



UFSM

Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA OU PATERNA AO
DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO DA PROLE DE
RATAS WISTAR**

Alexandre Marafon Favero

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA OU PATERNA AO
DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
INTRA-UTERINO DA PROLE DE RATAS WISTAR**

por

Alexandre Marafon Favero

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

Santa Maria, RS, Brasil

2006

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

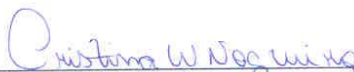
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA OU PATERNA AO
DISSELENTO DE DIFENILA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
INTRA-UTERINO DA PROLE DE RATAS WISTAR**


elaborada por
Alexandre Marafon Favero

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

COMISSÃO EXAMINADORA



Cristina Wayne Nogueira
(Presidente/Orientador)
(UFSM)



Lavinia Schüler-Faccini
(UFRGS)



Bernardo Baldisseroto
(UFSM)

Santa Maria, 27 de julho de 2006.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre guiando meu caminho.

Aos meus pais e a minha irmã, que, embora distantes, sempre me incentivaram para o aperfeiçoamento do meu conhecimento e acreditaram em meu trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Cristina Wayne Nogueira, pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo de minha formação acadêmica, e principalmente pela amizade e confiança na execução deste trabalho. Além de minha gratidão, admiro-a por seu caráter e sua sabedoria na área de Bioquímica.

Ao meu co-orientador Prof. Gilson Zeni pelos seus conhecimentos e exemplo de dedicação, e ao pessoal do seu laboratório, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. João Batista Teixeira da Rocha por sua sabedoria e colaboração para a realização deste trabalho, e ao pessoal do seu laboratório, pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação científica.

À Si, em especial, que contribuiu diretamente para a realização deste trabalho. Obrigado pelo carinho e pela força em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório, Vanessa, Francielli, Eluza (pela colaboração nos trabalhos), Yasmin, Nilda, Lucielli, Simone W, Ana, Dani, Lysandro, Ricardo, Cristiano, Larissa, Renata, Simone P, Gabi, Ethel, Silvane, Alexandra, Cristiane, Marina e Ana Cristina, que além de colegas, demonstraram-se grandes amigos. Agradeço-os pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo desse período.

Aos colegas que tomaram outros rumos, Flávia, Dionéia, Tati, Gisele, Jozi, Márcio, Carlos Eduardo, Fabrício e Guilherme, pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários Angélica e Rinaldo pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

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

À CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

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

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA OU PATERNA AO DISSELENTO DE DIFENILA SOBRE O DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO DA PROLE DE RATAS WISTAR

AUTOR: Alexandre Marafon Favero
ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira
CO-ORIENTADOR: Gilson Zeni
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, julho de 2006.

O selênio (Se) é um elemento traço essencial para humanos e desempenha uma importante função durante a gestação, regulando o crescimento e desenvolvimento de fetos e recém-nascidos. Além disso, o Se é um micronutriente requerido para o processo da espermatogênese e, portanto, essencial para a função reprodutiva em machos. Entretanto, o elemento Se, dependendo da dose, pode ser tóxico para diversas espécies de animais. O disseleneto de difenila $[(\text{OSe})_2]$ é um composto de Se amplamente utilizado como intermediário em reações de síntese orgânica, o que aumenta o risco de intoxicação por exposição ocupacional a este composto. Existem diversos estudos demonstrando que o $(\text{OSe})_2$ possui propriedades farmacológicas. O presente estudo avaliou os efeitos da administração subcutânea, única, de $(\text{OSe})_2$ nas doses de 50 ou 100 mg/kg no 6º, 10º ou 17º dia da gestação de ratas Wistar (**artigo 1**). Os estudos com a maior dose de $(\text{OSe})_2$ (100 mg/kg) foram estendidos a outros dias da gestação (7º ao 12º). No 20º dia de gestação foi realizada uma laparotomia para a retirada dos fetos e a observação do aparecimento de malformações morfológicas externas e esqueléticas. Não foram observadas mortes maternas e fetais nos grupos expostos ao $(\text{OSe})_2$. A exposição ao $(\text{OSe})_2$ não causou alterações significativas nos parâmetros de desenvolvimento avaliados (peso e comprimento fetal), com exceção da exposição a 100 mg/kg de $(\text{OSe})_2$ no 9º dia de gestação, a qual produziu mudanças significativas na biometria fetal: diminuição do comprimento longitudinal e do peso corporal do feto. Não foi observado um aumento significativo no aparecimento de malformações fetais nos grupos expostos ao $(\text{OSe})_2$. A exposição ao $(\text{OSe})_2$ aumentou a incidência de alterações na ossificação do esqueleto dos fetos, principalmente nos grupos tratados no 9º, 10º e 11º dia de gestação sem afetar a sobrevivência dos mesmos. As alterações observadas incluem: ossificação incompleta dos ossos do crânio, das vértebras sacrais e caudais e dos ossos das patas anteriores e posteriores. Além disso, foram observadas alterações nas esternebras das quais, destacam-se: malformação, número reduzido e incompleta ossificação. Um número extra de costelas e costelas onduladas também foi observado. Portanto, com base nos resultados encontrados, concluímos que a exposição materna ao $(\text{OSe})_2$ leva ao aumento na incidência de alterações esqueléticas nos fetos, sem causar o aparecimento de malformações externas visíveis e sem afetar a sobrevivência dos mesmos. Outro foco deste estudo foi avaliar o

grau de toxicidade da exposição sub-crônica ao $(\text{OSe})_2$ sobre o desenvolvimento da prole de ratos Wistar (**artigo 2**). Os ratos foram expostos ao composto pela via subcutânea por um período de 4 (na dose de 5,0 mg/kg) ou 8 semanas (2,5 mg/kg) antes do período de acasalamento. Não foram observadas mortes em nenhum dos grupos e, ao final do período de exposição, apenas os animais tratados com o composto por um período de 4 semanas apresentaram uma redução significativa do peso corporal. O peso dos órgãos sexuais masculinos (testículos e epidídimos) não foi alterado pelo tratamento. Foi observado um aumento significativo no número de sítios de implantações nas fêmeas acasaladas com os machos expostos ao $(\text{OSe})_2$ por um período de 8 semanas. Em relação aos parâmetros fetais, não foram observadas anomalias externas e nem mudanças no peso em ambos os grupos tratados com o $(\text{OSe})_2$ (4 ou 8 semanas). Não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento do esqueleto dos fetos expostos a este composto. O presente estudo demonstrou que a exposição sub-crônica (4 ou 8 semanas) ao $(\text{OSe})_2$ não causou efeitos adversos sobre a prole de ratos Wistar. Tendo em vista os dados obtidos no presente estudo, é possível concluir que o composto $(\text{OSe})_2$ apresenta baixa toxicidade desenvolvimental, uma vez que os efeitos adversos observados neste estudo se manifestam apenas em uma dose muito alta. É importante salientar que o $(\text{OSe})_2$ desempenha suas propriedades farmacológicas em doses mais baixas do que as testadas neste trabalho.

Palavras-chave: Selênio, Disseleneto de Difenila, Toxicologia Desenvolvimental, Exposição Materna, Exposição Paterna e Ratos.

ABSTRACT

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

EFFECTS OF MATERNAL AND PATERNAL EXPOSURE TO DIPHENYL DISELENIDE ON THE INTRAUTERINE DEVELOPMENT OF PROGENY OF WISTAR RATS

AUTHOR: Alexandre Marafon Favero

ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira

CO-ADVISOR: Gilson Zeni

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 2006

Selenium (Se) is an essential trace element for man and is known for its role in regulating growth and development of the fetus and newborn. Furthermore, Se is a micronutrient required for normal spermatogenesis and, therefore, essential for normal male reproductive function. However, it is well known that this element, depending of dose, can be highly toxic to several species of animals. Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] is a Se-compound widely used as intermediate in organic synthesis, as a consequence, the risk of human exposure to this chemical at the workplace may increase. Several studies demonstrated that (PhSe)₂ is an organoselenium compound with potential therapeutic use. The present study evaluates the effects of single maternal subcutaneous injection of 50 and 100 mg/kg (PhSe)₂ at gestational days (GD) 6, 10 or 17 in Wistar rats (**article 1**). The highest dose of (PhSe)₂ was also administered at GD7-12. External and internal fetal soft-tissue examination was performed at GD20. No mortality was observed in fetuses or dams at any (PhSe)₂ treatment. Neither did exposure to (PhSe)₂ cause significant changes to fetal body weight, organ weight, or fetal size when administered at GD6-8, 10-12 or 17. Exposure to 100 mg/kg (PhSe)₂ at GD 9 produced significant changes in fetal biometry (crown-rump (CR) length) and body weight. No increase in the proportion of fetuses with external visible abnormalities was observed in groups exposed to (PhSe)₂. Skeletal anomalies were observed in fetuses in the GD 9-11 treatment groups and included incomplete ossification of cranial bones, misshapen and incomplete ossification of sternebrae, reduced sternebrae number, wavy and extra ribs, incomplete ossification of fore and hindpaw bones and incomplete ossification of sacral and caudal bones. We conclude that maternal administration of (PhSe)₂ during GD 7-12 led to increased incidences of these skeletal variations or anomalies, but did not cause externally visible malformations in rat fetuses. Another focus of this study was the evaluation of the effect of paternal exposure to (PhSe)₂ on the development of progeny of Wistar male rats (**article 2**). Male rats were exposed to (PhSe)₂ subcutaneously for 4 weeks (wk) at the dose of 5.0 mg/kg and 8 weeks at the dose of 2.5 mg/kg, prior to mating with unexposed females. No lethality was noted in any group. At term of exposure period, 4-wk-exposed male rats presented significant decrease in the body weight. Sex organ weights were similar in (PhSe)₂-exposed and control male groups. The number of implantation sites in females mated with males exposed to (PhSe)₂ for 8-wk was significantly higher than those of the respective control group. Male exposure to (PhSe)₂, administered for 4- and 8-wk, did not change fetal body weight. Gross examination of fetuses from 4- and 8-wk-exposed groups did not reveal the

appearance of external anomalies. Examination of live fetuses for ossification centers did not show any significant difference between groups. No increase in the incidence of skeletal anomalies was observed in fetuses obtained from females impregnated with (PhSe)₂-exposed males. The current study indicated that (PhSe)₂ given sub-chronically (4 or 8 weeks) to male rats had no adverse effects on their progeny. On the basis of results mentioned above, it is possible to conclude that (PhSe)₂ is a compound with low developmental toxicity, since adverse effects observed were only manifested at a high level dose. Of particular importance, (PhSe)₂ possess its pharmacological properties at doses lower than those tested here.

Keywords: Selenium, Diphenyl Diselenide, Developmental Toxicity, Paternal and Maternal Exposures and Rats.

LISTA DE FIGURAS

1. Introdução

Figura 1. Estrutura Química do Disselento de Difenila 10

Artigo 1

Figura 1. Structure of diphenyl diselenide 18

Figura 2. Maternal body weight gain during gestation. Data are recorded as percent of initial weight x gestation days. Dams that received 50 or 100 mg/kg (PhSe)₂ or canola oil at GD 6 (a), at GD 10 (b) or at GD 17 (c) 19

Figura 3. Maternal body weight gain during gestation. Data are recorded as percent of initial weight x gestation days. Dams that received 100 mg/kg (PhSe)₂ or canola oil at GD 7-9 (a) or at GD 10-12 (b) 19

Figure 5. Rat fetuses obtained from dams exposed to 100 mg/kg (PhSe)₂ showing: (1) skull bones anomalies, (2) misshapen, reduced number and incomplete ossification of sternbrae and (3) wavy ribs. Fetuses were cleared with KOH and skeletons were stained with Alizarin Red S 22

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Evaluation of maternal and fetal parameters. 20

Tabela 2. Incidence of skeletal anomalies in fetuses of female rats treated with 100 mg/kg (PhSe)₂ during distinctive days of organogenetic period. 21

Artigo 2

Tabela 1. Effect of male (PhSe)₂ exposure on body and sex organ weights. 37

Tabela 2. Effect of male (PhSe)₂ exposure on reproductive parameters in unexposed female rats and their fetuses. 38

Tabela 3. Effect of male (PhSe)₂ exposure on external and skeletal anomalies in their progeny. 39

LISTA DE ABREVIATURAS

Se – selênio

(ØSe)₂ ou (PhSe)₂ – disseleneto de difenila

GD – gestational day

Wk – week(s)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
APRESENTAÇÃO	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Teratologia	1
1.1.1. Histórico	1
1.1.2. Agentes Teratogênicos	2
1.1.2.1. Fatores Genéticos	3
1.1.2.2. Fatores Ambientais	3
1.1.3. Princípios da Teratologia	4
1.1.4. Classificação das Substâncias Químicas de Acordo com o seu Potencial Teratogênico Segundo o FDA	5
1.2. Exposição Paterna	6
1.2.1. Exposição Direta por Dano às Células Germinativas	7
1.2.2. Transporte de Substâncias Através do Líquido Seminal	8
1.2.3. Exposição Materna Passiva	8
1.3. Selênio	9
1.3.1. Atividade Biológica	9
1.3.2. Disseleneto de Difenila	10
1.3.2.1. Propriedades Farmacológicas	10
1.3.2.2. Propriedades Toxicológicas	11
1.3.3. O Selênio e a Toxicologia Desenvolvimental	11
1.3.3.1. Exposição Materna	11
1.3.3.2. Exposição Paterna	12
2. OBJETIVOS	14

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	15
3.1. Efeitos do Disselento de Difenila Sobre o Desenvolvimento Intra-Uterino da Prole de Ratas Wistar Expostas Durante o Período Gestacional	16
3.1.1 – Artigo 1: Favero AM, Weis SN, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. <i>Reprod Toxicol</i> 2005; 20:561-8.	17
3.2– Efeitos do Disselento de Difenila Sobre o Desenvolvimento Intra-Uterino da Prole de Ratos Wistar Expostos Sub-Cronicamente a Este Composto Antes do Período de Acasalamento	25
3.2.1 – Artigo 2: Favero AM, Weis SN, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Adult male rats sub-chronically exposed to diphenyl diselenide: effects on their progeny. Submetido à <i>Reproductive Toxicology</i> , está em fase de revisão.	26
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES	49
6. PERSPECTIVAS	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

APRESENTAÇÃO

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

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos, os quais encontram-se no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS**. 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 dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos para continuação do estudo do autor, referente a esse assunto.

