, R., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., Brendel, M., Henriques, J.A.P., 2005. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sciences* 77, 2398–2411.
- Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Summers, S., Chasteen, T.G., 2004. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicology in Vitro* 18, 475–482.
- Spallholz, J.E., 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine* 17, 45–64.
- Stangherlin, E.C., Favero, A.M., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 207, 231–239.
- Stock, J., Dormandy, T.L., 1971. Autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *British Journal of Haematology* 20, 95–111.
- Taylor, A., 1996. Biochemistry of tellurium. *Biological Trace Element Research* 55, 231–239.
- Tiano, L., Fedeli, D., Santroni, A.M., Villarini, M., Engman, L., Falcioni, G., 2000. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Mutation Research* 464, 269–277.
- Wada, M., Nobuki, S., Tenkyuu, Y., Natsume, S., Asahara, M., Erabi, T., 1999. Bis(2,6-dimethoxyphenyl)sulfide, selenide and telluride, and their derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry* 580, 282–289.
- Wieslander, E., Engman, L., Svensjo, E., Erlansson, M., Johansson, U., Linden, M., Andersson, C.-M., Brattsand, R., 1998. Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems. *Biochemical Pharmacology* 55, 573–584.
- Yamaguchi, H., Hosoya, N., Kobayashi, K., Yokota, T., Arai, T., Nakamura, J., Cox, C.F., 2001. The influence of two concentrations of sodium hypochlorite on human blood: changes in haemolysis, pH and protein. *International Endodontic Journal* 34, 231–236.
- Zeni, G., Nogueira, C.W., Panatieri, R.B., Silva, D.O., Menezes, P.H., Braga, A.L., Silveira, C.C., Stefani, H.A., Rocha, J.B.T., 2001a. Synthesis and anti-inflammatory activity of acetylenic thiophenes. *Tetrahedron Letters* 42, 7921–7923.
- Zeni, G., Ludtke, D.S., Nogueira, C.W., Panatieri, R.B., Braga, A.L., Silveira, C.C., Stefani, H.A., Rocha, J.B.T., 2001b. New acetylenic furan derivatives: synthesis and anti-inflammatory activity. *Tetrahedron Letters* 42, 8927–8930.

4.2 – ARTIGOS CIENTÍFICOS: CAPÍTULO 2

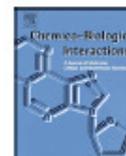
4.2.1 – artigo 2

HEMÓLISE ERITROCITÁRIA HUMANA INDUZIDA POR COMPOSTOS DE SELÊNIO E TELÚRIO É AUMENTADA POR GSH OU GLICOSE: UM POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

HUMAN ERYTHROCYTE HEMOLYSIS INDUCED BY SELENIUM AND TELLURIUM COMPOUNDS INCREASED BY GSH OR GLUCOSE: A POSSIBLE INVOLVEMENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES

VIVIANE PATRÍCIA P. SCHIAR, DANÚBIA B. DOS SANTOS, MÁRCIO W. PAIXÃO,
CRISTINA W. NOGUEIRA, JOÃO BATISTA T. ROCHA, GILSON ZENI.

Chemico-Biological Interactions 177 (2009) 28–33.



Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: A possible involvement of reactive oxygen species

Viviane Patrícia P. Schiar*, Danúbia B. dos Santos, Márcio W. Paixão, Cristina Wayne Nogueira, João Batista T. Rocha, Gilson Zeni

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2008

Received in revised form 3 October 2008

Accepted 3 October 2008

Available online 15 October 2008

Keywords:

Selenium

Tellurium

Hemolysis

GSH

Glucose

Oxidation

ABSTRACT

Oxidative stress can induce complex alterations of membrane proteins in red blood cells (RBCs) eventually leading to hemolysis. RBCs represent a good model to investigate the damage induced by oxidizing agents. Literature data have reported that chalcogen compounds can present pro-oxidant properties with potent inhibitory effects on cell growth, causing tissue damage and inhibit a variety of enzymes. In this study, human erythrocytes were incubated *in vitro* with various chalcogen compounds at 37 °C: diphenyl ditelluride (1), dinaphthalen ditelluride (2), diphenyl diselenide (3), (S)-tert-butyl 1-diselenide-3-methylbutan-2-ylcarbamate (4), (S)-tert-butyl 1-diselenide-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (5), selenium dioxide (6) and sodium selenite (7) in order to investigate their potential *in vitro* toxicity. After 6 h of incubation, all the tested compounds increased the hemolysis rate, when compared to control and compound (2) had the most potent hemolytic effect. The addition of reduced glutathione (GSH) or glucose to the incubation medium enhanced hemolysis caused by chalcogen compounds. The thiol oxidase activity of these compounds was evaluated by measuring the rate of cysteine (CYS) and dithiotreitol (DTT) oxidation. DTT and cysteine oxidation was increased by all the compounds tested. The results suggest a relationship between the oxidation of intracellular GSH and subsequent generation of free radicals with the hemolysis by chalcogen compounds.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The importance of the occupational exposure to tellurium (Te) and selenium (Se) has been growing rapidly. They enter into the environment of the man mainly due to their increasing usage in industry and agriculture [1]. Tellurium is used particularly in semiconductor device fabrication [2]. In addition to these applications, much attention has been devoted to the synthesis of organoselenium and tellurium compounds that could be used as enzyme mimics and chemotherapeutic agents [3–5].

It has been suggested that the redox activity of Se and Te atoms of organic compounds can provide antioxidant properties to organic compounds, which can be suitable as tools in free radical biology and medicine [6]. In fact, a variety of pharmacological properties has been described for organoselenium and organotellurium compounds as immunomodulating, antioxidant and anti-inflammatory agents [5,7–10]. Conversely, other studies have shown that at higher concentrations, Se compounds can become pro-oxidants instead of antioxidants, with potent inhibitory effects on cell growth, causing

tissue damage and resulting in Se toxicosis [11]. In part, this can be a consequence to their affinity for endogenous thiols, which can result in the depletion of reduced glutathione (GSH), an important intracellular antioxidant [11].

Of particular toxicological importance, reduced cysteinyl residues from proteins can react with diselenides and ditellurides, which can cause in the case of enzyme delta aminolevulinatase (δ -ALA-D) the loss of catalytic activity [12]. Some studies have reported that ebselen, a simple organoselenium compound, induces apoptosis in human hepatoma cell line, HepG2, and this effect seems to be related to its ability to deplete thiols [13]. Besides, an earlier study demonstrated that, in addition to its peroxidase-like activity, ebselen can indirectly deplete thiols through the direct oxidation of GSH by its selenoxide intermediate [14].

In a similar way to selenium compounds, tellurium compounds can interact with thiols and inhibit a variety of enzymes, including human squalene monooxygenase and Na⁺, K⁺-ATPase [15,16]. In addition, tellurium-containing compounds can displace selenium from selenium proteins [17]. Thus, inorganic tellurium can inhibit the activity of selenium dependent glutathione peroxidases, which can lead to an exacerbation of intracellular oxidative stress [17].

* Corresponding author. Tel.: +55 55 32208120; fax: +55 55 32208031.
E-mail address: vivianeschiar@pop.com.br (V.P.P. Schiar).

Erythrocytes are well equipped with several biological mechanisms to defend against intracellular oxidative stress [18], such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione transferase (GST). Despite their well-developed antioxidant defense system, erythrocytes can be oxidatively damaged, due to exposure to toxic chemicals and environmental pollutants [19,20]. The damage to the antioxidative system could be the cause of an altered steady state of ROS in the cell leading to an alteration at the level of cellular structures [19,21].

It is known that an imbalance in the oxidant/antioxidant status of the cell is associated with oxidative stress and this causes important modifications in cellular macromolecules (in membrane and in cytoplasm) leading to cell damage [19,22]. The resulting oxidation of membrane components is likely to play an important role in the hemolytic process but the mechanism is not yet clearly understood.

Literature data have indicated that inorganic selenium compounds induce erythrocyte hemolysis and this is dependent on the GSH level in the erythrocyte [23]. In fact, depletion of GSH before exposure to Se(IV) can protect erythrocytes from hemolysis. The mechanism(s) involved in this paradoxical synergic effect of GSH and Se(IV) are unknown but may be related to the formation of reactive oxygen species during the interaction between Se compounds and thiols [11,24]. Here, we used erythrocytes as a model to investigate a possible interaction between glutathione and Se- and Te-containing compounds, using the erythrocytes hemolysis as the toxicological end point. The results have indicated that GSH and glucose increased the toxicity of a variety of organic and inorganic compounds. For the case of organochalcogens, diselenides and ditellurides were selected, because previously we have demonstrated that diphenyl diselenide, the simplest of the diaryldichalcogenides, has interesting antioxidant and pharmacological properties. However, it can become toxic when administered at high doses to rodents [25]. In contrast, diphenyl ditelluride (though being an antioxidant *in vitro*) has been found to be very toxic after *in vivo* administration [26]. Thus, basically here were interested to know whether changes in the organic moiety of the dichalcogenides could change their thiol oxidase activity and their toxicity in a simple *in vitro* model. For the case of diselenides, we have also tested two derivatives (C4 and C5) from the natural amino acids valine and phenylalanine because we realize that they, in view of their analogy to endogenous compounds, could be of some pharmacological value.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The formulas of the investigated compounds are shown in Fig. 1. All compounds were prepared according to published procedures 1 and 2 [27], 3 [28], 4 and 5 [29]. The compounds 6 and 7 were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) (Fig. 1). The compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), except compound 7 that was dissolved in phosphate buffered saline (PBS, 6.1 mM and pH 7.4, containing 150 mM NaCl). The hemolytic effects of all the compounds tested were not related to the vehicle used since neither DMSO nor PBS induced hemolysis when compared with the control (NaCl 0.9%) (data not shown). DMSO, DTT, CYS and GSH were obtained from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical reagent grade and purchased from Merck (Rio de Janeiro, Brazil).

2.2. Sample

Cells used in this study were obtained from healthy volunteer donors from the University Hospital of Santa Maria, RS, Brazil (age 30 ± 10). Venous blood was collected into heparinized tubes. Erythrocytes (RBCs) were separated by centrifugation (2000 rpm for 10 min at room temperature) and the plasma was aspirated. The protocol study was reviewed and approved by the appropriate institutional review board from Guidelines of the Committee of UFSM.