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. TERATOLOGIA

O desejo de conceber filhos saudáveis permeia toda a história da humanidade e a preocupação com o uso de alimentos e drogas na gestação existe desde os tempos mais remotos (Schumacher, 2004; Jelínek, 2005).

A ciência que trata do estudo das malformações congênitas, ou seja, das anomalias de desenvolvimento que provocam alterações estruturais e/ou funcionais presentes ao nascimento, bem como o estudo de suas causas é a Teratologia (Wilson, 1977). O termo provém do grego "*teratos*", que significa monstro. O sentido original da palavra refere-se a malformações anatômicas macroscópicas, embora atualmente tenha se expandido sua definição para englobar anomalias mais sutis como atraso intrauterino e distúrbios bioquímicos e neuro-comportamentais. Num sentido amplo, pode-se referir como sendo o estudo de todos os aspectos do desenvolvimento pré-natal que acontecem de maneira anormal (Dicionário Internacional de Medicina e Biologia, 1986).

As manifestações do desenvolvimento anormal podem ir desde uma desordem a nível funcional, incluindo-se aqui o retardo mental, passando por um estágio de retardo no crescimento intra-uterino, malformações, e em última instância, a morte (Kalter, 2003).

1.1.1. Histórico

Antigamente, acreditava-se que o útero era intransponível a agentes externos e que a placenta constituía-se em uma verdadeira barreira entre o organismo materno e o organismo fetal. O conceito de que o feto estaria pouco exposto a substâncias utilizadas pela gestante foi abalado apenas no início da década de 60, pela “tragédia da talidomida”, um medicamento comercializado como um sedativo moderado, usado para diminuir as náuseas

em mulheres grávidas. Quantidades pequenas, como as referentes a uma simples dose, foram suficientes para causar defeitos significativos ao nascimento. Milhares de crianças malformadas nasceram de mulheres que ingeriram a talidomida durante a gestação. Os fetos expostos à talidomida apresentaram intestinos malformados, defeitos na audição, ausência de orelhas, anomalias renais e oculares. No entanto, o fenótipo que mais chamou a atenção foi a focomelia: síndrome caracterizada pela aproximação ou encurtamento dos membros junto ao tronco do feto (Smithells & Newman, 1992). Como o seu uso havia se mostrado seguro em várias espécies animais, foram necessários vários anos e altas taxas de malformações (20-30%) para a confirmação dos seus efeitos adversos em humanos.

Atualmente, sabe-se que a maioria dos fármacos contidos nos medicamentos utilizados por gestantes atravessa a placenta e atinge a corrente sanguínea do feto. Não se trabalha mais com o conceito de “barreira placentária”. Deve-se considerar então, que quando uma gestante ingere ou recebe qualquer medicamento, dois organismos serão afetados, sendo que um deles (o organismo embrio-fetal) ainda não tem a mesma capacidade de metabolizar as substâncias que a mãe, pois não possui os sistemas corporais plenamente desenvolvidos, estando, portanto, sujeito a efeitos negativos não esperados (Laporte e cols., 1989).

1.1.2. Agentes Teratogênicos

Um agente teratogênico ou teratógeno é definido como qualquer substância, organismo, agente físico ou estado de carência que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, produz uma alteração na estrutura ou função da descendência (Opitz, 1982). Essas alterações podem se refletir como perda da gestação, malformações ou alterações funcionais (retardo de crescimento, por exemplo), ou ainda distúrbios neuro-comportamentais, como o retardo mental (Kalter, 2003).

As anomalias congênitas podem ser resultantes de fatores genéticos e fatores ambientais ou pela combinação destes dois fatores (etiologia multifatorial). Em muitas das anomalias não se pode determinar com segurança a sua causa.

1.1.2.1. Fatores Genéticos

São de dois tipos:

a) *fatores gênicos*: são aqueles que envolvem a herança dos genes que causam a anomalia. Um exemplo de malformação oriunda desse fator é a polidactilia, (indivíduo apresentando mais de cinco dedos, principalmente nas mãos).

b) *fatores cromossômicos*: abordam as aberrações cromossômicas representadas pelo número anormal de cromossomos. Um exemplo é a trissomia do 21 (Síndrome de Down). São responsáveis pela grande maioria das malformações ou aproximadamente 85% dos defeitos com causa conhecida.

1.1.2.2. Fatores Ambientais

a) *agentes infecciosos*: um teratógeno desse tipo é o vírus da rubéola, cuja infecção, nas primeiras quatro semanas após a concepção, possui altos riscos de gerar defeitos cardíacos e oculares (Swan & Tostevin, 1946). Outros agentes causadores de infecções são conhecidos por induzirem diversos tipos de alterações congênitas, como por exemplo, o vírus influenza (Arvin & Maldonado, 1995), o citomegalovírus (Stagno, 1995), o protozoário parasita *Toxoplasma gondii* (Alfors e cols., 1983; Remington e cols., 1995) e o vírus *Varicella-zoster* (Alkalay e cols., 1987; Higa e cols., 1987; Gershon, 1995).

b) *agentes químicos*: envolvem substâncias químicas e drogas utilizadas na gestação. Alguns exemplos clássicos seriam a talidomida, abordada anteriormente (Newman, 1986; Lenz, 1988), o ácido retinóico, utilizado no tratamento da acne (Soprano & Soprano, 1995) e o ácido valpróico, um medicamento usado para o tratamento de convulsões (Nau e cols., 1991; Ehlers e cols., 1992). O álcool também é reconhecido como um agente teratogênico, causando hipoplasia maxilar, microcefalia, retardo de crescimento e da maturação psicomotora (Jones & Smith, 1973; Streissguth e cols., 1980).

c) *agentes físicos*: destaca-se, principalmente, a radiação. Os raios X, por exemplo, podem causar defeitos oculares e cranianos e mortalidade fetal (Murphy, 1929; Goldztein & Murphy, 1929; Russel, 1954; Wilson, 1954). Outro tipo de radiação que causa preocupação pelas suas conseqüências sobre o organismo é a radiação atômica. Nas explosões das bombas atômicas em Hiroshima e Nagasaki, em 1945, por exemplo, muitas

crianças japonesas que estavam se desenvolvendo foram afetadas e nasceram com anormalidades. Uma das malformações que apareceram foi a microcefalia, isto é, a redução da circunferência da cabeça do feto, com subsequente retardo mental (Warkany e cols., 1981).

1.1.3. Princípios Básicos da Teratologia

A ação de um agente teratogênico sobre o embrião ou feto em desenvolvimento depende de diversos fatores e então, para o estudo deste ramo da ciência devemos levar em consideração os seguintes princípios (Wilson, 1977):

a) *Estágio de desenvolvimento do conceito*: é fundamental o conhecimento das etapas do desenvolvimento embrionário, pois alguns estágios do desenvolvimento são mais vulneráveis que outros. É importante salientar que normalmente os agentes atuam não apenas em uma estrutura específica, mas em um grande número de estruturas que estão se definindo durante determinado momento. Portanto, a exposição intra-uterina a agentes teratogênicos em períodos de desenvolvimento e sensibilidade diferentes pode levar ao aparecimento de efeitos tóxicos diversos sobre o organismo embrio-fetal e, conseqüentemente, serem observados, ao nascimento, como diferentes alterações. Podemos citar, como exemplo, a infecção pelo vírus da rubéola em humanos, a qual determina o aparecimento de alterações oculares, com destaque à retinopatia, catarata e microftalmia se adquirida durante a sexta semana de gestação e, o condicionamento de surdez congênita se a infecção ocorre na oitava semana.

Como podemos observar, o período gestacional em que acontece a exposição a um determinado agente é um fator relevante, levando à divisão da gestação em três fases:

- *período do ovo*: da fecundação à implantação. Ocorre antes da segunda semana de desenvolvimento em humanos. Geralmente, se ocorre algum tipo de insulto reprodutivo não há a implantação do embrião e se dá o aborto espontâneo.

- *período embrionário*: da segunda à oitava semana pós-fecundação. É o período de pico em relação à divisão celular, diferenciação e morfogênese do embrião (período principal de organogênese), sendo por isso o período mais crítico com relação ao aparecimento de malformações (período teratogênico clássico).

- *período fetal*: de oito semanas completas pós-fertilização até o término. Os efeitos da exposição a um determinado agente teratogênico neste período se produzem principalmente sobre o sistema nervoso central (SNC), que continua se diferenciando, bem como sobre o crescimento fetal.

b) *Genótipo materno-fetal*: A heterogeneidade genética tanto da mãe como do feto pode conferir maior suscetibilidade ou resistência à manifestação de um determinado agente. Sabe-se que a constituição genética de uma população é um fator importante de predisposição a determinado efeito teratogênico. Assim, um agente pode ser teratogênico para uma determinada população e/ou raça, e não para outras.

c) *Relação entre dose e efeito*: as manifestações do desenvolvimento anormal aumentam à medida que se aumenta a dose do agente, variando desde nenhum efeito, passando pelos danos funcionais e malformações até a morte do organismo embrio-fetal.

d) *Mecanismo patogênico específico de cada agente*: os agentes teratogênicos atuam por caminhos específicos (mecanismos) no desenvolvimento das células e dos tecidos para iniciar os eventos de um desenvolvimento anormal (patogênese).

1.1.4. Classificação das Substâncias Químicas de Acordo com o seu Potencial Teratogênico Segundo o FDA (Food and Drug Administration)

Existem algumas classificações de medicamentos conforme o risco associado ao seu uso durante a gravidez. Segundo a classificação adotada pelo FDA, os medicamentos podem ser enquadrados em cinco categorias (Kelsey, 1982):

- Categoria A: medicamentos para os quais não foram constatados riscos para o feto em ensaios clínicos cientificamente desenhados e controlados;

- Categoria B: medicamentos para os quais os estudos com animais de laboratório não demonstraram risco fetal (mas não existem estudos adequados em humanos) e medicamentos cujos estudos com animais indicaram algum risco, mas que não foram comprovados em humanos em estudos devidamente controlados;

- Categoria C: medicamentos para os quais os estudos em animais de laboratório revelaram efeitos adversos ao feto, mas não existem estudos adequados em humanos, e medicamentos para os quais não existem estudos disponíveis;

- Categoria D: medicamentos para os quais a experiência de uso durante a gravidez mostrou associação com o aparecimento de malformações, mas que a relação risco-benefício pode ser avaliada;

- Categoria X: medicamentos associados com anormalidades fetais em estudos com animais e em humanos e/ou cuja relação risco-benefício contra-indica seu uso na gravidez.

Considerando o acima mencionado, é importante estabelecer se um agente pode atuar como um teratígeno não só para que se possa prevenir o aparecimento de anormalidades congênitas, como também para que se possa desenvolver novas drogas que sejam seguras para o uso terapêutico em mulheres grávidas. Portanto, o presente estudo visa abordar, num primeiro momento, os efeitos do disselento de difenila $[(\text{OSe})_2]$ sobre o desenvolvimento intra-uterino da prole de ratas Wistar expostas durante o período gestacional, a fim de verificar o possível efeito teratogênico deste composto.

1.2. EXPOSIÇÃO PATERNA

Outro assunto de interesse desta dissertação é o efeito do $(\text{OSe})_2$ sobre o desenvolvimento intra-uterino da prole de ratos Wistar expostos a este composto durante o período que antecede o acasalamento.

A exposição a agentes químicos pode resultar em efeitos tóxicos sobre a reprodução de mamíferos não somente durante o período que compreende a gestação, mas durante todo o seu ciclo reprodutivo (Lemonica, 1996). Nas últimas décadas há um crescente interesse sobre os possíveis efeitos toxicológicos de produtos naturais ou sintéticos sobre o sistema reprodutor masculino (USEPA, 1996). As alterações reprodutivas relacionadas à exposição paterna não se mostram ainda tão claras e definidas como ocorre na exposição materna, mas as poucas evidências relativas a este tipo de exposição são mais relacionadas ao baixo número de pesquisas feitas nesta área do que à ausência de causalidade (Davis e cols., 1992). Contudo, alguns estudos demonstram que a exposição de indivíduos do sexo masculino a certos agentes pode afetar de maneira adversa o desenvolvimento de sua progênie.

Os defeitos no desenvolvimento resultantes da exposição paterna em humanos e em animais incluem diminuição no peso e tamanho da ninhada, abortos, malformações congênitas, tumores e anormalidades neuroquímicas e comportamentais (Friedler, 1985; 1996; Joffe & Soyka, 1981; Joffe e cols., 1990; Davis e cols., 1992; Colie, 1993; Olshan & Faustman, 1993; Mattison & Olshan, 1994; Nelson e cols., 1996).

Há três possíveis vias de toxicologia reprodutiva relacionadas à exposição paterna (Olshan e cols., 1991; Davis e cols., 1992; Spritzer, 2001):

1.2.1. Exposição Direta por Dano às Células Germinativas

a) Por inibição da espermatogênese: o processo completo da espermatogênese dura, em média, 64 dias, e ocorre durante toda a vida do homem. Portanto, na maioria dos casos, a resposta a drogas e outras substâncias é agudo. Contudo, se desta exposição resultar oligospermia ou azoospermia, pode ocorrer infertilidade, e o grau de reversibilidade depende do agente específico e da dose deste recebida pelo paciente. O álcool, um exemplo importante pela alta prevalência de seu uso, se usado cronicamente, pode causar hipogonadismo e infertilidade (Schilsky e cols., 1980; Davis e cols., 1992; Robaire & Hales, 1993).

b) Por alterações morfológicas: a diminuição da motilidade é o efeito de maior importância neste caso, e influi diretamente na trajetória do espermatozóide até o óvulo e sua penetração neste (Davis e cols., 1992; Zhang e cols., 1992). Teoricamente, poderia estar relacionado a defeitos funcionais grosseiros de embriogênese ou fetogênese, isto se ocorrer fecundação.

c) Por alterações cromossômicas: ocorrem principalmente as aneuploidias (trissomias, monossomias, etc), por não disjunção dos cromossomos na meiose I ou II, além de quebras e outras alterações (Olshan e cols., 1991). Um dos principais exemplos de indutores de aberrações cromossômicas é a exposição a altos níveis de radiação.

d) Por alterações gênicas: são mutações que podem ocorrer em qualquer região do genoma das células germinativas, que podem ser transmitidas à prole mesmo muito tempo depois de ter ocorrido por determinada exposição. Sabe-se ainda que as mutações nos gametas masculinos são muito mais frequentes que nos gametas femininos, pela alta taxa de

reprodução das espermatogônias. O cigarro, mais especificamente, pode estar associado a malformações congênitas e neoplasias na infância por causar mutagênese das células germinativas e diminuir a reparação gênica das mesmas (Zhang e cols., 1992).

1.2.2. Transporte de Substâncias através do Líquido Seminal

Neste tipo de transmissão, a substância em questão deve estar presente em quantidade significativa no líquido seminal. As substâncias presentes no líquido seminal podem entrar no trato reprodutivo da fêmea durante a relação sexual interferindo diretamente no desenvolvimento fetal. Além disso, estas substâncias podem ligar-se a componentes do espermatozóide e penetrar no ovócito durante a fertilização, afetando a seqüência normal do desenvolvimento (Lutwak-Mann, 1964; Trasler e Doerksen, 1999). A motilidade dos espermatozoides pode ser também reduzida por substâncias dissolvidas no líquido seminal, podendo ocasionar infertilidade temporária.

Várias substâncias químicas foram identificadas nos fluídos de todos os componentes do sistema reprodutor masculino em animais e no fluído seminal em humanos (Gerber & Lynn, 1976; Mann & Lutwak-Mann, 1982). Ainda não está completamente estabelecido se a presença de um agente exógeno no fluído seminal pode alterar o desenvolvimento embrio-fetal em humanos. No entanto, estudos em animais relacionaram a presença de algumas drogas conhecidas no sêmen, como por exemplo, a morfina, a talidomida e a ciclofosfamida a um aumento na mortalidade perinatal e diminuição no peso fetal (Blatt e cols., 1980). Além disso, a presença da talidomida no sêmen de coelhos está diretamente correlacionada com o aparecimento de malformações congênitas (Lutwak-Mann, 1964).

1.2.3. Exposição Materna Passiva

Ocorre principalmente por substâncias trazidas pelo marido (ou outra pessoa) do seu local de trabalho, seja no uniforme ou no próprio corpo. Exemplo: agrotóxicos, chumbo, cigarro, berílio (Olshan e cols., 1991; Davis e cols., 1992).

Existem muitas limitações nos estudos clínicos e epidemiológicos em humanos, incluindo a dificuldade de identificar o agente químico envolvido, bem como controlar a dose e o tempo da exposição paterna ao determinado agente. Devido às similaridades no processo de espermatogênese em roedores e humanos, os estudos realizados com animais de laboratório podem fornecer uma indicação dos possíveis efeitos mediados pela exposição paterna em humanos (Norris e cols., 1990).

Diante do acima mencionado, um outro aspecto a ser abordado neste estudo é a avaliação dos efeitos do $(\text{OSe})_2$ sobre o desenvolvimento da prole de ratos Wistar expostos sub-cronicamente a este composto no período que precede o acasalamento.

1.3. Selênio

O selênio (Se) foi descoberto em 1817, pelo químico sueco J. J. Berzelius. O Se é um elemento do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

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

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

1.3.1. Atividade biológica

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

Nos últimos anos, tem sido descrito que baixos níveis de Se podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose, doença cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000). Neste contexto, a suplementação de dietas com Se, tanto para animais quanto para

humanos, tem sido aceita pela comunidade científica. A Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50-200 μg de Se, a qual é considerada segura para indivíduos adultos (Food and Nutrition Board, 1989).

O Se apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante como um antioxidante. Já é conhecido que o Se está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas glutathione peroxidase (Flohé et al., 1973), tioredoxina redutase (Holmgren, 1985), 5'-deiodinase (Behne e Kyriakopoulos, 1990) e selenoproteína P (Ursini et al., 1990). A atividade redox do Se tem fundamental importância para o sítio catalítico dessas enzimas.

1.3.2. Disseleneto de Difenila

O disseleneto de difenila $[(\text{OSe})_2]$ – figura 1] é um composto orgânico que contém Se, portanto um organocalcogênio, largamente utilizado como intermediário em reações de síntese orgânica (Paulmier, 1986; Braga e cols., 1996). A partir da década de 30, os organocalcogênios têm sido alvos de interesse para os químicos orgânicos em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas (Comasseto, 1983), suas propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham & Graf, 1991; Kanda e cols., 1999; Nogueira e cols., 2003a). Conseqüentemente, o risco de contaminação ocupacional por organocalcogênios tem motivado estudos toxicológicos.

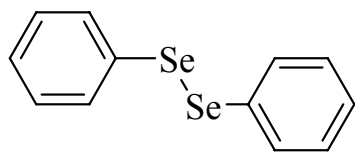


Figura 1. Estrutura química do Disseleneto de Difenila

1.3.2.1. Propriedades Farmacológicas

Vários relatos foram publicados sobre compostos de Se que mimetizam a atividade da enzima glutathione peroxidase. Além disso, um estudo recente relatou que disselenetos de diarila apresentaram atividade antioxidante em camundongos. O $(\text{OSe})_2$ demonstrou ser

mais ativo como mimético da glutathiona peroxidase (Meotti e cols., 2004) e menos tóxico em roedores do que o ebselen (Meotti e cols. 2003; Nogueira e cols. 2003b). Além disso, nosso grupo de estudo tem demonstrado que o $(\text{OSe})_2$ possui outras propriedades farmacológicas, tais como efeitos anti-úlceras (Savegnago e cols., 2006), hepatoprotetor (Borges e cols., 2005), anti-inflamatório e antinociceptivo (Nogueira e cols., 2003a, Zasso e cols., 2005).

1.3.2.2. Propriedades Toxicológicas

Além das propriedades farmacológicas, os compostos orgânicos de Se, incluindo o $(\text{OSe})_2$, são conhecidos por induzir toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Dados do nosso laboratório têm mostrado que formas orgânicas de Se podem ser neurotóxicas (Moretto e cols., 2003; Nogueira e cols., 2003c), causar toxicidade renal (Meotti e cols., 2003) para roedores adultos, ou serem nocivas para proteínas ou enzimas de vários tecidos de mamíferos, tais como a enzima δ -ALA-D (Barbosa e cols., 1998; Maciel e cols., 2000; Farina e cols., 2001; Bolzan e cols., 2002; Nogueira e cols., 2003b).

1.3.3. O Selênio e a Toxicologia Desenvolvidamental

1.3.3.1. Exposição materna

O elemento Se, dependendo da dose, pode ser tóxico para diversas espécies de animais (Painter, 1941). Quando administrado durante a gestação, foi observado que este elemento atravessa a barreira placentária e é distribuído aos tecidos fetais (Shariff e cols., 1984; Bedwal & Bahuguna, 1994). Apesar de determinados estudos apontarem para uma relação entre a exposição ao Se e problemas reprodutivos, a teratogenicidade deste elemento não tem sido claramente demonstrada (Willhitte, 1993).

A exposição a formas inorgânicas de Se causa o aparecimento de malformações embrionárias em patos (Hoffman & Heinz, 1988) e galinhas (Palmer e cols., 1973). Em camundongos, o Se causa aborto e retardo no crescimento dos fetos expostos a doses materno-tóxicas, mas não mostrou efeitos teratogênicos (Yonemoto e cols., 1983). Não

foram observadas malformações fetais em macacas prenhas que receberam selenometionina durante a gestação (Tarantal e cols., 1991). Por outro lado, esse mesmo composto foi teratogênico em hamsters (Ferm e cols., 1990). O selenito, selenato, selenometionina e selenocistina provocaram o aparecimento de malformações fetais em cultura de embriões de rato (Usami & Ohno, 1996).

Apesar dos estudos já realizados, não há dados referentes ao possível efeito tóxico do $(\text{OSe})_2$ sobre o desenvolvimento intra-uterino em roedores.

1.3.3.2. Exposição paterna

O Se é um micronutriente requerido para o processo da espermatogênese e, portanto, essencial para a função reprodutiva em machos (Behne e cols., 1982; Maiorino e cols., 1999). Estudos demonstraram que existe um importante aumento no conteúdo de Se testicular em animais no início do amadurecimento sexual e, além disso, que a suplementação moderada com Se tem efeitos benéficos sobre a reprodução em animais de laboratório, de fazenda e no próprio homem (Behne e cols., 1986; Bedwal & Bahuguna, 1994; Hansen & Deguchi, 1996). A deficiência nos níveis de Se está associada com um prejuízo na motilidade do espermatozoide, alterações estruturais na peça intermediária e diminuição dos flagelos dos espermatozoides (Behne e cols., 1996).

Os estudos sobre o sistema reprodutor masculino têm explorado primariamente os efeitos de agentes tóxicos sobre a fertilidade, dando menor importância aos possíveis efeitos sobre o desenvolvimento intra-uterino.

Existem poucos estudos sobre a toxicidade reprodutiva de compostos de Se, especialmente com formas orgânicas, em indivíduos do sexo masculino. De acordo com os estudos referentes à fertilidade masculina, verificou-se que esta não é afetada em camundongos suplementados com uma dieta normal ou com quantidades excessivas de Se (Kaur & Bansal, 2005). Entretanto, neste mesmo estudo, foi demonstrado que a suplementação com uma dieta deficiente em Se causou prejuízo na fertilidade, diminuição no peso e no número de fetos por ninhada (Kaur & Bansal, 2005).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a exposição ao $(\text{OSe})_2$ (aguda ou sub-crônica) não causa nenhum tipo de prejuízo nos parâmetros reprodutivos

avaliados em ratos Wistar (índice de fertilidade, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e histopatologia testicular) (Stangherlin et al., 2006a).

Não há estudos no que diz respeito ao aparecimento de malformações congênitas após longos períodos de exposição ao $(\text{OSe})_2$ de pais do sexo masculino. Tendo em vista que o aparecimento de anormalidades na prole de indivíduos do sexo masculino expostos a um determinado agente não é usualmente acompanhado por alterações na fertilidade ou em qualquer outro índice de sucesso reprodutivo (Friedler, 1996), é de extrema importância avaliar quais são as conseqüências sobre o desenvolvimento embrio-fetal da prole de ratos expostos a doses de $(\text{OSe})_2$ que não prejudicam a sua fertilidade.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- Avaliar o possível efeito teratogênico do $(\text{OSe})_2$, administrado na gestação em ratas Wistar;
- Identificar o período-alvo da toxicidade desenvolvimental do $(\text{OSe})_2$, administrado em dias específicos da gestação, em ratas Wistar;
- Identificar as possíveis alterações esqueléticas fetais, após a administração do $(\text{OSe})_2$ em ratas Wistar prenhas;
- Avaliar o efeito do $(\text{OSe})_2$ sobre o desenvolvimento da prole de ratos Wistar expostos sub-cronicamente a este composto no período que precede o acasalamento.

3- ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais encontram-se aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. O **artigo 1** está disposto na forma que foi publicado na edição da revista científica e o **artigo 2** está disposto na forma que foi submetido para revisão (ainda não publicado).

**3.1 – EFEITOS DO DISSELENTO DE DIFENILA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
INTRA-UTERINO DA PROLE DE RATAS WISTAR EXPOSTAS DURANTE O
PERÍODO GESTACIONAL**

Artigo 1

**TERATOGENIC EFFECTS OF DIPHENYL DISELENIDE
IN WISTAR RATS**

FAVERO, A.M., WEIS, S.N., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G.,

ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W.