2.3. Lysis experiments

The cell pellet was washed three times with a medium containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 2 mM $MgCl_2$ and 0.1 mM EDTA. RBCs were suspended in the same medium used in the erythrocyte washing and diluted to a hematocrit of 1%. Cell lysis was measured at 37 °C in a medium containing 0, 100 or 200 μM of chalcogenides ($n=4$) after different periods of incubation:

(a) Up to 6 h (1, 2, 3, 4, 5 and 6 h): The value of HT_{50} (the time at which 50% of the cells were haemolysed, in min) was calculated for each day of the experiment.

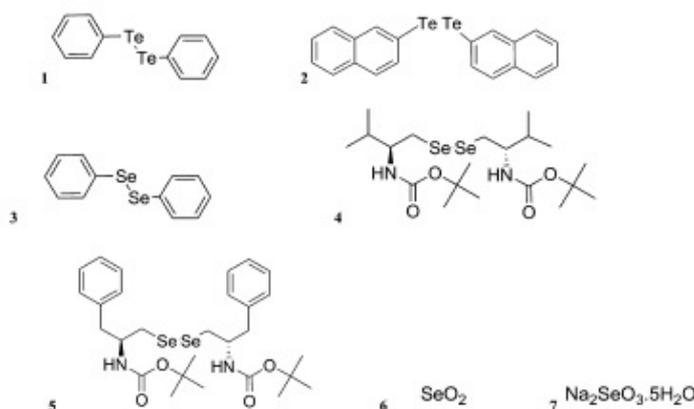


Fig. 1. The formulas of the investigated compounds.

- (b) Up to 2 h (30, 60, 90 and 120 min): In the absence or presence of 5 mM of glucose,
- (c) In 30 min: In the absence or presence of 0.5 mM of GSH.

Incubations were stopped by centrifugation (2000 rpm for 40 s at room temperature). The degree of cell lysis was determined according to Young et al. [23] by measuring the extinction of the supernatant at 540 nm. Complete lysis was determined by addition of Triton X-100 (0.01%).

2.4. Rate of DTT oxidation

Dithiotreitol (DTT) oxidation was determined at 37 °C in the presence of 50 mM Tris-Cl, pH 7.4 and 100 µM of compounds. The rate of thiol oxidation was evaluated by measuring the disappearance of SH groups according to Ellman [30]. Oxidation was initiated by the addition of the DTT to a final concentration of 1.0 mM to a medium containing potassium phosphate buffer (100 mM).

2.5. Rate of CYS oxidation

CYS oxidation was evaluated by measuring the disappearance of SH groups by the method of Chinard and Hellerman [31]. Color reaction was initiated by adding 200 µL of CYS (final concentration 2 mM) to a medium containing potassium phosphate buffer (100 mM), chalcogens (100 µM), saturated solution of ammonium sulfate in KCN (43 mM), sodium nitroprusside (6.48 mM) and concentrated ammonium hydroxide. Aliquots of 250 µL after incubation with compounds 3, 4, 5, 7, 8 were sampled at different times (0, 15, 30 and 60 min) to determine the amount of SH groups at 546 nm.

2.6. Statistical analysis

Complete hemolysis of the RBC suspension occurred in the Triton X-100 (0.01%) solution, in which hemoglobin concentration was defined as 100%. The time to observe 50% of maximal haemolysis (HT₅₀) or the time at which 50% of the CYS and DTT (OxiT₅₀) was calculated for each day of the experiment.

All values obtained are expressed as mean ± S.E.M. Data were analyzed by one-way or two-way ANOVA/MANOVA analyses of variance followed by SNK test when appropriate. Differences between groups were considered to be significant when *p* < 0.05.

3. Results

The lysis experiment showed that the C2 (dinaphthalen ditelluride) was the most potent hemolytic compound tested, whereas compounds C1 (diphenyl ditelluride), C5 [(S)-tert-butyl 1-diselenide-3-phenylpropan-2-ylcarbamate] and C6 (selenium dioxide) presented lesser hemolytic effect (HT₅₀ values were higher than 360 min) (Table 1). After 6 h of incubation, all the tested compounds increased the hemolysis rate, when compared to control cells. The % of hemolysis after 6 h of incubation in the presence of 100 µM of compounds indicated the following hemolytic potency: 2 > 3 > 4 > 7 > 1 > 5 > 6. In the presence of 200 µM the hemolytic potency was 2 > 3 > 7 > 4 > 1 > 5 > 6 (Table 2).

Table 3 shows that GSH increased the haemolysis caused by the compounds 6, 7 (*p* < 0.001), 2, 4 (*p* < 0.01) and 1, 3, 5 (*p* < 0.05). The increase in hemolysis observed in the absence of chalcogens (controls with/without GSH) was not statistically significant (*p* > 0.10).

Glucose caused a significant increase on hemolysis induced by the compounds 2–5 (100 and 200 µM) and compounds 1 and 7 (200 µM) in 120 min (*p* < 0.05; Fig. 2). In Table 4 it was

Table 1
The erythrocyte haemolysis in different compounds expressed as the time for 50% of maximal haemolysis (HT₅₀ in min).

Compounds	0	100 µM	200 µM
Control	> 360		
C1		>360	333.7 ± 2.4 ^a
C2		244.7 ± 1.9 ^a	197.5 ± 5.1 ^b
C3		308.2 ± 6.5 ^a	272.8 ± 0.8 ^c
C4		333.7 ± 5.6 ^c	330.8 ± 4.1 ^a
C5		>360	350.7 ± 3.6 ^a
C6		>360	>360
C7		354.7 ± 1.9 ^b	334.3 ± 1.7 ^a

Letters (A–D) represent difference between compounds in the concentration of 100 µM. Letters (a–d) represent difference between compounds in the concentration of 200 µM.

^a Significant difference of control, *p* < 0.05 (mean ± S.E.M., *n* = 6).

Table 2
Erythrocyte hemolysis caused by Se and Te compounds after 6h of the incubation.

Compounds	0	100 µM	200 µM
Control	12.3 ± 0.6		
C1		45.1 ± 0.7 ^A	61.8 ± 1.0 ^a
C2		80.0 ± 1.5 ^B	94.3 ± 0.7 ^b
C3		61.5 ± 1.5 ^C	71.5 ± 1.0 ^c
C4		56.0 ± 2.0 ^D	61.5 ± 0.9 ^a
C5		39.0 ± 0.8 ^A	49.0 ± 1.3 ^a
C6		17.7 ± 0.7 ^F	18.7 ± 0.5 ^a
C7		51.2 ± 1.1 ^C	64.7 ± 1.3 ^a

Data are % of haemolysis in relation to 100% haemolysis determined in the presence of Triton X-100 (0.01%) (mean ± S.E.M., *n* = 6). Letters (A–G) represent difference between compounds in the concentration of 100 µM, *p* < 0.05. Letters (a–e) represent difference between compounds in the concentration of 200 µM, *p* < 0.05.

^a Significant difference of control, *p* < 0.001.

possible to verify that the glucose caused increased on hemolysis induced by compounds 5 and 7 in the concentration of 200 µM in 90 min of incubation of erythrocytes with Se and Te compounds.

DTT (*p* < 0.001) and cysteine (CYS) (*p* < 0.001) oxidations were increased by all the compounds tested (Table 5). The potency of oxidation for DTT was in the order 7 > 6 > 1 > 2 > 4 > 3 > 5, and for CYS the potency of oxidation was in the order 6 > 5 > 7 > 2 > 1 > 3 > 4. The oxidation varied along the time (Figs. 3 and 4).

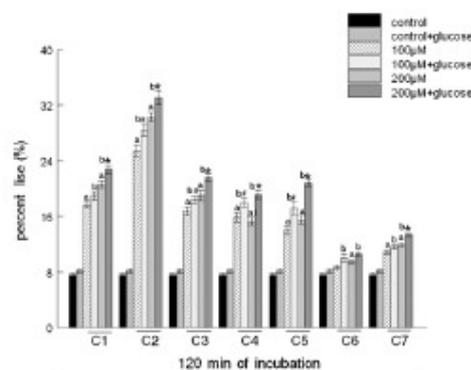


Fig. 2. Influence of glucose on the hemolytic effect of chalcogens compounds. ^aSignificant difference of control, *p* < 0.05. ^bSignificant difference of control + glucose, *p* < 0.05. ^cSignificant difference of 100 µM, *p* < 0.05. ^dSignificant difference of 200 µM, *p* < 0.05.

Table 3
Influence of GSH on the hemolytic effect of chalcogens compounds.

Compounds	0	GSH	100 μ M	100 μ M + GSH	% (after GSH)
Control	3.9 \pm 0.2	4.4 \pm 0.4			112.8
C1			6.8 \pm 0.2 ^a	9.8 \pm 0.5 ^{a,b}	144.1
C2			11.3 \pm 0.3 ^a	15.3 \pm 0.6 ^{a,b}	135.4
C3			7.2 \pm 0.3 ^a	10.9 \pm 0.4 ^{a,b}	151.4
C4			8.8 \pm 0.3 ^a	11.7 \pm 0.6 ^{a,b}	132.9
C5			7.6 \pm 0.3 ^a	13.1 \pm 0.2 ^{a,b}	172.4
C6			6.8 \pm 0.2 ^a	10.1 \pm 0.6 ^{a,b}	148.5
C7			7.3 \pm 0.3 ^a	24.7 \pm 0.7 ^{a,b}	338.3

Erythrocytes were incubated for 30 min at 37 °C in the absence or presence of 0.5 mM GSH. Data are % of haemolysis in relation to 100% haemolysis determined in the presence of Triton X-100 (0.01%) (mean \pm S.E.M., n = 6).

^a Different from control, $p < 0.05$.

^b Difference of haemolysis caused by compounds in the absence or presence of GSH, $p < 0.05$.

Table 4
Influence of glucose on the hemolytic effect of chalcogens compounds.