Reproductive Toxicology, 20 (2005) 561-568.



Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats

Alexandre M. Favero, Simone N. Weis, Eluza C. Stangherlin,
Gilson Zeni, Joao B.T. Rocha, Cristina W. Nogueira*

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

Received 10 February 2005; received in revised form 6 April 2005; accepted 30 April 2005

Available online 20 June 2005

Abstract

Diphenyl diselenide is an organoselenium compound with potential therapeutic use. The present study evaluates the effects of single maternal subcutaneous injection of 50 and 100 mg/kg diphenyl diselenide [(PhSe)₂] at gestational days (GD) 6, 10 or 17 in Wistar rats. The highest dose of (PhSe)₂ was also administered at GD 7–12. External and internal fetal soft-tissue examination was performed at GD 20. No mortality was observed in fetuses or dams at any (PhSe)₂ treatment group. Neither did exposure to (PhSe)₂ cause significant changes to fetal body weight, organ weight, or fetal size when administered at GD 6–8, 10–12 or 17. Exposure to 100 mg/kg (PhSe)₂ at GD 9 produced significant changes in fetal biometry (crown-rump (CR) length) and body weight. No significant increase in the proportion of fetuses with external visible abnormalities was observed in groups exposed to (PhSe)₂. Skeletal anomalies were observed in fetuses in the GD 9–11 treatment groups and included incomplete ossification of cranial bones, misshapen and incomplete ossification of sternbrae, reduced sternbrae number, wavy and extra ribs, incomplete ossification of fore and hindpaw bones and incomplete ossification of sacral and caudal bones. We conclude that maternal administration of (PhSe)₂ during GD 7–12 led to increased incidences of these skeletal variations or anomalies, but did not cause externally visible malformations in rat fetuses.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Selenium; Diphenyl diselenide; Teratogenicity; Pregnancy; Rats; Toxicity

1. Introduction

Selenium is an essential trace element for mammalian and avian species [1–3], but can also act as a significant environmental toxicant [4]. Many selenium-containing enzymes and proteins are essential for normal growth, development, and metabolism [5–9]. Selenium is essential to the function of several enzymes having physiological antioxidant properties, including different classes of glutathione peroxidase [10–12]. The mammalian thioredoxin reductase [13], 5'-deionase [14] and selenoprotein P [15] are also known to be selenium-containing proteins.

Inorganic selenium compounds have been widely used in industry [16]; therefore, it is part of the public health concern for occupational and environmental exposures. Among the potential adverse effects derived from exposure to metals,

developmental toxicity is a serious risk [17]. Selenium is a teratogen in birds and a suspected teratogen in mammal [18]. Selenite, selenate and selenomethionine all cause embryonic malformations such as hydrocephaly, beak defects, microphthalmia, anophthalmia and foot defects in ducks [19,20] and chicken [21–23] when given to hen or injected to eggs. In contrast, the teratogenicity of selenium has not been clearly shown in mammals. No fetal malformations were observed in pregnant monkeys who received selenomethionine at doses that causing maternal toxicity [24]. In hamsters, selenite, selenate and selenomethionine caused fetal malformations, mainly encephalocoele and exencephaly, at exposures causing maternal toxicities such as lethargy and body weight reduction [25]. In mice, inorganic selenium caused resorption and growth retardation of fetuses at maternotoxic doses, but showed no teratogenic effects [26]. It was previously reported that rat embryos had susceptibility to selenium teratogenicity [27]. Despite of several studies on the effects of selenium in gestational periods have been reported in the literature,

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8140; fax: +55 55 3220 8978.
E-mail address: criswn@quimica.ufsm.br (C.W. Nogueira).

there are no available data concerning the teratogenicity of diphenyl diselenide in rats.

Organoselenium compounds, including diphenyl diselenide, are recognized as toxic *in vitro* and *in vivo*. Accordingly, data from our laboratory have shown that organic forms of selenium can be neurotoxic [28] for adult rodents (mice and rats), or noxious for mammalian enzyme systems [29–33]. Furthermore, studies showed that a low dose of diphenyl ditelluride, a structural analogous of diphenyl diselenide, can be teratogenic in rats [34]. On the other hand, *in vitro* studies reported that organoselenium compounds (alkyl and aryl diselenides) are potential antioxidant compounds [35,36]. Our group has reported that diphenyl diselenide possess therapeutic potential due to hepatoprotective, anti-inflammatory and anti-nociceptive properties [37,38].

Taking into account the importance of diphenyl diselenide [(PhSe)₂] as an intermediate in organic synthesis [39,40], the possibility of occupational exposure to this compound and its possible potential use as a component of a range of therapeutic agents [38,41], the present study has been undertaken to assess the effect of diphenyl diselenide on intrauterine development in distinctive periods of pregnancy in Wistar rats.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Diphenyl diselenide (Fig. 1) was synthesized according to published methods [42]. Analysis of the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed that the compound obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of (PhSe)₂ (99.9%) was determined by GC/HPLC. This drug was dissolved in canola oil, which was obtained from standard commercial supplier. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Animals

Nulliparous Wistar rats (170–250 g) from our own breeding colony were used in these studies. The colony was housed in separate quarters on a 12-h light/12-h dark cycle, at room temperature, with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of Sao Paulo, Brazil.

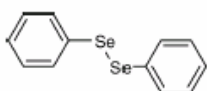


Fig. 1. Structure of diphenyl diselenide.

2.3. Experimental procedures

Females in the proestrous and estrous phases of the cycle were bred to mature males (3:1) overnight. The onset of pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa in vaginal smears on the following morning, defined as gestation day (GD) 0 [43]. Dams were randomly assigned into groups of 6–18 pregnant rats each and housed individually in standard plastic cages.

One group of dams received a single dose of 50 mg/kg (PhSe)₂ by subcutaneous (s.c.) injection on gestation days 6, 10 or 17. Another group of dams were administered a single s.c. dose of 100 mg/kg (PhSe)₂ on GD 6–12 or 17. The volume of each dose was adjusted to 1 ml/kg total body weight. Control groups received only canola oil vehicle. The dose level was guided by results of LD₅₀ studies conducted in our laboratory [44]. Dams were daily examined for obvious signs of illness. Maternal weight was recorded daily to GD 20.

On GD 20, dams were euthanized by decapitation. The uterus, maternal liver, brain, kidney and spleen were removed and weighed. The gravid uterus was further examined for the presence of dead and live fetuses. Fetuses were removed, separated from placenta, weighed and examined under magnification for gross external malformation. The viability of the fetuses was determined by the presence of spontaneous breathing or responses to tactile stimulation. Findings were classified as variations or malformations, according to currently used nomenclature [45]. Fetal biometry was performed [46]: crown-rump (CR) length; occipito-nasal length; trans-cervical diameter; trans-umbilical diameter.

After finding a litter with external malformation after maternal exposure to 100 mg/kg (PhSe)₂ at GD 10, further evaluation of skeletal anomalies was undertaken for exposure during the organogenetic period (GD 7–12). To identify internal skeletal variations and anomalies a sample of each litter was preserved in 70% ethanol and stained with Alizarin Red S [47].

2.4. Statistical analysis

The litter was used as the experimental unit. Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test when appropriate. Statistical analysis of incidence data (fetuses with skeletal anomalies) was performed using the chi-square test. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Maternal observation

Dams administered 50 or 100 mg/kg (PhSe)₂ at different days of gestation showed no signs of illness or abnormal behavior and appeared normal. No maternal lethality was

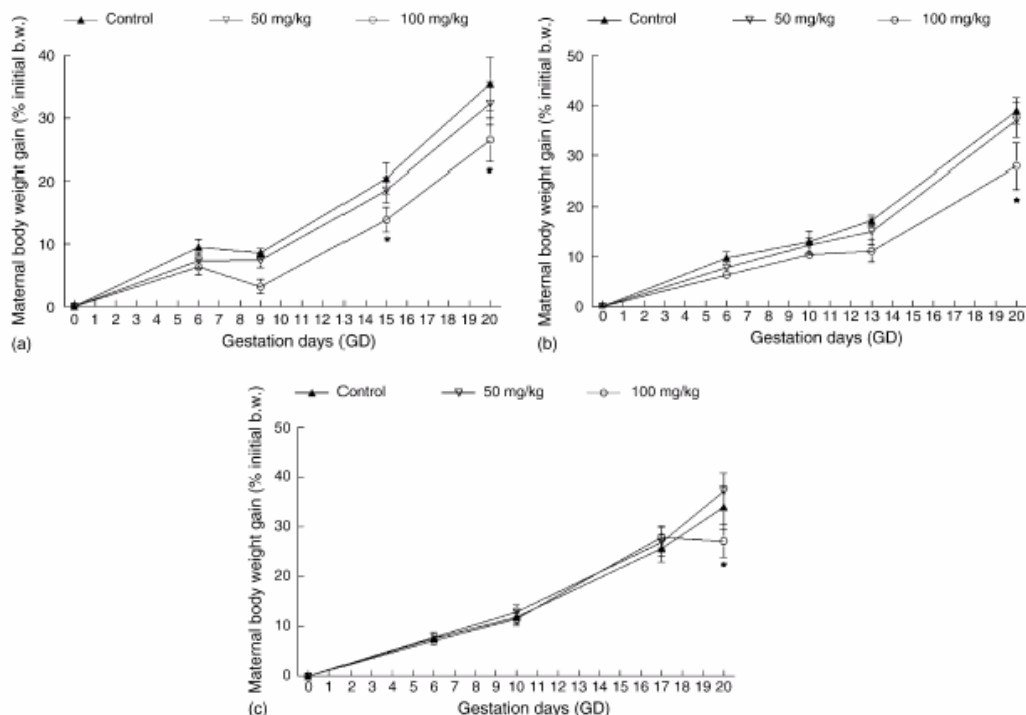


Fig. 2. Maternal body weight gain during gestation. Data are recorded as percent of initial weight \times gestation days. Dams that received 50 or 100 mg/kg (PhSe)₂ or canola oil at GD 6 (a), at GD 10 (b) or at GD 17 (c). Data are reported as mean \pm S.E.M. *Denote $p < 0.05$ as compared to respective control group.

noted. Maternal body weight gain in the 100 mg/kg (PhSe)₂ group at GD 6 was significantly lower than the vehicle control group when monitored on GD 15 and GD 20 (Fig. 2a). Maternal body weight gain at GD 7, 9 and 11 was significantly lower 3 days after treatment with 100 mg/kg (PhSe)₂ versus the control group (Fig. 3a and b). Treatment at the highest dose tested, and at all periods except GD 8, signifi-

cantly decreased maternal body weight gain at GD 20 versus the controls (Figs. 2b, c, 3a and b). In contrast, treatment with 50 mg/kg (PhSe)₂ at GD 6, 10 or 17 did not significantly affect maternal body weight gain (Fig. 2a–c). There were no significant differences in maternal organ weights (liver, brain, kidney and spleen) at term for any treated or control group under the conditions tested here (Table 1).

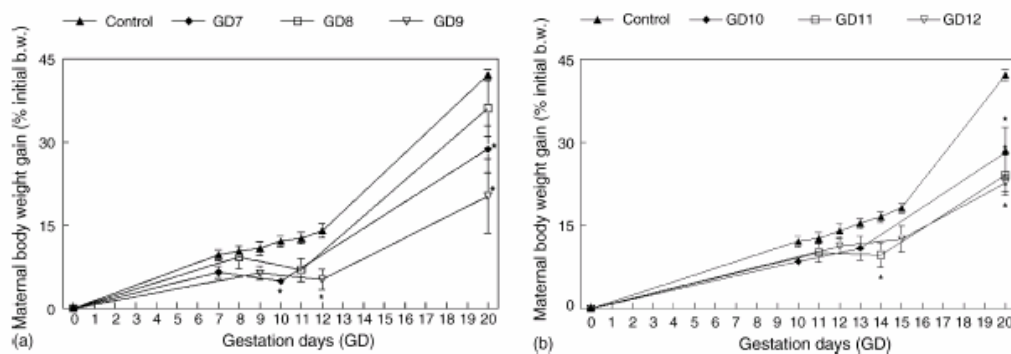


Fig. 3. Maternal body weight gain during gestation. Data are recorded as percent of initial weight \times gestation days. Dams that received 100 mg/kg (PhSe)₂ or canola oil at GD 7–9 (a) or at GD 10–12 (b). Data are reported as mean \pm S.E.M. *Denote $p < 0.05$ as compared to respective control group.

Table 1
Evaluation of maternal and fetal parameters

	Control ^a	100mg/kg (PhSe) ₂						
		GD 6	GD 7	GD 8	GD 9	GD 10	GD 11	GD 12
Maternal parameters								
No. of dams	26	10	8	6	8	18	8	6
Maternal body weight at GD 20	274.6 ± 5.9	263.5 ± 8.0	266.5 ± 5.9	274.5 ± 16.4	272.0 ± 14.0	270.7 ± 8.7	274.5 ± 11.6	262.0 ± 5.7
Number of total pups/litter ^b	10.21 ± 0.61	8.10 ± 0.70	10.25 ± 1.11	11.25 ± 0.86	11.00 ± 0.58	9.58 ± 0.54	9.00 ± 1.78	10.75 ± 0.86
Absolute organ weight (g) on GD 20								
Liver	10.87 ± 0.27	11.57 ± 0.34	11.50 ± 0.50	11.32 ± 0.40	11.62 ± 0.97	11.22 ± 0.43	10.90 ± 0.72	9.30 ± 0.42
Brain	1.66 ± 0.03	1.60 ± 0.05	1.68 ± 0.06	1.78 ± 0.02	1.70 ± 0.08	1.59 ± 0.05	1.80 ± 0.04	1.70 ± 0.01
Kidney	0.71 ± 0.01	0.72 ± 0.03	0.76 ± 0.04	0.75 ± 0.02	0.75 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.75 ± 0.02	0.72 ± 0.04
Spleen	0.62 ± 0.04	0.58 ± 0.02	0.65 ± 0.06	0.50 ± 0.07	0.48 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.62 ± 0.08	0.68 ± 0.10
Fetal parameters								
Dead fetuses	0	0	0	0	0	0	0	0
Body weight (g) ^b	3.21 ± 0.05	3.07 ± 0.16	3.04 ± 0.18	3.27 ± 0.31	2.73 ± 0.13 ^c	2.95 ± 0.04	2.75 ± 0.03	2.95 ± 0.14
Biometry (cm)^b								
CR length	3.53 ± 0.03	3.42 ± 0.07	3.56 ± 0.05	3.56 ± 0.11	3.33 ± 0.08 ^c	3.48 ± 0.03	3.44 ± 0.09	3.45 ± 0.08
Occipito-nasal length	1.53 ± 0.02	1.51 ± 0.03	1.52 ± 0.03	1.52 ± 0.04	1.45 ± 0.02	1.51 ± 0.02	1.50 ± 0.03	1.48 ± 0.02
Trans-cervical diameter	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.03	0.96 ± 0.05	0.93 ± 0.04	0.85 ± 0.03	1.00 ± 0.03	0.90 ± 0.01	0.90 ± 0.02
Trans-umbilical diameter	1.25 ± 0.03	1.21 ± 0.03	1.21 ± 0.04	1.24 ± 0.06	1.16 ± 0.03	1.24 ± 0.03	1.17 ± 0.01	1.16 ± 0.03
Kidney length	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.345 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.02
Organs weight (g)^b								
Brain	0.123 ± 0.004	0.116 ± 0.007	0.133 ± 0.006	0.138 ± 0.018	0.134 ± 0.010	0.124 ± 0.006	0.133 ± 0.009	0.146 ± 0.002
Liver	0.220 ± 0.008	0.198 ± 0.010	0.186 ± 0.008	0.218 ± 0.022	0.192 ± 0.024	0.201 ± 0.012	0.189 ± 0.003	0.211 ± 0.016
Litters with malformations or variations^d								
Short or absent tail	0/26	0/10	0/8	0/6	0/8	1/18	0/8	0/6
Fore- and hind-limbs	0/26	0/10	0/8	0/6	0/8	1/18	0/8	0/6
Growth retardation	0/26	0/10	0/8	0/6	0/8	1/18	0/8	0/6
Subcutaneous blood clots	0/26	0/10	0/8	0/6	0/8	1/18	0/8	0/6

Dams were acutely exposed to 100 mg/kg (PhSe)₂ during distinctive days of organogenetic period.

^a For the sake of clarity the respective control groups of each treated-group were omitted.

^b Data are recorded as mean ± S.E.M.

^c Different from control group.

^d Number of litters with malformations/number total of litters.

3.1.1. Fetal examination

(PhSe)₂ administered to dams at 50 or 100 mg/kg did not cause fetal mortality (Table 1). At 50 mg/kg, (PhSe)₂ did not produce significant changes in fetal weight and biometry when administered at GD 6, 10 and 17 (data not shown). In contrast, 100 mg/kg (PhSe)₂, administered at GD 9 produced significant changes in CR length and fetal weight (Table 1). No changes on fetal liver and brain weights were found. After internal examination of the pelvis, the size of kidneys was not different on experimental groups when compared to control group (Table 1).

There were no abnormalities in fetuses from dams treated with 50 mg/kg (PhSe)₂ on GD 6, 10 or 17. At the highest dose (100 mg/kg) external malformations were limited to a single litter (1/18) exposed at GD 10. Fetuses obtained from this litter presented short or absent tail and malformed fore- and hind-limbs. No other external malformations were noted. Subcutaneous blood clot and delayed intrauterine growth

were the only external variations found in this litter in which malformations were observed (Table 1).

The incidence of fetal skeletal anomalies was altered by exposure with (PhSe)₂ (Table 2). The observed anomalies included incomplete ossification of cranial bones, misshapen and incomplete ossification of sternbrae, reduced sternbrae number, wavy and extra ribs, incomplete ossification of fore and hindpaw bones and incomplete ossification of sacral and caudal bones (Fig. 4). The incidence of these skeletal anomalies was pronounced in fetuses of GD 9–11 exposure groups (Table 2).

4. Discussion

The present study has tested for teratological effects of (PhSe)₂ in Wistar rats. Generally, we found no maternal mortality or clinical signs of toxicity. The present study

Table 2
Incidences of skeletal anomalies in fetuses of female rats treated with 100 mg/kg (PhSe)₂ during distinctive days of organogenetic period

Parameters	Control ^a	100mg/kg (PhSe) ₂					
		Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12
Fetuses examined	40	24	18	20	18	20	16
Litters examined	14	8	6	8	8	8	6
No. fetuses showing anomalies (%) ^b							
Skull							
Frontal (inopl. oss.)	0 (0)	4 (11)*	0 (0)	6 (30)*	6 (33)*	2 (10)**	0 (0)
Parietal (inopl. oss.)	0 (0)	6 (25)*	0 (0)	10 (50)*	8 (44)*	6 (30)*	0 (0)
Interparietal (inopl. oss.)	0 (0)	6 (25)*	2 (11)**	6 (30)*	8 (44)*	8 (40)*	0 (0)
Supraoccipital (inopl. oss.)	6 (15)	6 (25)	4 (22)	12 (60)*	8 (44)*	12 (60)*	2 (12)
(bipartite ossification)	0 (0)	2 (8)	2 (11)**	0 (0)	2 (11)**	4 (20)*	0 (0)
(asymmetric)	0 (0)	0 (0)	2 (11)**	0 (0)	4 (22)*	2 (10)**	0 (0)
Squamosal (inopl. oss.)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (20)*	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Zygomaticum (inopl. Oss.)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10)**	0 (0)	0 (0)	0 (0)
(slight fused with Pj. os maxill.)	2 (5)	0 (0)	0 (0)	2 (10)	4 (22)	0 (0)	0 (0)
Cervical vertebrae (inopl. oss.)	0 (0)	4 (11)*	0 (0)	4 (20)*	4 (22)*	2 (10)**	0 (0)
Sternebrae							
(misshapened)	4 (10)	12 (50)*	12 (67)*	14 (70)*	8 (44)**	6 (30)	4 (25)
(inopl. oss.)	14 (35)	16 (67)	12 (67)	14 (70)	10 (55)	16 (80)**	10 (62)
(bipartite ossification)	0 (0)	0 (0)	2 (11)**	2 (10)**	0 (0)	0 (0)	0 (0)
(reduced sternebrae number)	0 (0)	2 (8)	2 (11)**	12 (60)*	6 (33)*	2 (10)**	0 (0)
Ribs							
(bilateral supernumerary short ribs) ^c	6 (15)	0 (0)	0 (0)	4 (20)	0 (0)	8 (40)	4 (25)
(unilateral supernumerary short rib)	2 (5)	2 (8)	2 (11)	2 (10)	4 (22)	2 (10)	0 (0)
(wavy)	2 (5)	0 (0)	0 (0)	2 (10)	0 (0)	4 (20)	2 (12)
Forepaw							
(inopl. oss. metacarpal bones)	8 (20)	20 (83)*	10 (56)**	12 (60)**	14 (78)*	14 (70)*	12 (75)*
(digits poorly ossified)	8 (20)	12 (50)	8 (44)	14 (70)*	14 (78)*	16 (80)*	10 (62)**
Hindpaw							
(inopl. oss. metatarsal bones)	0 (0)	2 (8)	0 (0)	0 (0)	2 (11)**	0 (0)	0 (0)
(digits poorly ossified)	16 (40)	20 (83)	16 (89)	18 (90)**	18 (100)**	18 (90)**	16 (100)**
Sacral vertebrae (inopl. oss.)	14 (35)	12 (50)	10 (56)	8 (40)	4 (22.2)	6 (30)	10 (62)
Caudal bones (inopl. oss.)	6 (15)	8 (33)	6 (33)	2 (10)	10 (55.5)**	6 (30)	8 (50)**

Inopl. oss. = bone incompletely ossified; Pj. os maxill. = maxillary bone, zygomatic process.

^a For the sake of clarity the respective control groups of each treated-group were omitted.

^b Data are presented as number of fetuses with anomalies and as percent of total evaluated fetuses ().

^c Lumbar ribs = they measured one half and more than one half the length of the last thoracic ribs.

* $p < 0.01$ compared to the control group by χ^2 -test.

** $p < 0.05$ compared to the control group by χ^2 -test.

established that a single s.c. administration of (PhSe)₂ did not cause external malformations on fetuses at different periods of gestation.

Administration of 100 mg/kg (PhSe)₂ resulted in a significant reduction on maternal body weight gain; however, treatment with (PhSe)₂ did not induce external malformations. The results corroborated earlier studies on rats, which did not observe negative effects on pups born to mothers given selenium during gestation [48–50]. Conversely, the administration of 100 mg/kg (PhSe)₂ at GD 10 caused one litter with malformations (short or absent tail and malformed fore- and hind-limbs) suggesting that the rat prenatal development at this stage may be sensitive to organic selenium exposure. These findings with (PhSe)₂ were similar to malformations induced by diphenyl ditelluride, a structural analogue

of (PhSe)₂. In fact, diphenyl ditelluride, at low dose, has been reported as a teratogenic compound to the rat fetuses [34].

Motivated by the appearance of external malformations in one litter, we evaluated the possible skeletal anomalies in fetuses exposed to (PhSe)₂ during organogenesis [51]. Our results suggest that acute administration of 100 mg/kg (PhSe)₂ during GD 7–12 did not induce external malformations but increased the incidence of skeletal anomalies, a sign of growth retardation or developmental delay. In addition, the fetal body weight and CR length were significantly decreased implying that exposure to (PhSe)₂ at GD 9 impaired intrauterine growth.

Selenium efficiently crosses the placenta and is distributed in fetal tissues [52,53]. Placental transfer is significantly mod-

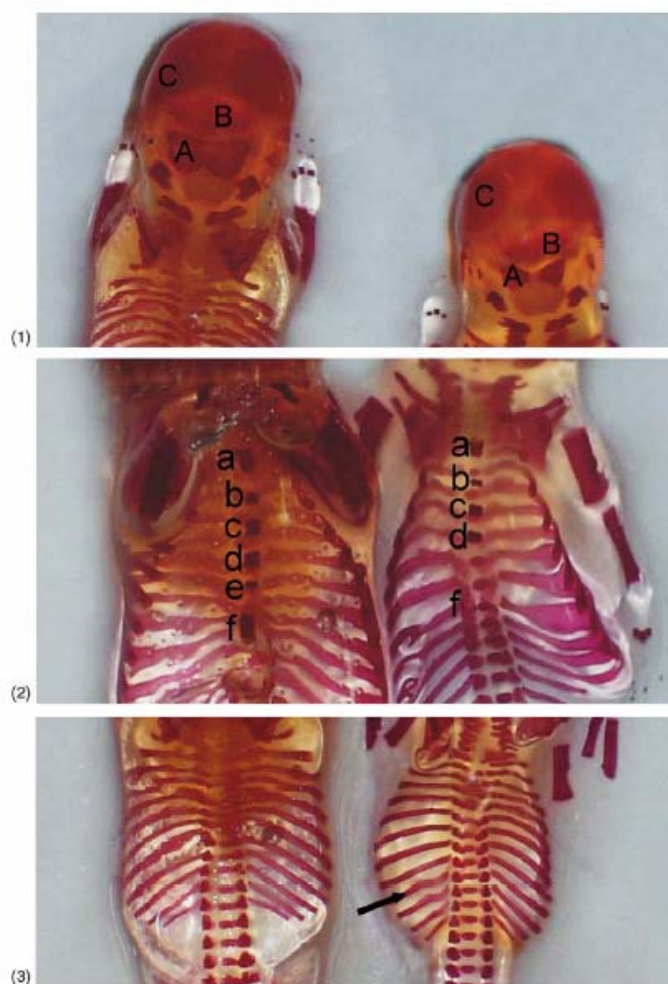


Fig. 4. (1) A rat fetus obtained from a dam exposed to 100 mg/kg (PhSe)₂ showing skull bones anomalies (right) and a control fetus (left). Os. supraoccipital bipartite (A); incl. ossification of parietal (B); interparietal bones (C). Fetuses were cleared with KOH and skeletons were stained with Alizarin Red S. (2) A rat fetus obtained from a dam exposed to 100 mg/kg (PhSe)₂ showing misshapen, reduced number and incomplete ossification of sternebrae (right) and a control fetus (left). Each sternebra was represented for a letter (a–f). Fetuses were cleared with KOH and skeletons were stained with Alizarin Red S. (3) A rat fetus obtained from a dam exposed to 100 mg/kg (PhSe)₂ showing wavy ribs (right) and a control fetus (left). Fetuses were cleared with KOH and skeletons were stained with Alizarin Red S.

erated by free drug characteristics (such as lipid solubility, degree of ionization and molecular weight) and placental properties (maternal and fetal blood flow, drug metabolism and placental age). It is evident that chemicals with a molecular weight <600 may readily cross the placenta [54]. Considering the chemistry characteristics of (PhSe)₂, such as lipid solubility and molecular weight (mol. wt. 312), we infer that this compound, like organotellurium compounds [34], could readily cross the placenta.