Compounds	30 min		60 min		90 min	
	Without glucose	With glucose	Without glucose	With glucose	Without glucose	With glucose
Control	4.2 \pm 0.4	5.3 \pm 0.6	4.5 \pm 0.4	5.6 \pm 0.6	5.9 \pm 0.3	7.1 \pm 0.6
C1						
100 μ M	6.1 \pm 0.2 ^a	6.5 \pm 0.4	9.2 \pm 0.2 ^a	9.5 \pm 0.4 ^a	11.9 \pm 0.6 ^a	12.3 \pm 0.7 ^a
200 μ M	7.5 \pm 0.3 ^a	7.2 \pm 0.3 ^a	11.0 \pm 0.3 ^a	11.3 \pm 0.4 ^a	13.4 \pm 0.5 ^a	14.1 \pm 0.5 ^a
C2						
100 μ M	14.2 \pm 0.6 ^a	14.5 \pm 0.6 ^a	20.3 \pm 1.0 ^a	20.7 \pm 0.9 ^a	21.9 \pm 0.7 ^a	23.8 \pm 1.2 ^a
200 μ M	17.2 \pm 0.6 ^a	18.1 \pm 0.6 ^a	24.5 \pm 0.9 ^a	25.2 \pm 0.9 ^a	26.7 \pm 0.6 ^a	28.2 \pm 0.8 ^a
C3						
100 μ M	8.1 \pm 0.5 ^a	9.6 \pm 0.5 ^a	12.0 \pm 0.6 ^a	13.3 \pm 0.9 ^a	14.8 \pm 0.5 ^a	13.6 \pm 0.8 ^a
200 μ M	9.7 \pm 0.9 ^a	11.7 \pm 1.1 ^a	13.2 \pm 0.8 ^a	15.5 \pm 0.6 ^a	16.3 \pm 0.6 ^a	15.8 \pm 0.5 ^a
C4						
100 μ M	8.9 \pm 0.8 ^a	9.7 \pm 0.5 ^a	12.9 \pm 0.7 ^a	13.3 \pm 0.9 ^a	13.3 \pm 0.7 ^a	13.6 \pm 0.8 ^a
200 μ M	11.5 \pm 0.4 ^a	12.8 \pm 0.4 ^a	14.1 \pm 0.7 ^a	15.4 \pm 0.6 ^a	14.3 \pm 0.8 ^a	15.6 \pm 0.5 ^a
C5						
100 μ M	6.6 \pm 0.3 ^a	7.1 \pm 0.3 ^a	8.8 \pm 0.3 ^a	9.2 \pm 0.4 ^a	11.5 \pm 0.6 ^a	12.9 \pm 0.6 ^a
200 μ M	6.7 \pm 0.3 ^a	8.0 \pm 0.3 ^a	8.7 \pm 0.4	9.7 \pm 0.6 ^a	11.4 \pm 0.5 ^a	14.3 \pm 0.6 ^{a,b}
C6						
100 μ M	6.4 \pm 0.3 ^a	6.1 \pm 0.4	7.2 \pm 0.3 ^a	8.5 \pm 0.3 ^a	7.8 \pm 0.3 ^a	9.1 \pm 0.5 ^a
200 μ M	6.3 \pm 0.3 ^a	6.6 \pm 0.4	7.9 \pm 0.4 ^a	8.3 \pm 0.4 ^a	8.6 \pm 0.3 ^a	9.5 \pm 0.2 ^a
C7						
100 μ M	6.4 \pm 0.5 ^a	6.9 \pm 0.3 ^a	7.6 \pm 0.4 ^a	7.9 \pm 0.3 ^a	8.6 \pm 0.3 ^a	9.3 \pm 0.4 ^a
200 μ M	6.7 \pm 0.4 ^a	7.1 \pm 0.3 ^a	7.8 \pm 0.4 ^a	8.0 \pm 0.5 ^a	9.1 \pm 0.4 ^a	10.7 \pm 0.5 ^{a,b}

Erythrocytes were incubated at 37 °C in the absence or presence of 5 mM glucose. Data are % of haemolysis in relation to 100% haemolysis determined in the presence of Triton X-100 (0.01%) (mean \pm S.E.M., n = 6).

^a Different from control, $p < 0.05$.

^b Difference of haemolysis caused by compounds in the absence or presence of glucose, $p < 0.05$.

Table 5
Chalcogen-induced DTT and cysteine oxidation.

Compounds	OxiT ₅₀ (mean \pm S.E.M.)		
	DTT or Cys	DTT	Cys
Control	>60		
C1		8.2 \pm 0.6 ^a	37.3 \pm 3.6 ^{a,d}
C2		10.8 \pm 0.5 ^{a,b}	34.3 \pm 2.2 ^{a,d}
C3		19.4 \pm 0.7 ^{a,d}	38.9 \pm 1.0 ^{a,d}
C4		16.4 \pm 1.0 ^{a,c}	53.0 \pm 0.8 ^{a,e}
C5		27.8 \pm 1.6 ^{a,e}	15.6 \pm 0.5 ^b
C6		6.9 \pm 0.3 ^a	10.1 \pm 0.3 ^a
C7		7.5 \pm 0.1 ^a	24.7 \pm 0.5 ^{a,c}

Oxidation is expressed as the time required for 50% of maximal oxidation (OxiT₅₀ in min), to compounds in the tested concentration (100 μ M). Data are reported as mean \pm S.E.M., n = 6. Letters (A–E) represent difference between the potency of oxidation of the compounds for DTT. Letters (a–e) represent difference between the potency of oxidation of the compounds for CYS.

^a Different from control, $p < 0.05$.

4. Discussion

This study investigated the toxicity of chalcogen compounds *in vitro* on human erythrocytes, with hemolytic potential to human hematocrit of 1%. In a previous work, we demonstrated that tellurium compounds induced the lysis to human erythrocytes [32]. HT₅₀ values for chalcogen-induced hemolysis demonstrated that the value for induced lysis in control erythrocytes is found to be larger than 6 h. Compounds **2** and **3** showed higher hemolytic effect since they presented 50% of hemolysis in lesser time respectively, whereas the inorganic compound **6** presented lesser effect (Tables 1 and 2).

The thiol oxidase activity of organic compounds could explain the *in vitro* hemolytic properties of these compounds [33]. The production of superoxide and hydrogen peroxide as a consequence of thiol oxidation could explain the hemolytic effect of chalcogen compounds. Accordingly, we realized that the first step in Fig. 5 involves the reaction of thiol with diorganoyl compounds, such as

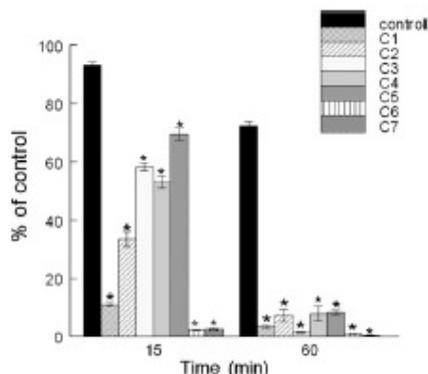


Fig. 3. Effects of chalcogens compounds (100 μ M) on the rate of DTT oxidation. The rate of oxidation was evaluated at different times (15 and 60 min). Data are the means \pm S.E.M. of six independent experiments. *Significant difference of control, $p < 0.05$.

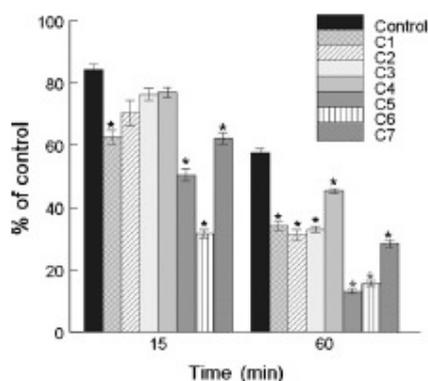


Fig. 4. Effects of chalcogens compounds (100 μ M) on the rate of CYS oxidation. The rate of oxidation was evaluated at different times (15 and 60 min). Data are the means of six independent experiments. *Significant difference of control, $p < 0.05$.

compounds 1–5, to give an unstable intermediate of the type RSe-SG. This catalytic mechanism produces superoxide as a one-step electron transfer from RSe⁻ to dioxygen [9].

Nogueira et al. demonstrated that diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen inhibit the enzyme δ -ALA-D from human

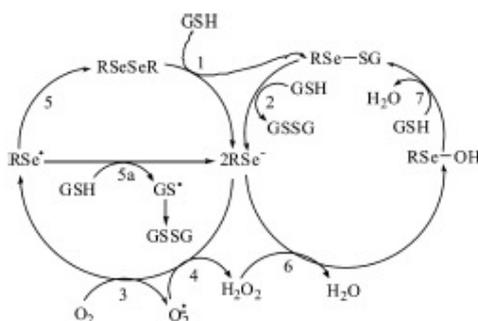


Fig. 5. Redox cycle of selenenyls (RSe⁻) generation superoxide.

blood by interacting with cysteinyl residues (sulfhydryl groups), which are important for enzyme activity [34].

Accordingly, we also suggest that the toxicity caused by inorganic compounds (6 and 7) was related with the oxidation of thiol endogenous and the generation of free radicals. Seko et al. in 1989 reported that selenite reacted with GSH to produce the superoxide anion (O₂⁻) [24], as well as Davis and Spallholz have proposed mechanisms to account for the induction of apoptosis by selenite, suggesting that Se-induced apoptosis is caused by the generation of free radical oxidative stress by the oxidation of cellular glutathione [35].

Some reports have suggested that the anticarcinogenic property of selenium compounds is likely due to the known toxicity of selenium compounds found in animals and humans [11,36]. This property could be related to thiol group oxidation [37].

We added GSH in medium with compounds and observed an increase in the hemolysis caused by compounds tested by us (Table 3). In agreement, Spallholz in 1994 added GSH exogenously in erythrocytes in the presence of catalytic selenium compounds, selenite and selenium dioxide, which dramatically increased the rate of hemolysis [36]. Another study has showed that both selenite and tellurite cause erythrocyte lysis *in vitro*, where lysis was preceded by a drop in intracellular GSH concentration and the addition of extracellular GSH to GSH-deficient erythrocytes resulted in rapid lysis when tellurite or selenite were also present [23].

The addition of glucose in medium increased the hemolytic effect caused by compounds 2, 3, 4, 5 and 7 (Fig. 2 and Table 4). This effect can be related with the fact that the glucose maintains GSH levels in RBCs through the oxidative pentose phosphate pathway and GSH redox cycle [38,39].