Other studies have examined the reproductive effects of selenium exposure in animals. In mammals, adverse reproductive effects such as eye malformations in sheep were originally reported in livestock grazing within seleniferous areas [55,56]. Despite some inconsistencies, results of subsequent experimental studies in mice administered with selenate and selenite [57–59] in hamsters [25] have suggested adverse effects of selenium compounds on fetal growth, resorption rates, and malformations such as cleft palate and encephalo-

cele. Conversely, Tarantal and collaborators [24] have failed to identify teratogenic effects among macaques administered with L-selenomethionine. Dietary sodium selenite protected against salicylate induced embryotoxicity after intravenous infusion in rats [48]. The effect of selenium against several heavy metals may also include protection against the teratogenicity of cadmium, arsenic and mercury [60,61].

Teratogenicity of (PhSe)₂ is relevant because this compound has useful pharmacological properties [33,37,38]. Indeed, in vitro studies demonstrated that (PhSe)₂ has antioxidant properties and thiol peroxidase-like activity [36,41]. The current study does not find significant teratogenicity with (PhSe)₂ exposure to pregnant Wistar rats; however, (PhSe)₂ administered to dams during organogenesis (GD 7–12) increased the incidence of skeletal anomalies, a sign of growth retardation or developmental delay. Thus, confirmatory studies in other experimental species would be warranted. Neurobehavioral and second-generation studies are also recommended to support the conclusion of prenatal hazard of the compound.

Acknowledgements

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

References

- [1] Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957;79:3292–3.
- [2] Scott ML, Olson G, Krook L, Brown WR. Selenium-responsive myopathies of myocardium and smooth muscle in the young poult. *J Nutr* 1969;91:573–83.
- [3] National Research Council. Nutrient requirements of poultry. Washington, DC: National Research Council; 1989. p. 217–24.
- [4] Fishbein L. Environmental selenium and its significance. *Fundam Appl Toxicol* 1983;4:183–90.
- [5] Stadman TC. Selenocysteine. *Ann Rev Biochem* 1996;65:83–100.
- [6] Stadman TC. Discoveries of vitamin B₁₂ and selenium enzymes. *Ann Rev Biochem* 2002;71:1–16.
- [7] Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc* 1999;99:836–43.
- [8] Gladyshev VN, Hatfield DL. Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J Biomed Sci* 1999;6:151–60.
- [9] Burk RF, Hill KE. Orphan selenoproteins. *BioEssays* 1990;21:231–7.
- [10] Flohé L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. *FEBS Lett* 1973;32:132–4.
- [11] Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoestra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:558–60.
- [12] Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri K, Gregolin C. Purification of pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxidase. *Biochem Biophys Acta* 1982;710:197–211.
- [13] Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 1985;54:237–71.
- [14] Behne D, Kyriakopoulos A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:1143–9.
- [15] Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1990;285:1393–6.
- [16] Clayton GD, Clayton FE. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. Chichester: Wiley; 1981.
- [17] Domingo JL. Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review. *J Toxicol Environ Health* 1994;42:123–41.
- [18] Willhite CC. Selenium teratogenesis. Species-dependent response and influence on reproduction. In: Keen CL, Bendich A, Willhite CC, editors. *Maternal nutrition and pregnancy outcome*, vol. 678. New York: Ann NY Acad Sci; 1993. p. 169–77.
- [19] Heinz GH, Hoffman DJ, Krynskiy AJ, Weller DMG. Reproduction in mallards fed selenium. *Environ Toxicol Chem* 1987;6:423–33.
- [20] Hoffman DJ, Heinz GH. Embriotoxicity and teratogenic effects of selenium in the diet of mallards. *J Toxicol Environ Health* 1988;24:477–90.
- [21] Franke KW, Moxon AL, Poley WE, Tully WC. Monstrosities produced by the injection of selenium slats into hens' eggs. *Anat Rec* 1936;65:15–22.
- [22] Ridgway LP, Karnofsky DA. The effects of metals on the chick embryo: toxicity and production of abnormalities in development. *Ann N Y Acad Sci* 1952;55:203–15.
- [23] Palmer IS, Arnold RL, Carlson CW. Toxicity of various selenium derivatives to chick embryos. *Poult Sci* 1973;52:1841–6.
- [24] Tarantal AF, Willhite CC, Lasley BL, Murphy CJ, Miller CJ, Cukierski MJ, Book SA, Hendrickx AG. Developmental toxicity of L-selenomethionine in *Macaca fascicularis*. *Fundam Appl Toxicol* 1991;16:147–60.
- [25] Fern VH, Hanlon DP, Willhite CC, Choy WN, Book SA. Embryotoxicity and dose-responses relationships of selenium in hamsters. *Reprod Toxicol* 1990;4:183–90.
- [26] Yonemoto J, Sato H, Himeno S, Suzuki T. Toxic effects of sodium selenite on pregnant mice and modification of the effects by Vitamin E or reduced glutathione. *Teratology* 1983;28:333–40.
- [27] Usami M, Ohno Y. Teratogenic effects of selenium compounds on cultured postimplantation rat embryos. *Teratog Carcinog Mutag* 1996;16:27–36.
- [28] Nogueira CW, Meotti FC, Curte E, Pillissão C, Zeni G, Rocha JBT. Investigations into potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 2003;83:29–37.
- [29] Barbosa NBV, Rocha JBT, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC, Braga AL. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;149:243–53.
- [30] Maciel N, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *J Biochem Mol Toxic* 2000;14:310–9.
- [31] Farina M, Folmer V, Bolzan RC, Andrade LH, Zeni G, Braga AL, Rocha JBT. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol Lett* 2001;119:27–37.
- [32] Nogueira CW, Borges VC, Zeni G, Rocha JBT. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 2003;191:169–78.
- [33] Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004;104(12):6255–86.
- [34] Stangherlin EC, Favero AM, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Teratogenic vulnerability of rat fetuses to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 2005;207:231–9.
- [35] Pamham MJ, Graf E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog Drug Res* 1991;36:9–47.
- [36] Meotti FC, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 2004;94:276–82.
- [37] Borges LP, Borges VC, Moro AV, Nogueira CW, Rocha JB, Zeni G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver

- damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 2005;210:1–8.
- [38] Nogueira CW, Quinhones EB, Jung EAC, Zeni G, Rocha JBT. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 2003;52:56–63.
- [39] Braga AL, Zeni G, Andrade LH, Silveira CC. Stereoconservative formation and reactivity of δ -chalcogen-functionalized vinylolithium compounds from bromo-vinylc chalcogens. *Synlett* 1997;5:595–6.
- [40] Silveira CC, Braga AL, Vieira AS, Zeni G. Stereoselective synthesis of enynes by nickel-catalyzed cross-coupling of divinylc chalcogenides with alkynes. *J Org Chem* 2003;68:662–5.
- [41] Rossato JI, Ketzler LA, Centurion FB, Silva SJN, Lütjke DS, Zeni G, Braga AL, Rubin MA, Rocha JBT. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 2002;3:297–303.
- [42] Paulmier C. Selencoorganic functional groups. In: Paulmier C, editor. *Selenium reagents and intermediates in organic synthesis*. 1st ed. Oxford, England: Pergamon Press; 1986. p. 25–51.
- [43] Manson JM, Kang YJ. Test methods for assessment of female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, editor. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press; 1989. p. 311–61.
- [44] Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* 2003;143:9–16.
- [45] Chahoud I, Buschmann J, Clark R, et al. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. *Reprod Toxicol* 1999;13:77–82.
- [46] Perez-D'Gregorio RE, Miller RK. Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. *Teratology* 1988;37:307–16.
- [47] Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol* 1964;39:61–3.
- [48] Bergman K, Cekan E, Slanina P, Gabrielson J, Hellenäs KE. Effects of dietary sodium selenite supplementation on salicylate-induced embryo- and fetotoxicity in the rat. *Toxicology* 1990;61:135–46.
- [49] Cekan E, Slanina P, Bergman K, Tribukait B. Effects of dietary supplementation with selenomethionine on the teratogenic effect of ionizing radiation in mice. *Acta Radiol Oncol* 1985;24:459–63.
- [50] Levander OA. Consideration on the assessment of selenium status. *Fed Proc* 1985;44:2579–83.
- [51] Leone VG. Comparative aspects of developmental stages in mammals used for teratogenic tests. In: Neubert D, Merker HJ, Kwasi-groch, editors. *Methods in prenatal toxicology*. Stuttgart: George Thieme Publishers; 1977. p. 14–24.
- [52] Shariff MA, Krishnamurti CR, Schaefer AL, Heindze AM. Bidirectional transfer of selenium across the sheep placenta in utero. *Can J An Sci* 1984;64:252–4.
- [53] Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 1994;50:626–40.
- [54] Mirkin BL. Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther* 1973;14:643–7.
- [55] Rosenfeld I, Beath OA. Congenital malformations of eyes of sheep. *J Agric Res* 1947;75:93–103.
- [56] Dinkel CA, Minyard JA, Ray DE. Effects of season of breeding on reproductive and weaning performance of beef cattle grazing seleniferous range. *J Anim Sci* 1963;22:1043–5.
- [57] Lee M, Chan KK, Sarenji E, Niikuni SO. Effect of sodium selenite on methylmercury induced cleft palate in the mouse. *Environ Res* 1979;19:39–48.
- [58] Han J, Basse A, Wolstrup C. A murine model for the assessment of placental and fetal development in teratogenicity studies. *Lab Anim* 1987;21:26–30.
- [59] Danielsson BR, Danielson M, Khayat A, Wide M. Comparative embryotoxicity of selenite and selenate: uptake in murine embryonal and fetal tissues and effects on blastocysts and embryonic cells in vitro. *Toxicology* 1990;63:123–36.
- [60] Holmberg RE, Fern VH. Interrelationships of selenium, cadmium and arsenic in mammalian teratogenesis. *Arch Environ Health* 1969;18:873–7.
- [61] Nobunaga T, Satoh H, Suzuki T. Effects of sodium selenite on methylmercury embryotoxicity and teratogenicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979;47:79–88.

4.2 – EFEITOS DO DISSELENTO DE DIFENILA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA PROLE DE RATOS WISTAR EXPOSTOS SUB-CRONICAMENTE A ESTE COMPOSTO ANTES DO ACASALAMENTO

Artigo 2

**ADULT MALE RATS SUB-CHRONICALLY EXPOSED TO
DIPHENYL DISELENIDE: EFFECTS ON THEIR PROGENY**

FAVERO, A.M., WEIS, S.N., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G.,
ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W.

Submetido à Reproductive Toxicology, está em fase de revisão.

**ADULT MALE RATS SUB-CHRONICALLY EXPOSED TO DIPHENYL
DISELENIDE: EFFECTS ON THEIR PROGENY**

Alexandre Marafon Favero, Simone Nardin Weis, Eluza Curte Stangherlin,
Gilson Zeni, Joao Batista Teixeira Rocha, Cristina Wayne Nogueira*
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade
Federal de Santa Maria, SM, RS, CEP 97105-900 Santa Maria, Brazil

(Short Communication)

Running title: Effects on progeny of male exposed to $(\text{PhSe})_2$

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

Correspondence should be sent to:

Cristina Wayne Nogueira

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

Phone: 55-55- 3220-8140

FAX: 55-55-3220-8978

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

**ADULT MALE RATS SUB-CHRONICALLY EXPOSED TO DIPHENYL DISELENIDE:
EFFECTS ON THEIR PROGENY**

Abstract

The present study was conducted to evaluate the toxicity of diphenyl diselenide [(PhSe)₂] exposure on the progeny of Wistar male rats. Male rats were exposed to (PhSe)₂ subcutaneously for 4 weeks (wk) at the dose of 5.0 mg/kg and 8 wk at the dose of 2.5 mg/kg, prior to mating with unexposed females. No lethality was noted in any group. At term of exposure period, 4-wk-exposed male rats presented significant decrease in the body weight. Sex organ weights were similar in (PhSe)₂-exposed and control male groups. The number of implantation sites in females mated with males exposed to (PhSe)₂ for 8-wk was significantly higher than those of the respective control group. Male exposure to (PhSe)₂, administered for 4- and 8-wk, did not change fetal body weight. Gross examination of fetuses from 4- and 8-wk-exposed groups did not reveal the appearance of external anomalies. Examination of live fetuses for ossification centers did not show significantly difference between groups. No increase in the incidence of skeletal anomalies was observed in fetuses obtained from females impregnated with (PhSe)₂-exposed males. The current study indicated that (PhSe)₂ given sub-chronically (4 or 8 weeks) to male rats had no adverse effects on their progeny.

Keywords: Organoselenium, Paternal exposure, Progeny, Testis, Toxicity.

1. Introduction

Selenium is an essential trace element that constitutes the active center of glutathione peroxidase [1] and is a component of other selenoproteins [2, 3]. Conversely, it is well known that selenium can also act as an environmental toxicant [4]. Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] is an organoselenium compound widely used as intermediate in organic synthesis [5, 6], and as a consequence, the risk of human exposure to this chemical at the workplace may increase. Extensive studies have been focused on the potential toxicological and pharmacological effects of (PhSe)₂ in animal models (for review see [7]). Of particular importance, antioxidant [8-9], antinociceptive and antiinflammatory [10], anti-secretory and antiulcer [11] and hepatoprotective [12] properties have been attributed to (PhSe)₂.

Recently, we established that (PhSe)₂, administered sub-chronically, produces only slight toxic effects in exposed male adult Wistar rats [13]. In that study, (PhSe)₂-treated males showed significant reduction in body weight and no alterations in reproductive parameters, including fertility index and epididymal sperm counts. Interestingly, it has been reported that abnormalities in progeny outcome in animal paternal-exposure studies are usually not accompanied by alterations in fertility or other used indices of reproductive success [14]. Taking this into account, male toxicological studies are important to determine the safe utilization of (PhSe)₂.

Male reproductive toxicology has recently become a rapidly expanding area of research and testing. In the last decades there has been growing concern over the effects of either natural or synthetic products on the male reproductive health [15]. However, studies in male have primarily explored the effects of toxic agents on fertility rather than on developmental outcome. It has been demonstrated that paternal exposure to therapeutic and recreational drugs as well as to chemicals in the workplace and environment can induce a broad spectrum of deleterious effects on the normal course of development. The impact on progeny outcomes includes: increase in pre- and post-implantation loss, congenital malformations, increase in spontaneous abortions and fetal growth retardation [14].

Until recently, investigations of developmental disorders of parental exposure to pharmacological or other chemical and physical agents have focused almost exclusively on maternal factors. Accordingly, our research group have demonstrated that $(\text{PhSe})_2$ produces slight toxicological effects in the fetuses when pregnant rats were exposed to this compound, following both acute and repeated administrations during gestation [16-17]. To the best of our knowledge, however, there are no data in the literature that focus on the effects on progeny of male rats administered with $(\text{PhSe})_2$.

Thus, the present study was undertaken to evaluate if $(\text{PhSe})_2$, at the same dosing regimens used in the early reproductive study [13], promotes reproductive alterations and/or toxic effects on the progeny of male Wistar rats.

2. Materials and methods

2.1. Test Chemical

Diphenyl diselenide was synthesized according to literature method [18]. Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed that the compound obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of $(\text{PhSe})_2$ (99.9%) was determined by GC/HPLC.

2.2. Animals

Males and nulliparous females of Wistar strain (180-240 g) from our own breeding colony were used in this study. The animals were housed in separate rooms, on a 12 h light/dark cycle, at room temperature, with free access to food (Guabi, RS, Brazil) and water. The animal protocols were approved by the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

2.3. Experimental procedure

Diphenyl diselenide was dissolved in canola oil (BÜNGE Alimentos S.A., Brazil) at doses of 2.5 or 5.0 mg/kg. The volume of each dose was adjusted to 1 ml/kg of body weight. Control groups received only canola oil. The dose level was determined based on the results of LD_{50} studies conducted in our laboratory [19]. The relationship between exposure duration and dose level was chosen based on the lipophilic properties of $(\text{PhSe})_2$ which increase the risk of bio-accumulating into the lipophilic compartments. Male rats were exposed sub-chronically with $(\text{PhSe})_2$ or vehicle prior to mating, following the experimental design:

1- Four-weeks exposure (4-wk): the animals were subcutaneously exposed to 5.0 mg/kg $(\text{PhSe})_2$ or vehicle, 5 times/wk, for 4 wk to reach $1/3 \text{LD}_{50}$.

2- Eight-weeks exposure (8-wk): the animals were subcutaneously exposed to 2.5 mg/kg (PhSe)₂ or vehicle, 5 times/wk, for 8 wk to reach 1/3 LD₅₀.

The body weight of males was recorded daily, immediately before (PhSe)₂ exposure. Twenty-four hours after the last injection (4- and 8-wk exposure periods), each male was placed in a separate cage with two virgin unexposed females of the same strain in the proestrous and estrous phases of the cycle for 7 days [20]. The onset of pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa in vaginal smears on the following morning, defined as gestational day (GD) 0. Dams recognized as pregnant were housed individually in standard polypropylene plastic cages (41x34x18cm) with autoclaved wood shavings as bedding. After mating period, males were removed and euthanized by decapitation under ether (Merck, Darmstadt, Germany) anesthesia and the testis and epididymis weights were recorded.

Pregnant rats were daily examined for obvious signs of illness. Body weight of each dam was recorded on days 0 and 20 of gestation. On GD 20, the dams were euthanized and the entire uterus was excised. The gravid uterus was weighed. The number of viable fetuses and resorptions were counted. All viable fetuses were removed, separated from placenta, and inspected carefully macroscopically for external structure anomalies. The fetuses and their respective placentas were weighed. The viability of the fetuses was determined by the presence of spontaneous breathing or responses to a tactile stimulus. Findings were classified as variations or malformations, according to currently-used nomenclature [21]. To identify skeletal anomalies a sample of each litter was preserved in 70% ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and stained with Alizarin Red S (VETEC, RJ, Brazil) by the technique of Staples and Schnell [22].

2.4. Statistical analysis

The male was considered the statistical unit in this study. Statistical analysis between experimental and control groups were calculated by Student's t-test (male parameters). Developmental and reproductive findings were analyzed using ANOVA/MANOVA with the litter nested within male. Differences were considered statistically significant when value of $P < 0.05$.

3. Results

Males of 4-wk exposure group had body weight significantly decreased at term of exposure period. Conversely, body weight of male rats was not affected in the 8-wk exposed group. The absolute and relative testis and epididymis weights were not statistically different in both (PhSe)₂-exposed groups when compared to respective control groups (Table 1).

The maternal body weight (at GD0 and 20) and the body weight gain (overall or corrected) during the pregnancy in females mated with 4-wk exposed males were not statistically different to those obtained from females mated with control males. In addition, the placental and gravid uterine weights were unaltered in females mated with 4-wk exposed males when compared to the control group (Table 2). On the other hand, females mated with 8-wk exposed males showed an increase in the body weight on GD20 as well as in the overall body weight gain during pregnancy (GD0 to GD20). Mean gravid uterine weight at term was significantly increased in females mated with 8-wk exposed males when compared to the control group. The corrected body weight gain of dams (after deduction of

gravid uterine weight at term) was comparable between experimental and control groups. The placental weight was unaltered in females mated with 8-wk exposed males (Table 2).

Data from maternal autopsies showed that $(\text{PhSe})_2$ administered to males before mating sessions did not induce an increase in resorptions and fetal mortality (Table 2). The number of implantation sites were significantly higher in females impregnated with males exposed with $(\text{PhSe})_2$ during 8-wk prior to mating than in females mated with control males. The mean number of live fetuses per litter from 8-wk exposed group was even slight higher, but not significant, than those of the respective control group. The females mated with males exposed with $(\text{PhSe})_2$ during 4-wk exhibited no significant differences in the number of implantation sites. The mean number of live fetuses per litter from 4-wk exposed group were unaffected by drug exposure when compared to the respective control group (Table 2).

The mean fetal body weight for both $(\text{PhSe})_2$ -exposed groups was similar to respective control groups (Table 2). Gross examination of fetuses revealed no increase in the appearance of external anomalies for 4- and 8-wk exposed groups (Table 3). The examination of live fetuses for ossification centers did not show significant difference between groups. No increase in the incidence of skeletal anomalies was observed in fetuses obtained from females impregnated with $(\text{PhSe})_2$ -exposed and control males (Table 3).

4. Discussion

The current study clearly indicated that $(\text{PhSe})_2$ given sub-chronically (4- or 8-wk) to male rats has no adverse effects on their progeny. Generally, there was no mortality or clinical signs of toxicity after $(\text{PhSe})_2$ exposure (4- and 8-wk) to males, neither in

unexposed females mated with exposed males. Despite this, the loss of body weight observed in 4-wk exposure for $(\text{PhSe})_2$ could indicate systemic toxicity. Accordingly, selenium compounds have been reported to affect body weight gain in animals [13, 16, 23].

Male reproductive toxicity studies with selenium compounds, especially with organic forms, are still scarce in the literature. Earlier studies have indicated that selenium is a micronutrient essential for normal male reproductive function and required for normal spermatogenesis [24,25]. In fact, it is well established that there is a marked increase in testicular selenium content in maturing animals when spermatogenesis begins [26]. In addition, moderate supplementation with Se is known to have beneficial effects on the reproduction of experimental animals, livestock and man [27-29]. In agreement, Kaur and Bansal [30] reported a significant decrease in the fertility index and in the mean number of pups per litter in pregnancies sired by males kept on a selenium-deficient diet for 8-wk. In the same study, however, no appreciable changes were observed following selenium-deficient diet supplemented with sodium selenite at adequate (0.2 ppm) and excessive (1 ppm) levels for 8-wk.

According to these results, studies in our research group did not show interference of $(\text{PhSe})_2$ on reproductive performance of Wistar male rats [13]. In fact, the treatment with $(\text{PhSe})_2$ did not induce changes in sensitive endpoints for assessing male reproductive toxicity. $(\text{PhSe})_2$ administered acutely or sub-chronically to male rats had no effects on mating and fertility indices, epididymal sperm counts and testicular histopathology. In addition, here we reported no differences in the sex organs (testis and epididymis) weights as well as in the mating and fertility indices (all males impregnated at least one female). Thus, our findings corroborate an early study indicating that $(\text{PhSe})_2$ did not result in

fertility impairment on male Wistar rats. Since the appearance of abnormalities in progeny outcome and alterations in male fertility are not directly related [14], the potential implications of (PhSe)₂ on male reproduction is extremely relevant.

Regarding (PhSe)₂, it has been established that single subcutaneous administration to pregnant Wistar rats during organogenesis (e.g., at GD 9, 10 or 11) induces slight embryofetotoxicity since the fetuses obtained at gestational day 20 showed an increase in skeletal anomalies (incomplete ossification of sternebrae and skull bones, and sternebrae misshapen) and delayed development. Noteworthy, the administration of (PhSe)₂ at day 10 of gestation caused the appearance of only one litter with malformations (tail and limbs defects) suggesting that the rat prenatal development in this stage may be sensitive to organic selenium exposure [16]. In addition, our research group also demonstrated that (PhSe)₂ administered during organogenesis (GD6 through 15) induced adverse effects on maternal rats and on embryonic/fetal growth, without causing externally visible malformations in rat fetuses [17]. In the current study, on the other hand, no toxicological findings were related to the male exposed to (PhSe)₂. The minor findings were the increase in the body weight gain, in gravid uterine weight and in the number of implantation sites in unexposed females impregnated with 8-wk-exposed males. This increase was not considered to be related to the test substance because the average number of implants per dam in both control and 8-wk exposed groups were within the ranges of the historical control data (8.4-12.4) based on information gathered in developmental toxicity studies using Wistar rats in our laboratory over a period of 3 years. Thus, the significant difference between groups is likely to be caused by unusual values rather than indicate a particular effect of the test compound on implantation period. As a consequence, the increase in the

number of implantation sites led to a litter size slight higher in exposed group, although this difference was not statistically significant. Indeed, the greater body weight at gestational day 20 in females sired with 8-wk-exposed males was directly correlated with the findings above cited.

Based on the fetuses weight, as well as the incidence of external and skeletal alterations at term were unaffected by $(\text{PhSe})_2$, we concluded that there are no adverse effects on the progeny of male rats sub-chronically exposed to $(\text{PhSe})_2$. Further researches have to be conducted to provide information on physiological and behavioral effects on offspring and to better investigate the potential toxic effects of both maternal and paternal exposure to this compound.

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

Tables.

Table 1. Effect of male (PhSe)₂ exposure on body and sex organ weights.

Parameters	4-weeks		8-weeks	
	Control ^a	5.0mg/kg (PhSe) ₂	Control	2.5mg/kg (PhSe) ₂
Male parameters				
Number of males (n)	6	6	6	6
Male body weight (g)				
Initial	214.00±4.31	218.67±1.69	196.00±2.82	195.67±3.56
Final	290.00±6.06	262.17±6.16*	307.20±6.91	311.00±8.82
Sex organs weight (g)				
Testis	1.62±0.04	1.56±0.04	1.60±0.03	1.65±0.04
Per body weight (%)	0.51±0.01	0.56±0.01	0.53±0.01	0.53±0.02
Epididymis	0.54±0.02	0.54±0.02	0.58±0.01	0.57±0.02
Per body weight (%)	0.17±0.01	0.20±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01

^a Control animals received canola oil (1mL/kg). Data are expressed as mean±SEM. * $P < 0.05$ compared to the respective control group.

Table 2. Effect of male (PhSe)₂ exposure on reproductive parameters in unexposed female^a rats and their fetuses.