A study has shown that neuronal effects of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride may occur through a change in the thiol-disulfide balance of glutamatergic receptors suggesting that the toxicological properties of these compounds are related to the oxidation of -SH groups on glutamate receptors and diphenyl ditelluride could oxidize some cysteinyl residues, inhibiting glutamate binding *in vitro* and *in vivo* in rats [40].

Compatible with the suggestion that the toxicological properties of chalcogenides are related to the oxidation of -SH groups, we worked with the oxidation of DTT and CYS by compounds (Table 5, Figs. 3 and 4), where it was possible to confirm that these chalcogens are capable of oxidizing -SH groups. Maciel et al. have shown that GSH and other thiols (such as DTT) could be oxidized by diphenyl diselenide, and that acute and 2 week exposures to diphenyl diselenide caused a decrease in the hepatic and renal content of non-protein-SH [26]. Another work suggested that the diphenyl diselenide induced pro-oxidant effect in yeast is a direct result of GSH depletion [41].

In conclusion, these results suggest that the generation of free radicals by chalcogen compounds through oxidation of thiol endogenous induces hemolysis *in vitro* in human erythrocytes. Further studies need to be pursued in direction of elucidating the molecular mechanism responsible for the effects produced by these compounds.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We wish to thank the UFSM, FAPERGS, CAPES and CNPq for financial support.

References

- [1] T.G. Chasteen, R. Bentley, Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants, *Chem. Rev.* 103 (2003) 1–25.
- [2] H.J. Einbrodt, S. Michels, in: E. Merian (Ed.), *Metalle in der Umwelt*, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 561–569.
- [3] T. Kanda, L. Engman, I.A. Cotgreave, G. Powis, Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 8161–8169.
- [4] G. Mughesh, H.B. Singh, Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity, *Chem. Soc. Rev.* 29 (2000) 347–357.
- [5] G. Mughesh, W.-W. du Mont, H. Sies, Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2125–2179.
- [6] M.J. Parnham, E. Graf, *Pharmacology of synthetic organic selenium compounds*, *Prog. Drug Res.* 36 (1991) 10–47.
- [7] L. Engman, J. Persson, K. Vessman, M. Ekstrom, M. Berglund, C.M. Andersson, Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 441–452.
- [8] L.O. Klotz, H. Sies, Defenses against peroxyinitrite: selenocompounds and flavonoids, *Toxicol. Lett.* 140–141 (2003) 125–132.
- [9] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6255–6285.
- [10] A. Nyska, T. Waner, M. Pirak, M. Albeck, B. Sredni, Toxicity study in rats of a tellurium based immunomodulating drug, AS-101: a potential drug for AIDS and cancer patients, *Arch. Toxicol.* 63 (1989) 386–393.
- [11] J.E. Spallholz, Free radical generation by selenium compounds and their pro-oxidant toxicity, *Biomed. Environ. Sci.* 10 (1997) 260–270.
- [12] N.B.V. Barbosa, J.B.T. Rocha, G. Zeni, T. Emanuelli, M.C. Beque, A.L. Braga, Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149 (1998) 243–253.
- [13] C.F. Yang, H.M. Shen, C.N. Ong, Ebselen induces apoptosis in HepG2 cells through rapid depletion of intracellular thiols, *Arch. Biochem. Biophys.* 374 (2000) 142–152.
- [14] T.P.M. Akerboom, H. Sies, D.M. Ziegler, The oxidation of ebselen metabolites to thiol oxidants catalyzed by liver-microsomes and perfused-rat-liver, *Arch. Biochem. Biophys.* 316 (1995) 220–226.
- [15] V.C. Borges, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na^+ , K^+ -ATPase activity in rats, *Toxicology* 215 (2005) 19–197.
- [16] B.P. Laden, T.D. Porter, Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls, *J. Lip. Res.* 42 (2001) 235–240.
- [17] P. Garberg, L. Engman, V. Tolmachev, H. Lundqvist, R.G. Gerdes, I.A. Cotgreave, Binding of tellurium to hepatocellular selenoproteins during incubation with inorganic tellurite: consequences for the activity of selenium-dependent glutathione peroxidase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 291–301.
- [18] A. Stern, Red cell oxidative damage, in: H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress*, Academic Press, New York, 1985, pp. 331–349.
- [19] A.V. Domanski, E.A. Lapshina, I.B. Zavodnik, Oxidative processes induced by *tert*-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies, *Biochemistry (Moscow)* 70 (2005) 761–769.
- [20] U. Tinggi, Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review, *Toxicol. Lett.* 137 (2003) 103–110.
- [21] S. Watanabe, S.-I. Togashi, T. Fukui, Contribution of nitric oxide to potassium bromate-induced elevation of methaemoglobin concentration in mouse blood, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 1315–1319.
- [22] T. Devasena, S. Lalitha, K. Padma, Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis, *Clin. Chim. Acta* 308 (2001) 155–161.
- [23] J.D. Young, C. Crowley, E.M. Tucker, Haemolysis of normal and glutathione-deficient sheep erythrocytes by selenite and tellurite, *Biochem. Pharmacol.* 30 (1981) 2527–2530.
- [24] Y. Seko, Y. Saito, J. Kitahara, N. Imura, Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro, in: *Selenium in Biology and Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, 1989, pp. 70–73.
- [25] E.N. Maciel, E.M.M. Flores, J.B.T. Rocha, V. Folmer, Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70 (2003) 470–476.
- [26] E.N. Maciel, R.C. Bolzan, A.L. Braga, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14 (2000) 310–319.
- [27] N. Petragnani, Preparation of the principal classes of organic tellurium compounds, in: *Tellurium in Organic Synthesis*, Academic Press, London, 1994, pp. 9–88.
- [28] C. Paulmier, Selenoorganic functional groups, in: C. Paulmier (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, Pergamon Press, Oxford, England, 1986, pp. 25–51.
- [29] A.L. Braga, M.W. Paixão, D.S. Lüdtkke, C.C. Silveira, O.E.D. Rodrigues, Synthesis of new chiral aliphatic amino diselenides and their application as catalysts for the enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes, *Org. Lett.* 5 (2003) 2635–2638.
- [30] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [31] F.P. Chinard, L. Hellerman, Determination of sulfhydryl groups in certain biological substances, in: D. Glick (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis*, Interscience, New York, USA, 1954, pp. 1–26.
- [32] V.P.P. Schiar, D.B. Santos, D.S. Lüdtkke, F. Vargas, M.W. Paixão, C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes, *Toxicol. in Vitro* 21 (2007) 139–145.
- [33] M.L. Hu, J.E. Spallholz, In vitro hemolysis of rat erythrocytes by selenium compounds, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1982) 957–961.
- [34] C.W. Nogueira, V.C. Borges, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organochalcogens effects on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro, *Toxicology* 191 (2003) 169–178.
- [35] R.L. Davis, J.E. Spallholz, Inhibition of selenite-catalyzed superoxide generation and formation of elemental selenium (Se^0) by copper, zinc, and aurotricarboxylic acid (ATA), *Biochem. Pharmacol.* 51 (1996) 1015–1020.
- [36] J.E. Spallholz, On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity, *Free Radic. Biol. Med.* 17 (1994) 45–64.
- [37] J.E. Spallholz, B.J. Shriver, T.W. Reid, Dimethyldiselenide and methylselenide acid generates superoxide in an in vitro chemiluminescence assay in the presence of glutathione: implications for the anticarcinogenic activity of l-selenomethionine and l-Se-methylselenocysteine, *Nutr. Cancer* 40 (2001) 34–41.
- [38] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon, Oxford, 1989, pp. 28–30.
- [39] J.T. Rotruck, W.G. Hoekstra, H.E. Ganther, A.L. Pope, Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium, *J. Nutr.* 102 (1972) 689–695.
- [40] C.W. Nogueira, L.N. Rotta, M.L. Perry, D.O. Souza, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo, *Brain Res.* 906 (2001) 157–163.
- [41] R.M. Rosa, R.B. Oliveira, J. Saffi, A.L. Braga, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, J.C.F. Moreira, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions, *Life Sci.* 77 (2005) 2398–2411.

5. DISCUSSÃO

O interesse por estudos químicos e bioquímicos dos compostos orgânicos de Se e Te tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas principalmente devido ao fato de que vários destes compostos apresentam atividade antioxidante (Anderson e cols., 1994, Nogueira e cols, 2004) e também, devido a estes compostos serem utilizados como intermediários em síntese orgânica (Petraghani, 1994; Comasseto e cols. 1997) e como agentes farmacológicos (Barbosa et al., 2008; Ineu et. al., 2008). Por outro lado, os efeitos tóxicos causados por esta classe de compostos têm sido pouco investigados e ensaios *in vitro* que possam contribuir como um “screening” para a escolha de organocalcogênios que possam ser testados farmacologicamente em modelos *in vivo* são poucos descritos na literatura.

Neste contexto, o presente estudo foi realizado para avaliar a toxicidade de uma variedade de compostos orgânicos de Se e de Te utilizando células sanguíneas como um modelo simples de dano celular. Os ensaios foram realizados especificamente com eritrócitos, com o objetivo de analisar a capacidade de vários organocalcogênios de Se e Te em induzir hemólise.

O primeiro objetivo deste estudo foi investigar o efeito de calcogênios em eritrócitos após 48h de incubação, sendo que a maioria dos compostos utilizados foram organocalcogênios, utilizou-se também dois compostos como controles difenila (**17**) e hipoclorito de sódio (**18**) conforme Figura 1 (Artigo1).

Com relação aos dados demonstrados no primeiro artigo, foi possível verificar que o efeito hemolítico ocorreu dependente da concentração, ou seja, para baixas concentrações (10 μ M) não houve hemólise, da mesma forma que Tiano e cols. (2000) relataram que quando trabalharam com calcogênios em concentrações baixas (\leq 10 μ M), eles não alteraram a taxa de hemólise em peixes.

Na análise dos resultados verificou-se que além do composto inorgânico dióxido de Se (**16**) apenas os compostos com telúrio na molécula apresentaram efeito hemolítico, como o telureto de difenila (**4**), 2-dicloreto de butiltelúrio-penteno-1-fosfonato (**8**), ditelureto de dinaftila (**13**) e ditelureto de difenila (**14**). Além disso, quando foram adicionados cálcio e magnésio no meio de incubação, eles não alteraram o efeito hemolítico causado pelos compostos. Sabe-se que compostos orgânicos que tenham Te na molécula costumam ser mais nucleofílicos que seus

análogos correspondentes com Se ou enxofre (Wada et al., 1999), isto poderia explicar o fato dos compostos, seleneto de difenila (**3**) e disseleneto de difenila (**12**) não terem apresentado efeito hemolítico nestas condições de incubação.

Além disso, foi verificado o efeito destes compostos sobre a peroxidação lipídica dos eritrócitos, uma vez que, a peroxidação dos lipídeos da membrana tem sido considerada um fator importante na hemólise (Dumaswala e cols., 1999; Niki e cols., 1988), mas apenas os compostos (*S*)-*tert*-butil 1-disseleneto-3-fenilpropano-2-*N*-(carbamato) (**6**) e selenito de sódio (**15**) apresentaram efeito pró-oxidante. A toxicidade do selenito de sódio tem sido demonstrada na literatura devido à oxidação de tióis endógenos conseqüentemente gerando ânions superóxidos e outras espécies reativas de oxigênio (Spallholz, 1994; Kramer e Ames, 1988). Desta forma, é possível que o efeito pró-oxidante destes compostos esteja relacionado com a depleção de tióis endógenos e formação de radicais livres durante a oxidação de tióis. Neste estudo, os compostos **13** e **14** apresentaram efeito antioxidante, e estão de acordo com resultados já vistos na literatura onde compostos organotelúrio apresentaram efeito antioxidante sobre a peroxidação lipídica (Anderson e cols., 1994; Engman e cols., 1995; Nogueira e cols., 2004). Os resultados mostraram que o efeito hemolítico dos compostos organotelúrio não foi positivamente correlacionado com a produção de TBARS.

Na segunda etapa dos estudos *in vitro*, apresentados no Artigo 2 desta tese, investigou-se um possível mecanismo para o efeito hemolítico dos organocalcogênios. Sabe-se que o estresse oxidativo é um dos fatores que causa modificações em macromoléculas celulares (na membrana e no citoplasma) originando danos celulares (Devasena e cols., 2001, Domanski e cols., 2005). O resultado da oxidação dos componentes da membrana apresenta um papel importante no processo hemolítico, porém o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está esclarecido.

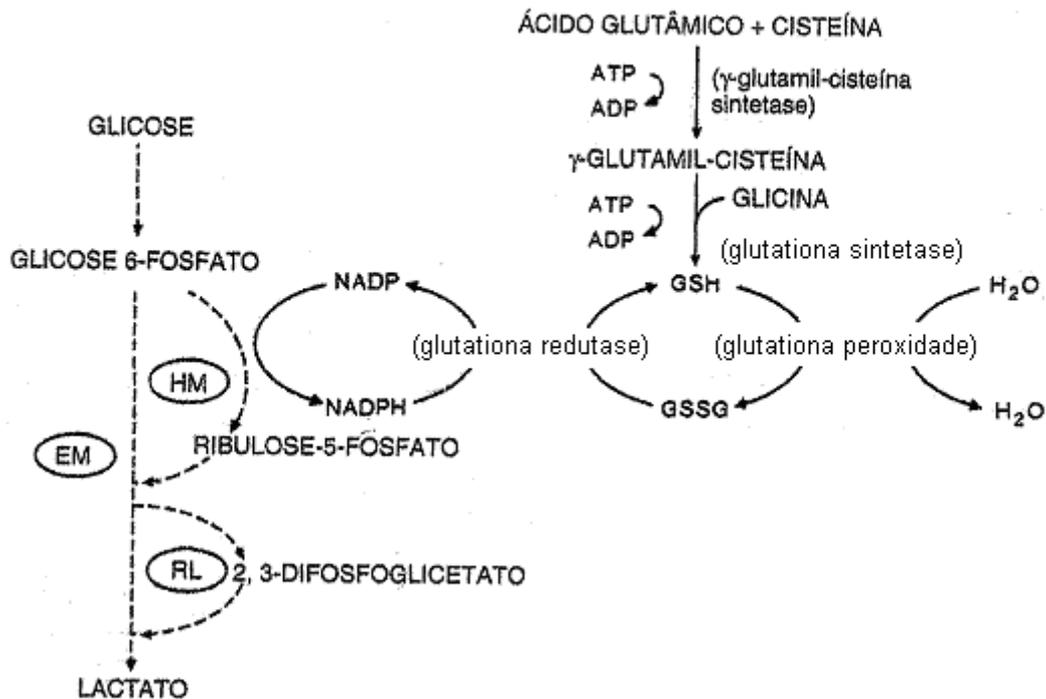
Desta forma, selecionamos alguns compostos diorganocalcogênios (*S*)-*tert*-butil 1-disseleneto-3-metilbutano-2-*N*-(carbamato) (**5**), **6**, **12**, **13** e **14** e dois inorgânicos (**15** e **16**) (Fig.1, Artigo 1) para a realização deste estudo onde eritrócitos foram usados como modelo para investigar uma possível interação entre glutathiona e compostos com Se e Te , usando a hemólise eritrocitária como parâmetro final de toxicologia. Dados da literatura mostram que compostos inorgânicos de selênio induzem a hemólise em eritrócitos e este efeito está

associado com os níveis de GSH nos eritrócitos (Young e cols., 1981). Neste estudo, constatou-se que todos os compostos apresentaram efeito hemolítico nas condições (temperatura, meio e tempo de incubação) as quais foram submetidos. Em estudo prévio observou-se que a atividade tiol oxidase de compostos orgânicos poderia explicar as propriedades hemolíticas destes compostos (Hu e Spallholz, 1982). A produção de superóxido e peróxido de hidrogênio como uma consequência da oxidação de tióis poderia explicar o feito hemolítico de compostos calcogênicos. Neste contexto, sugerimos que o primeiro passo na Figura 5 (Artigo 2) relaciona a reação de tiol com compostos orgânicos dicalcogênicos (**5, 6, 12, 13 e 14**) (Fig.1, Artigo 1), que origina um intermediário instável do tipo **RSe-SG**. Este mecanismo catalítico produz superóxido como um passo na transferência de elétrons do **RSe⁻** para dioxigênio.

Da mesma forma, também sugerimos que a toxicidade causada por compostos inorgânicos (**15 e 16**) (Fig.1, Artigo 1) está relacionada com a oxidação de tióis endógenos e geração de radicais livres. Seko e colaboradores em 1989 relataram que selenito reagiu com GSH para produção de superóxido (Seko e cols., 1989), bem como Davis e Spallholz (1996) sugeriram um mecanismo para a indução de apoptose por selenito causada pela geração de radicais livres pela oxidação de glutathiona.

Outros experimentos foram realizados com a finalidade de verificar se a hemólise causada por estes compostos poderia ser devido à oxidação de tióis. Acrescentou-se ao meio de incubação GSH, e foi possível verificar um aumento na taxa de hemólise causada por estes compostos. De fato, Spallholz (1994) adicionou GSH em eritrócitos na presença de compostos de Se, que causou um aumento na taxa de hemólise. Em outro estudo, foi demonstrado que o selenito e o telurito causaram hemólise em eritrócitos *in vitro*, onde a hemólise foi precedida por uma queda na concentração de GSH intracelular e adição de GSH extracelular em eritrócitos deficientes de GSH, resultou em uma rápida hemólise quando o selenito ou o telurito estavam presentes (Young e cols., 1981). Além da GSH, também foram realizados experimentos adicionando-se glicose ao meio de incubação, o que levou de maneira similar, a um aumento na taxa de hemólise exceto para o dióxido de selênio. Este efeito poderia estar relacionado com o fato de que a glicose mantém os níveis de GSH em eritrócitos por meio da via oxidativa da pentose fosfato que fornece nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que por sua vez mantém

a glutatona no seu estado reduzido no ciclo redox GSH (Rotruck e cols., 1972, Halliwell e Gutteridge, 1989) (Esquema 7).



Esquema 7- Via oxidativa da pentose fosfato (Burtis e Ashwood, 1998).

Seguindo a mesma linha de raciocínio, na qual sugeriu-se que as propriedades toxicológicas dos calcogênios estariam relacionadas com a oxidação de grupos $-SH$, trabalhou-se com a oxidação de DTT (ditiotreitól) e cisteína pelos compostos. Observou-se que estes compostos foram capazes de oxidar grupos $-SH$. Compatível com esses resultados Maciel e colaboradores mostraram que GSH e outros tióis (como DTT) poderiam ser oxidados por disseleneto de difenila (Maciel e cols., 2000). Além disso, outro trabalho sugeriu que o disseleneto de difenila induziu efeito pró-oxidante em leveduras como resultado da depleção de GSH (Rosa e cols., 2005). Baseado nos dados deste trabalho sugeriu-se que a geração de radicais livres pelos compostos calcogênios contendo Se ou Te através da oxidação de tióis endógenos induziu a hemólise em eritrócitos humanos *in vitro*.

Em conjunto, nossos dados sugerem um mecanismo para oxidação de tióis endógenos para os diorganocalcogênios, o qual seria a causa da hemólise ocasionada por estes compostos.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese podemos inferir o que segue:

- Os organocalcogênios: telureto de difenila , 2-dicloreto de butiltelúrio-penteno-1-fosfonato, ditelureto de dinaftila, ditelureto de difenila e os compostos inorgânicos selenito de sódio e dióxido de selênio apresentaram efeito hemolítico nos eritrócitos *in vitro*, e este efeito foi dependente da concentração dos compostos.
- Os compostos (*S*)-*tert*-butil 1-disseleneto-3-fenilpropano-2-*N*-(carbamato) e o selenito de sódio apresentaram um efeito pró-oxidante, pois aumentaram os níveis de TBARS, enquanto que o ditelureto de dinaftila e o ditelureto de difenila apresentaram um efeito antioxidante, pois diminuíram a produção de TBARS. E não foi possível correlacionar positivamente o efeito hemolítico dos compostos com a produção de TBARS.
- A GSH e a glicose potencializaram o efeito hemolítico causado pelos diorganocalcogênios:(*S*)-*tert*-butil 1-disseleneto-3-metilbutano-2-*N*-(carbamato), (*S*)-*tert*-butil 1-disseleneto-3-fenilpropano-2-*N*-(carbamato), disseleneto de difenila, ditelureto de dinaftila, ditelureto de difenila.
- Os compostos diorganocalcogênios oxidaram grupamentos tióis através da oxidação de ditioneitol (DTT) e cisteína (CYS).

7. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

- Danúbia Bonfanti dos Santos, Viviane Patrícia P. Schiar, Marinei Cristina P. Ribeiro, Ricardo S. Schwab, Daiane F. Meinerz, Josiane Allebrandt, Michael Aschner, Cristina W. Nogueira, João Batista T. Rocha, Nilda B. de Vargas Barbosa. Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes *in vitro*. *Mutation Research* 676, 21–26, 2009.

- Danúbia Bonfanti dos Santos, Viviane Patrícia P. Schiar, Márcio Weber Paixão , Daiane F. Meinerz , Cristina W. Nogueira, Michael Aschner , João Batista T. Rocha , Nilda B. de Vargas Barbosa. Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 2009. *in press*

8. PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados apresentados nessa tese faz-se necessário:

- Investigar a toxicidade dos compostos organocalcogênios *in vivo*.
- Dosar os níveis de GSH e GSSH.
- Investigar o papel da GSH e outros tióis no efeito hemolítico dos compostos
- Verificar se a glicose aumenta GSH.
- Investigar a fluidez da membrana.

9. REFERÊNCIAS

ABED-ALI S.S., MCWHINNIE W.R., SCOTT G. Stabilization of PVC with Organotellurium Compounds. **Polym. Degrad. and Stab.** 21: 211–225, 1988.

AKSENOV, M.Y., AKSENOVA, M.V., BUTTERFIELD, D.A., GEDDES, J.W., MARKESBERRY, W.R. Protein Oxidation In the Brain in Alzheimer's Disease. **Neuroscience** 103: 373–383, 2001.

ALISSA E.M., BAHIJRI S.M., FERNS G.A. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. **Med. Sci. Monit.** 9: RA9–RA18, 2003.

ANDERSON, C. M., HALLBERG, A., BRATTSAND, R., COTGREAVE, I. A., ENGMAN, L., PERSON, J. Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 3: 2553–2558, 1993.

ANDERSON, C.M., BRATTSAND, R., HALLBERG, A.R., ENGMAN, L., PERSSON, J., MOLDÉUS, P., COTGREAVE, I. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. **Free Radical Res.** 20: 401–410, 1994.

ANDERSON, R. A., EVANS, L. M., ELLIS, G. R., KHAN, N., MORRIS, K. JACKSON, S. K., REES, A., LEWIS, M. J., FRENNEAUX, M. P. Prolonged deterioration of endothelial dysfunction in response to postprandial lipaemia is attenuated by vitamin C in Type 2 diabetes. **Diabetic Med.**, 23: 258–264, 2005.

BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., SOARES, J.C.M., WONDRACEK, D.C., GONÇALVES, J.F., SCHETINGER, M.R.C., NOGUEIRA, C.W. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ induced toxicity. **Food Chem. Toxicol.** 46, 186–194, 2008.

BATISTA, M. T. A., RODRIGUES, H. G., FONSECA, L. C., BONETTI, A. M., PENHA-SILVA, N., NERES, A. C., AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3(supl. 2): 22-24, 2007.

BAUMANN, E., STOYA, G., VOLKNER, A., RICHTER, W., LEMKE, C., LINSS, W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure, **Acta Histochem.** 102: 21–35, 2000

BECK, M.A., LEVANDER, O.A., HANDY, J. Selenium deficiency and viral infection **J. Nutr.** 133: 1463S-1467, 2003.

BEDWALL, R.S., NAIR, N., SHARMA, M.P., MATHUR, R.S. Selenium its biological perspectives. **Med. Perspect.** 41:150–159, 1993.

BEERS, M. H., BERKOW, R., Eds. **The Merck Manual of Diagnosis and Therapy**; Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ, 1999. p. 54–55.

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

BLAIS, F.X., ONISCHUK, R.T., DE MEIO, R.H. Hemolysis by tellurite: I: The tellurite test for hemolysis. **J. Am. Osteopath. Assoc.**, 72(2):207–210, 1972.

BOLES, J.O., LEBIODA, L., DUNLAP, R.B., ODUM, J.D. Telluromethionine in structural biochemistry. **SAAS Bull. Biochem. Biotechnol.** 8:29–34, 1995.

BORGES, V.C. NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. **Neurochem. Res.** 29:1505–9, 2004.

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

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

BORGES, L.P., NOGUEIRA, C.W. ROCHA, J.B.T., ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-Nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem. Biol. Interact.**, 160: 99–107, 2006.

BRAGA, A.L., ZENI, G., ANDRADE, L.H., SILVEIRA, C.C. Stereoconservative formation and reativity of -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinyllic chalcogens. **Synlett** 5: 595–596, 1997.

BRANDÃO, R., SANTOS, F.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. DMPS and N-acetilcisteína induced renal toxicity in mice exposed to mercury. **Biometals** 19: 389–398, 2006.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., MILLER, J. K., QUIGLEY, J. D., MOORE, J.R., MADSON, F.C. Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. **J. Dairy Sci.** 77: 3087–3095, 1994.

BUDISA, N., STEIPE, B., DEMANGE, P., ECKERSKORN, C., KELLERMANN, J., HUBER, R. High-Level Biosynthetic Substitution of Methionine in Proteins by its Analogs 2-Aminohexanoic Acid, Selenomethionine, Telluromethionine and Ethionine in Escherichia-Coli. **Eur. J. of Biochem.** 230:788–796, 1995.

BURK, R.F. and HILL, K.E. Regulation of selenoproteins. **Annual Review of Nutrition** 13:65–81, 1993.

BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R. **Tietz Fundamentos de Química Clínica.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. p. 681.

CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** 59: 527–605, 1979.

CHASTEEN, T. G. and BENTLEY, R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. **Chem. Rev.** 103, 1–25, 2003.

CLANCY, R.M., LEVARTOVSKY, D., LESZCZYNSKA-PIZIAK, J., YEGUDIN, J., ABRAMSON, S.B. Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 3680–3684, 1994.

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

COOPER, A.J.L. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L., Kunk, L.M. (Eds.), **The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease.** Butterworth - Heinemann, Boston, 1997, p.1195–1230.

COTGREAVE, I.A., GERDES, R.G. Recent trends in glutathione Biochemistry – glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 242:1–9, 1998.

DAIBER, A., ZOU, M.-H., BACHSCHMID, M., ULLRICH, V. Ebselen as a Peroxynitrite Scavenger *In Vitro* and *Ex Vivo*. **Biochem. Pharmacol.** 59:153–160, 2000.

DAS, R.K., HOSSAIN, S.K., BHATTACHARYA, S. Diphenylmethyl selenocyanate inhibits DMBA–croton oil induced two-stage mouse skin carcinogenesis by inducing apoptosis and inhibiting cutaneous cell proliferation. **Cancer Lett.** 230:90–101, 2005.

DAVIS, R.L., SPALLHOLZ, J.E. Inhibition of selenite-catalyzed superoxide generation and formation of elemental selenium (Se⁰) by copper, zinc, and aurintricarboxylic acid (ATA), **Biochem. Pharmacol.** 51:1015–1020, 1996.

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

DEVASENA, T., LALITHA, S., PADMA, K. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. **Clin. Chim. Acta** 308:155–161, 2001.

DEVI, S.A., SUBRAMANYAM, M.V.V., VANI, R., JEEVARATNAM, K. Adaptations of the antioxidant system in erythrocytes of trained adult rats: Impact of intermittent hypobaric-hypoxia at two altitudes. **Comp. Biochem. Phys. C** 140: 59–67, 2005.

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.** 14:109–114, 1997.

DOMANSKI, A.V., LAPSHINA, ZAVODNIK, I.B. Oxidative Processes Induced by tert-Butyl Hydroperoxide in Human Red Blood Cells: Chemiluminescence Studies. **Biochemistry (Moscow)** 70:761–769, 2005.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog. Neurobiol.** 62:649–671, 2000.

DUMASWALA, U.J., ZHUO, L., JACOBSEN, D.W., JAIN, S.K., SUKALSKI, K.A. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. **Free Rad.I Biol. Med.** 27:1041–1049, 1999.

DUMONT, E., VANHAECKE, F., CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. **Anal. Bioanal. Chem.** 385:1304–1323, 2006.

EISELE K., LANG P.A., KEMPE D.S., KLARL B.A., NIEMÖLLER O., WIEDER T., HUBER S.M., DURANTON C. AND LANG F. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. **Toxicol. Appl. Pharm.** 210:116–122, 2006.

EL-BAYOUMY, K., SINHA, R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. **Mutat. Res.** 551, 181–197, 2004.

EL-MISSIRY, M.A. and ABOU-SEIF, M. Photosensitization induced reactive oxygen species and oxidative damage in human erythrocytes. **Cancer Lett.** 158: 155–163, 2000.

ENGMAN, L., STERN, D., COTGREAVE, I.A., ANDERSON, C.M. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. **J. Am. Chem. Soc.** 114: 9737–9743, 1992.

ENGMAN, L.; PERSSON, J.; VESSMAN, T.K.; EKSTROM, M.; BERGLUND, M. and ANDERSSON, C-M. Organotellurium Compounds as Efficient Retarders of Lipid Peroxidation in Methanol. **Free Radical Bio. Med.** 19: 441–452, 1995.

ENGMAN, L.; STERN, D.; STENBERG, B. Organotellurium compounds as stabilizers for polymeric materials. **J. Appl. Polym. Sci.** 59:1365–1370, 1996.

FAILACE, R. **Hemograma- Manual de Interpretação.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. cap.2, pp. 42- 43.

FARINA, M., SOARES, F.A.A., ZENI, G., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B.T. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. **Toxicol. Lett.** 146:227–235, 2004.

FAVERO, A.M., WEIS, S.N., STANGHERLIN, E.C, ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. **Reprod. Toxicol.** 20: 561-8, 2005.

FINKEL, T., HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature** 408:239–247, 2000.

FIRMINO, C. B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. 2007. 89f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

FOOD AND NUTRITIONAL BOARD. National Research Council. Recommended Dietary Allowance. 10th ed, Washington, DC: **National Academy Press**, 1989.

FOSTER, L.H., SUMAR, S. Selenium in the environment, food and health. **Nutr. Food Sci.** 5:17–23, 1995.

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

GHISLENI, G., PORCIÚNCULA, L.O., CIMAROSTIA, H., ROCHA, J.B.T., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Res.** 986:196–199, 2003.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford:Clarendon Press. 1985. p.543.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J., ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chem. Toxicol.** 33:601–617, 1995.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Clarendon, Oxford. 1989, p.28–30.

HALLIWELL, B, CLEMENT, M.V., LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters** 486:10–13, 2000.

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

HU, M.L., SPALLHOLZ, J.E. In vitro hemolysis of rat erythrocytes by selenium compounds. **Biochem. Pharmacol.** 32:957–961, 1982.

Imagem 11_20sangue JPG. Altura: 213 pixels. Largura: 425 pixels. 69kb. Formato JPEG, disponível em <http://www.webciencia.com/11_20composicao.htm> Acesso em: 05 junho 2008.

Imagem, Altura: 474 pixels. Largura: 881 pixels. 57kb. Formato JPEG, disponível em << <http://paginas.ucpel.tche.br/~mflessa/bi6.html>> Acesso em: 08 julho 2008.

INEU, R.P., PEREIRA, M.E., ASCHNER, M., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chem. Toxicol.** 46:3023–3029, 2008.

IP, C., LISK, D. J., and STOEWSAND, G. S. Mammary cancer prevention by regular garlic and selenium-enriched garlic. **Nutr. Cancer** 17:279–286, 1992.

IWASE, K., TATSUSHI, T., NISHIMURA, Y., YAMAGUCHI, J.Y., OYAMA, Y., MIYOSHI, N., WADA, M. Cytometric Analysis of Adverse Action of Diphenyl Ditelluride on Rat Thymocytes: Cell Shrinkage as a Cytotoxic Parameter. **Environ. Toxicol.** 19:614–619, 2004.

JACQUES-SILVA, M.C.; NOGUEIRA, C.W.; BROCH, L.C.; FLORES, E.M.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacol.Toxicol.** 88, 119–125, 2001.

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

KANE, D.J., SARAFIAN, T.A., ANTON, R., HAHN, H., GRALLA, E.B., VALENTINE, J.S., ORD, T., BREDESEN, D.E. Bcl-2 inhibition of neuronal death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science** 262:1274–1277, 1993.

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

KLEIN, E.A. Chemoprevention of Prostate Cancer. **Annu. Rev. Med.** 57: 49–63, 2006.

KLOTZ, L.O. and SIES, H. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. **Toxicol. Lett.** 140–141, 125–132, 2003.

KODAK, E USA, assignee. Divalent chalcogenide fog inhibiting agents for silver halide photography. U.S. Patent 4607001, Washington, DC, 1985.

KODAK, E., USA assignee. Cyclic dichalcogenide fog inhibitor for silver halide photographic material. US Patent 4861703, Washington, DC, 1989.

KOTLYAR, E., VITA, J.A., WINTER, M.R., AWTRY, E.H., SIWIK, D.A., KEANEY JR, J.F., SAWYER, D.B., CUPPLES, L.A., COLUCCI, W.S., SAM, F. The Relationship Between Aldosterone, oxidative Stress, and Inflammation in Chronic, Stable Human Heart Failure. **J. Card.Fail.** 12:122–127, 2006.

KRAMER, G.F., AMES, B.N. Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na_2SeO_3) in *Salmonella typhimurium*. **Mutat. Res.** 201:169–180, 1988.

KRON, T., WITTMACK, K., HANSEN, C., WERNER, E. Stable isotopes for determining biokinetic parameters of tellurium in rabbits. **Anal. Chem.** 63:2603–2607, 1991.

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

LARNER, A. J. How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis. **Med. Hypóthesis** 44:295–297, 1995.

LERMAN, L.O., NATH, K.A., RODRIGUEZ-PORCEL, M., KRIER, J.D., SCHWARTZ, R.S., NAPOLI, C., ROMERO, J.C. Increased Oxidative Stress in Experimental Renovascular Hypertension. **Hypertension** 37:541–546, 2001.

LIEW, C.-C.; MA, J.; TANG, H.-C.; ZHENG, R.; DEMPSEY, A.A. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. **J. Lab. Clin. Med.** 147:126–132, 2006.

LOCKITCH G. Selenium: clinical significance and analytical concepts. **Cri. Rev. Clin. Lab. Sci.** 27:483–541, 1989.

MACIEL, E.N.; BOLZAN, R.C.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect δ -Aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxic.** 14: 310–319, 2000.

Manual Merck -Biologia do sangue. 2005. Disponível em <http://www.msd-brazil.com/msdbrazil/patients/manual_Merck/mm_sec14_152.html> Acesso em: 20 maio 2008.

MARIGLIANO, V., TARZIA, A., MODESTI, D., MASELLA, R., CANTAFORA, A., BAUCO, C., SALVATI, A. M., SCUTERI, A., CAPRARI, P. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Exp. Gerontol.** 34: 47–57, 1999.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat. Res.** 424: 83–95, 1999.

MARTIN, J.L. and GERLACK, M.L. Selenium metabolism in animals. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 192:193–199, 1972.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicol.** 153:83–104, 2000.

MAZZANTI, L.; FRANCESCHI, C.; NANETTI, L.; SALVOLINI, E.; STAFFOLANI, R.; MORETTI, N.; RABINI, R. A. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Exp. Gerontol.** 37:657–663, 2002.

MCKENZIE, R.C.; RAFFERTY, T.S.; BECKETT, G.J.; ARTHUR, J.R. **Effects of selenium on immunity and aging.** In DL Hatfield, ed, Selenium, Its Molecular Biology and Role in Human Health. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2001. p 257–272.

MEISTER, A. Glutathione synthesis. **Enzymes** 10:671–697, 1974.

MEISTER, A., ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** 52:711–760, 1983.

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.** 143:9–16, 2003.

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

MISRA, I., GRIFFITH, O.W. Expression and purification of human g-glutamylcysteine synthetase. **Prot. Expr. Purific.** 13:268–276, 1998.

MORETTO, M.B., ROSSATO, J.I., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of ⁴⁵Ca influx into brain synaptossomes is voltage-dependent. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 17:154–160, 2003.

MOXON, A.L. and RHIAN M. Selenium Poisoning. **Physiol. Rev.** 23:305–337, 1943.

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.** 263:4527–4531, 1988.

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

MUÑIZ-NAVEIRO, O., DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R., BERMEJO-BARRERA, A., COCHO, J. A., FRAGA, J. M., & BERMEJO-BARRERA, P. Determination of total selenium and selenium distribution in the milk phases in commercial cow's milk by HG-AAS. **Anal. Bioanal. Chem.** 381: 1145–1151, 2005.

MURADOR, P., DEFFUNE E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 29:168–178, 2007.

MÜLLER, R., ZSCHIESCHE, W., STEFFEN, H. M., SCHALLER, K.H. Tellurium intoxication. **Klin. Wochenschr** 67:1152–1155, 1989.

NAVARRO-ALARCÓN, M. and LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Tot. Environ.** 24:347-371, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 3.ed. São Paulo: Sarvier. 2002. p. 688.

NIKI, E., YAMAMOTO, Y., TAKAHASHI, M., YAMAMOTO, K., KOMURO, E., MIKI, M., YASUDA, H., MINO, M. Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** 34:507–512, 1998.

NOGUEIRA, C.W., ROTTA, L.N., ZENI, G., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B.T. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. **Neurochem. Res.** 27: 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.** 52, 56–63, 2003a.

NOGUEIRA, C.W., MEOTTI, F.C., CURTE, E., PILISSÃO, C., ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology** 183:29–37, 2003b.

NOGUEIRA, C.W., BORGES, V.C., ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organochalcogens effects on aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology** 191:169–178, 2003c.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.** 104:6255–6286, 2004.

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

OHKAWA, H., OHISHI, N. and YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95,351–358, 1979.

OHLENDORF, H.M. Selenium was a time bomb. **Human Ecol. Risk Assessment** 5:1181-1185, 1999.

OLDFIELD, J.E. The Two faces of selenium. **J. Nutr.** 117, 2002-2008, 1987.

OHMIYA, Y., NAKAI, K. Relationship between inhibition of membrane SH groups and hemolysis induced by SH inhibitors, Jpn. **J. Pharmacol.** 27:596– 599, 1977.

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

PARNHAM, M.J., GRAF, E. Pharmacology of syntetic organic selenium compounds. **Prog. Drug. Res.** 36:9–47, 1991.

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

PETRAGNANI, N. **Tellurium in Organic Synthesis**. Academic Press, London.1994. p. 9–88.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod**, 63:1035–1042, 2000.

POLI, G., LEONARDUZZI, G., BIASI, F., CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signaling. **Curr. Med. Chem.** 11:1163–1182, 2004.

POOT, M., TEUBERT, H., RABINOVITCH, P.S., KAVANAGH, T.J. De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. **J. Cell. Physiol.** 163:555–560, 1995.

PRASANTHI, K., MURALIDHARA, RAJINI, P.S. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to Fenvalerate and its metabolite. **Toxicol. In Vitro** 19: 449-456, 2005.

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

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **Lancet** 356:233–241, 2000.

RICHMAN, P.G., MEISTER, A. Regulation of g-glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. **J. Biol. Chem.** 250:1422–1426, 1975.

ROHN T.T., HINDS T.R., VINCENZI F.F. Inhibition of the Ca²⁺ pump of intact red blood cells by t-butyl hydroperoxide:important of glutathione peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta** 1153:67–76, 1993.

ROHN, T.T., NELSON, L.K., WAEG, G., QUINN., M.T. U-101033E (2,4-Diaminopyrrolopyrimidine), a Potent Inhibitor of Membrane Lipid Peroxidation as Assessed by the Production of 4-Hydroxynonenal, Malondialdehyde, and 4-Hydroxynonenal–Protein Adducts. **Biochem. Pharmacol.** 56:1371–1379, 1998.

ROSA, R.M., SULZBACHER, K., PICADA, J.N., ROESLER, R., SAFFI, J., BRENDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. **Mutat. Res.** 563:107–115, 2004.

ROSA, R.M., OLIVEIRA, R.B., SAFFI, J., BRAGA, A.L., ROESLER, R., DAL-PIZZOL, F., MOREIRA, J.C.F., BRENDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. **Life Sci.** 77:2398–2411, 2005.

ROSSATO, J.I., KETZER, L.A., CENTURIÃO, F.B., SILVA, S.J.N., LÜDTKE, D.S., ZENI, G., BRAGA, A.L., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B.T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochem. Res.** 3, 297–303, 2002.

ROSSETTO, J.J., ABATTI P.J. Análise da passagem do eritrócito através de um poro parabólico curto. **Rev. Bras. Eng. Bioméd.** 21:87-95, 2005.

ROTRUCK, J.T., HOEKSTRA, W.G., GANTHER, H.E., POPE, A.L. Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. **J. Nutr.** 102:689–695, 1972.

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

SAEZ, G.T., BANNISTER, W.H., BANNISTER, J.V. **Free radicals and thiol compounds – the role of glutathione against free radical toxicity.** In: Vina, J. (Ed.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1990. p. 237–254.

SAILER, B.L., LILES, N., DICKERSON, S., SUMNERS, S., CHASTEEN, T.G. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. **Toxicol. in Vitro** 18:475–482, 2004.

SALGANIK, R. I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **J. Am. Coll. Nutr.** 20:473S–475S, 2001.

SANTOS, F.W., ORO, T., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NASCIMENTO, P.C., NOGUEIRA, C.W. Cadmium induced testicular damage and its response to

administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol. Lett.** 152: 255–263, 2004.

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

SANTOS, D.B., SCHIAR, V.P.P., PAIXÃO, M.W., MEINERZ, D.F., NOGUEIRA, C.W., ASCHNER, M., ROCHA, J.B.T., BARBOSA, N.B.V. Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells in vitro. **Toxicol. in Vitro.** 2009a, *in press*.

SANTOS, D.B., SCHIAR, V.P.P., RIBEIRO, M.C.P., SCHWAB, R.S., MEINERZ, D.F., ALLEBRANDT, J., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ASCHNER, M., BARBOSA, N.B.V. Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes in vitro. **Mutat. Res.** 676: 21–26, 2009b.

SARBAN, S., KOCYIGIT, A., YAZAR, M.; ISIKAN, U.E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clin. Biochem.** 38:981–986, 2005.

SATO, N., IWATA, S., NAKAMURA, K., HORI, T., MORI, K., YODOI, J. Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. **J. Immunol.** 154:3194–3203, 1995.

SAVEGNAGO, L.; TREVISAN, M.; ALVES, D.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 21:86–92, 2006.

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

SCHULZ, J.B., LINDENAU, J., SEYFRIED, J., DICHGANS, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **Eur. J. Biochem.** 267:4904–4911, 2000.

SCHWABBAUER, M. Normal erythrocyte production, physiology and destruction. **Clinical hematology: Principles, procedures and correlations.** Philadelphia: Lippincott. 1998.p. 57–72.

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

SCHWARTZ, K. and FOLTSZ, P. J. Selenium as a integral part of facto 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.** 79: 3292–3293, 1957.

SEKO, Y., SAITO, Y., KITAHARA, J., IMURA, N. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: **Selenium in biology and medicine**. Berlin: Springer-Verlag.1989.p.70-73.

SENTHILA, S., VEERAPPANA, R.M., RAOB, M.R., PUGALENDIA, K.V. Oxidative stress and antioxidants in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. **Clin. Chim. Acta** 348:131–137, 2004.

SHINAR E, RACHMILEWITZ EA, SHIFTER A, RAHAMIM E, SALTMAN P. Oxidative damage to human red cells induced by copper and iron complexes in the presence of ascorbate. **Biochim. Biophys. Acta** 1014: 66–72, 1989.

SICIŃSKA, P. ; BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. **Toxicol** 47: 387–397, 2006.

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

SILVA, P. In: *Sangue e células sanguíneas - Química Fisiológica*. Universidade Fernando Pessoa, 2002. Disponível em:<<http://www2.ufp.pt/~pedros/qfisio/sangue.htm> - 19k>. Acesso em: 24 junho 2009.

SINGER, S.J., NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science** 175:720-31, 1972.

SINGH, S.P., WISHNOK, J.S., KESHIVE, M., DEEN, W.M., TANNENBAUM, S.R. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93:14428–14433, 1996.

SORIANO-GARCIA, M. Organoselenium compounds as potential therapeutic and chemopreventive agents: a review. **Curr. Med. Chem.** 11:1657–1669, 2004.

SOUZA, M.H.L.; RÊGO, M.M.S. **Princípios de Hematologia e Hemoterapia: Manual de Instrução Programada**. Rio de Janeiro: Alfa Rio. 1996. pg. 43.

SOUZA, M.H.L. e ELIAS, D.O. In: Fundamentos da Circulação Extracorpórea- 2ª edição, 2006, Cap. 6. Fisiologia do Sangue, p.115. Disponível em <http://perflin.com/livro/> Acesso em: 20 junho 2009.

SOUZA, A.C.G., LUCHESE, C., NETO, J.S.S., NOGUEIRA, C.W. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: Studies in vitro and in vivo. **Life Sci.** 84:351–357, 2009.

SPALLHOLZ, J.E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Radic. Biol. Med.** 17:45–64, 1994.

SPALHOLZ, J.E. Free radical generation by selenium compounds and their pro-oxidant toxicity. **Biomed. Environ. Sci.** 10:260–270, 1997.

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.** 7: 163–168, 1988.

SRINIVASAN, K., KEMPAIAH, R. K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **J. Nutr. Biochem.** 17:471–478, 2006.

STANGHERLIN, E.C., FAVERO, A.M., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA C.W. Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. **Toxicology** 207:231-239, 2005.

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

SUZUKI, K.T., KURASAKI, K., OKAZAKI, N., OGRA, Y. Selenosugar and trimethylselenonium among urinary Se metabolites: dose- and age-related changes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 206: 1–8, 2005.

TAYLOR, A. Biochemistry of Tellurium. **Biol. Trace Elem. Res.** 55:231–239, 1996.

TIANO, L., FEDELI, D., SANTRONI, A.M., VILLARINI, M., ENGMAN, L., FALCIONI, G. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. **Mutat. Res.** 464:269–277, 2000.

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

TSEN, C.C., COLLIER, H.B. Selenite as a relatively weak inhibitor of some sulfhydryl enzyme systems. **Nature** 183:1327, 1959.

USAMI, M.; TABATA, H.; OHNO, Y. Effects of ascorbic acid on selenium teratogenicity in cultured rat embryos. **Toxicol. Lett.** 105:123-128, 1999.

U.S. Bureau of Mines. **Mineral Year Book.** U.S. Washington D.C. Government Printing Office, 1:1018–1021, 1985.

VADHANAVIKIT, S., IP, C., GANTHER, H.E. Metabolites of sodium selenite and methylated selenium compounds administrated at cancer chemoprevention levels in the rat. **Xenobiotica** 23:731–45, 1993.

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.** 17:347 -355, 1978.

VALKO, M., MORRIS, H., CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress, **Curr. Med. Chem.** 12:1161–1208, 2005

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interac.** 160:1–40, 2006.

VAN RIJ, A.M., THOMSON, C.D., MCKENZIE, J.M., ROBINSON, M.F. Selenium deficiency in total parenteral nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.** 32:2076–2085, 1979.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; NETO, S. W. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica.** São Paulo: Atheneu, 1996. p.3.

VISSERS MCM, STERN A, KUYPERS F, VAN DEN BERG J, WINTERBOURN CC. Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid. **Free Radical Bio. Med.** 16:703–712, 1994.

WADA, M., NOBUKI, S., TENKYUU, Y., NATSUME, S., ASAHARA, M., ERABI, T. Bis(2,6-dimethoxyphenyl)sulfide, selenide and telluride, and their derivatives. **J. Organomet. Chem.** 580:282–289, 1999.

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.** 57:1891–1901, 1994.

WAJCMAN H, LANTZ B, GIROT R. **Les Maladies du globule rouge**. Paris: Les editions INSERM. Médecine-Sciences Flammarion, 1984.cap.3, pp 31-44.

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.** 153:295–297, 1976.

WHANGER, P. D., IP, C., POLAN, C. E., UDEN, P. C., WELBAUM, G. Tumorigenesis, metabolism, speciation, bioavailability, and tissue deposition of selenium in selenium-enriched ramps (*Allium tricoccum*). **J. Agricul. Food Chem.** 48: 5723–5730, 2000.

WHANGER, P.D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **Br. J. Nutr.** 91:11–28, 2004.

WIESLANDER, E., ENGMAN, L., SVENSJO, E.; ERLANSSON, M., JOHANSSON, U., LINDEN, M., ANDERSSON, C.-M., BRATTSAND, R. Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems. **Biochem. Pharmacol.** 55:573–584, 1998.

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

WINTERBOURN, C.C., METODIEWA, D. The reactions of superoxide with reduced glutathione. **Arch. Biochem. Biophys.** 314, 284–290, 1994.

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

WOLF, E.; KOLLONITSCH, V.; KLINE, C.H. A Survey of Selenium Treatment in Livestock Production. **J. Agric. Food Chem.** 11: 355–360, 1963.

YANG, C.F., SHEN, H.M., ONG, C.N. Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols. **Arch. Biochem. Biophys.** 374:142–152, 2000.

YOUNG, J.D., CROWLEY, C., TUCKER, E.M. Haemolysis of Normal and Glutathione-Deficient Sheep Erythrocytes by selenite and tellurite. **Biochem. Pharmacol.** 30:2527–2530, 1981.

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.** 209:318–322, 1993.

ZAVODNIK, L.B., ZAVODNIK, I.B., LAPSHYNA, E.A., BUKO, V.U., BRYSEWSKA, M.J. Hypochlorous acid-induced membrane pore formation in red blood cells. **Bioelectrochemistry** 58:157–161, 2002.

ZENI, G.; BRAGA, A. L.; STEFANI, H. A. Palladium-Catalyzed Coupling of sp²-Hybridized Tellurides. **Accounts Chem. Res.** 36: 731–738, 2003.

ZOU, C.G., AGAR, N.S., JONES, G.L. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. **Life Sci.** 69: 75-86, 2001.

ZHOU, Y., SHIE, F.S., PICCARDO, P., MONTINE, T.J., ZHANG, J. Proteasomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: relevance to Parkinson's disease. **Neuroscience** 128: 281–291, 2004.