Parameters	4-wk		8-wk	
	Control	5.0mg/kg (PhSe) ₂	Control	2.5mg/kg (PhSe) ₂
Maternal parameters^b				
Females paired with males (n)	12	12	12	12
Females with evidence of mating (n)	12	12	10	10
Pregnant females (n)	10	12	8	8
Mating index (%)	100	100	83.33	83.33
Pregnancy rate (%)	83.33	100	80.00	80.00
Maternal weight (g)				
Day 0	226.50±11.73	206.33±5.38	202.00±3.14	212.00±5.14
Day 20	313.30±12.81	297.00±10.02	275.33±4.05	300.33±2.39*
Gravid uterine weight (g)	59.02±5.76	63.85±3.24	55.36±2.36	61.36±2.78*
Maternal weight gain (g)				
Day 0-20	86.83±3.27	90.67±6.86	73.33±3.04	88.33±2.98*
Day 0-20 (minus uterine weight)	27.82±6.70	26.82±4.46	17.96±3.15	26.97±3.35
Placental weight (g)	0.56±0.04	0.51±0.02	0.53±0.02	0.50±0.02
Implantations sites/ litter	10.50±0.92	11.17±0.60	9.50±0.56	11.17±0.40*
Resorptions sites/ litter	0.50±0.34	0	0.33±0.21	0.50±0.50
Live fetuses/ litter	10.00±1.18	11.17±0.60	9.17±0.54	10.67±0.67
Dead fetuses/ litter	0	0	0	0
Post-implantations loss (%)	6.00±4.20	0	3.30±2.11	4.50±4.49
Fetal parameters^b				
Body weight (g) ^c	3.71±0.10	3.62±0.10	3.72±0.07	3.66±0.09

^a Females were untreated and killed on day 20 of gestation. ^b Data are expressed as mean±SEM. ^c per litter.

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

Table 3. Effect of male (PhSe)₂ exposure on external and skeletal anomalies in their progeny.

Parameters	4-wk		8-wk	
	Control ^a	5.0mg/kg (PhSe) ₂	Control ^a	2.5mg/kg (PhSe) ₂
Litters examined	10	12	8	8
Fetuses examined	40	48	32	32
Skeletal anomalies^b				
Skull				
Frontal (incompl. ossif.) ^c	4.2±4.2	0	0	0
Parietal (incompl. ossif.)	16.7±16.7	8.3±5.3	12.5±8.5	33.3±16.7
Interparietal (incompl. ossif.)	8.3±8.3	8.3±5.3	12.5±8.5	8.3±8.3
Supraoccipital (incompl. ossif.)	20.8±7.7	4.2±4.2	16.7±8.3	8.3±8.3
Sternebrae				
(incompl. ossif.)	29.2±16.4	12.5±8.5	0	4.2±4.2
(misshapened)	33.3±15.4	12.5±5.6	33.3±10.5	37.5±12.5
Ribs				
(unilateral supernumerary short rib)	4.2±4.2	12.5±8.5	29.2±10.0	4.2±4.2
(bilateral supernumerary short ribs)	33.3±15.4	25.0±15.8	12.5±12.5	4.2±4.2
Sacral bones				
(incompl. ossif.)	25.0±14.2	20.8±11.9	25.0±11.2	25.0±12.9
Number of ossification centers^d				
Metacarpals	3.54±0.18	3.86±0.12	3.79±0.14	3.71±0.10
Proximal phalanges in forepaw	1.08±0.41	1.00±0.26	1.04±0.35	0.75±0.11
Metatarsals	4.04±0.04	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00
Proximal phalanges in hindpaw	0	0	0	0
Caudal vertebra	2.54±0.28	2.17±0.20	2.42±0.17	2.00±0.19
External anomalies ^b	0	0	0	0

^a Males that received canola oil (1mL/Kg). ^b % of fetuses affected per litter. ^c incompl. ossif.: incomplete ossification.

^dData are expressed as mean±SEM.

References

- [1] Wingler K, Brigelius-Flohé R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. *Biofactors* 1999;10:245-9.
- [2] Behne D, Kyriakopoulos A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Co* 1990;173:1143-9.
- [3] Linder MC. Nutrition and metabolism trace elements. In: Linder MC, editor. *Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Applications*. New York: Elsevier; 1990;p. 215-77.
- [4] Fishbein L. Environmental selenium and its significance. *Fundam Appl Toxicol* 1983;4:183-90.
- [5] Zeni G, Panatieri RB, Lissner E, Menezes PH, Braga AL, Stefani HA. Synthesis of polyacetylenic acids isolated from *Heisteria Acuminata*. *Org Lett* 2001;6:819-21.
- [6] Moro AV, Nogueira CW, Barbosa NBV, Menezes PH, Rocha JBT, Zeni G. Highly stereoselective one-pot procedure to prepare bis- and tris- chalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. *J Org Chem* 2005;70:5257-68.
- [7] Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and Pharmacology. *Chem Rev* 2004;104:6255-86.
- [8] Meotti FC, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environm Res* 2004;94:276-82.
- [9] Santos FW, Zeni G, Rocha JBT, Weis SN, Fachinetto JM, Favero AM, Nogueira CW. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem-Biol Interact* 2005;151:159-65.

- [10] Nogueira CW, Quinhones EB, Jung EAC, Zeni G, Rocha JBT. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 2003;52:56-63.
- [11] Savegnago L, Trevisan M, Alves D, Rocha JBT, Nogueira CW, Zeni G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environm Pharmacol Toxicol* 2006;21:86-92.
- [12] Borges LP, Borges VC, Moro AV, Rocha JBT, Nogueira CW, Zeni G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 2005;210:1-8.
- [13] Stangherlin EC, Favero AM, Weis SN, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Assessment of reproductive toxicity in male rats following acute and sub-chronic exposures to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Food Chem Toxicol* 2006; 00-00.
- [14] Friedler G. Paternal exposures: Impact on reproductive and developmental outcome. An overview. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;55:691-700.
- [15] US Environmental Protection Agency (US EPA). Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. [EPA/630/R-96/009]1996.
- [16] Favero AM, Weis SN, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 2005; 20:561-8.
- [17] Weis SN, Favero AM, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development. *Reprod Toxicol* 2006; in press.

- [18] Paulmier C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. editor. *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*. First ed. Pergamon Press, Oxford, England 1986; p. 25-51.
- [19] Nogueira CW, Meotti FC, Curte E, Pilissão C, Zeni G, Rocha JBT. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 2003;183:29-37.
- [20] Manson JM, Kang YJ. Test methods for assessment of female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes, AW. editor. *Principles and Methods of Toxicology*. New York: Raven Press 1989;p. 311-61.
- [21] Chahoud I, Buschmann J, Clark R, et al. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. *Reprod Toxicol* 1999;13:77–82.
- [22] Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol* 1964;39:61-3.
- [23] Tinggi U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett* 2003;137:103-10.
- [24] Maiorino M, Flohe L, Roveri A, Steinert P, Wissing JB, Ursini F. Selenium and reproduction. *BioFactors* 1999;10:251–6.
- [25] Behne D, Hofer T, Wallrabe RB, Elger W. Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. *J Nutr* 1982;102:1682-7.
- [26] Behne D, Duk M, Elger W. Selenium content and glutathione peroxidase activity in the testis of the maturing rat. *J Nutr* 1986;116:1442-7.
- [27] Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 1994;50:626–40.

- [28] Hansen JC, Deguchi Y. Selenium and fertility in animals and man—a review. *Acta Vet Scand* 1996;37:19–30.
- [29] Hartley WJ, Grant AB. A review of selenium responsive diseases of New Zealand livestock. *Fed Proc* 1961;20:679–88.
- [30] Kaur P, Bansal MP. Effect of selenium induced oxidative stress on the cell kinetics in testis and reproductive ability of male mice. *Nutrition* 2005;21:351-357.

4. DISCUSSÃO

O disseleneto de difenila [(ØSe)₂] é um composto de Se amplamente utilizado como intermediário em reações de síntese orgânica (Zeni e cols., 2001). Além disso, existem diversos estudos demonstrando que este composto possui importantes propriedades farmacológicas, tornando interessante a avaliação de seus efeitos toxicológicos (Nogueira e cols., 2004).

A introdução de uma nova droga no mercado costuma ser precedida de experimentação humana, excetuando-se o uso na gestação. Assim, devido à escassez de dados acerca dos efeitos sobre o organismo embrio-fetal, os estudos durante a gestação animal tendem a fornecer os subsídios iniciais.

A toxicologia do desenvolvimento é o campo do conhecimento que trata, entre outros objetivos, da avaliação do risco da exposição do embrião, feto e do recém-nascido a agentes agressivos presentes no meio ambiente. Os estudos da teratogenicidade são complexos, levando-se em conta que existem cerca de cinco milhões de agentes ambientais aos quais podemos estar expostos e, destes, apenas cerca de 40 são comprovadamente teratogênicos no homem (Shepard, 1992).

O presente estudo testou os possíveis efeitos teratogênicos do (ØSe)₂ quando administrado de forma subcutânea (s.c.), em dias específicos da gestação de ratas Wistar (**Artigo 1**). A partir dos dados obtidos experimentalmente foi estabelecido que uma única administração de (ØSe)₂ pela via s.c. não causa o aparecimento de malformações externas nos fetos quando administrado em diferentes períodos gestacionais. Os nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, os quais da mesma forma, não observaram efeitos negativos nos fetos das mães que receberam outras formas de Se durante a gestação (Cekan e cols., 1985; Bergman e cols., 1990).

As doses do (ØSe)₂ (50 e 100 mg/kg) administradas neste trabalho foram selecionadas com base na DL₅₀ calculada para o composto (Nogueira e cols., 2003c). Previsivelmente, a administração do composto, em ambas as doses, não causou mortalidade materna. No entanto, o tratamento com a maior dose resultou numa perda de peso materno logo após a administração do composto na maioria dos grupos tratados. De acordo, há

trabalhos na literatura que relacionam perda de peso à exposição a compostos de Se (Tinggi, 2003; Stangherlin e cols., 2006a).

A administração de $(\text{OSe})_2$ na dose de 100 mg/kg no 10º dia de gestação causou o aparecimento de uma única ninhada com malformações externas (defeitos na cauda e nos membros anteriores e posteriores), sugerindo que o desenvolvimento pré-natal neste estágio poderia ser sensível a exposição a formas orgânicas de Se. As malformações observadas neste estudo foram semelhantes às induzidas pelo ditelureto de difenila [$(\text{OTe})_2$] (Stangherlin et al., 2005), um análogo estrutural do $(\text{OSe})_2$. Recentemente, dados do nosso laboratório têm demonstrado que, além de teratogênico, o $(\text{OTe})_2$ induz alterações neuro-comportamentais em filhotes de ratas Wistar, indiretamente expostos durante o período lactacional (Stangherlin et al., 2006b).

Motivados pelo aparecimento de malformações externas em uma ninhada, nós avaliamos as possíveis anomalias no esqueleto dos fetos expostos agudamente ao $(\text{OSe})_2$ durante o período organogênético. Nossos resultados sugerem que a administração aguda de $(\text{OSe})_2$ na dose de 100 mg/kg aumenta a incidência de anomalias no esqueleto, um sinal de retardo no desenvolvimento, sem induzir o aparecimento de malformações externas. Além disso, a administração de $(\text{OSe})_2$ no 9º dia de gestação (100 mg/kg) causou a diminuição do peso corporal e da medida do comprimento fetal, implicando que a exposição ao composto prejudicou o desenvolvimento intra-uterino. Estudos adicionais devem ser realizados a fim de nos certificarmos se há algum tipo de comprometimento das funções fetais, observável no desenvolvimento pós-natal da ninhada.

Estudos prévios demonstraram que o elemento Se atravessa a “barreira placentária” e é distribuído nos tecidos fetais (Shariff e cols., 1984; Bedwal & Bahuguna, 1994). A transferência placentária de diferentes substâncias químicas é influenciada por diversos fatores, tais como: grau de absorção, estado de ionização, peso molecular e lipossolubilidade. Além disso, as propriedades da placenta (fluxo de sangue entre a mãe e o feto, metabolismo da droga, e idade da placenta) também podem interferir neste transporte. Existem evidências que moléculas químicas com peso molecular < 600 atravessam facilmente a “barreira placentária” (Mirkin, 1973). Considerando as características químicas do $(\text{OSe})_2$, tais como a sua solubilidade lipídica e o seu peso molecular (312), nós

acreditamos que este composto, ou algum metabólito seu, possa atravessar a placenta e ser responsável pelos efeitos observados.

Outros estudos têm examinado os efeitos reprodutivos da exposição a diferentes formas de Se em animais de laboratório. Em mamíferos, os efeitos adversos do Se, tais como, malformações nos olhos de ovelhas, foram originalmente relatados em áreas seleníferas (Rosenfeld & Beath, 1947). Apesar de algumas inconsistências, os resultados de estudos experimentais em camundongos e hamsters tratados com selenato e selenito têm sugerido efeitos adversos dos compostos orgânicos de Se sobre o crescimento fetal e o aparecimento de malformações, tais como: fenda no palato e encefalocele (Lee e cols., 1979; Ferm e cols., 1990). Por outro lado, Tarantal e cols. (1991) não identificaram efeitos teratogênicos em macacas tratadas com L-selenometionina. Além disso, já foram demonstrados os efeitos do Se na proteção da teratogenicidade induzida por metais pesados tais como cádmio, arsênio e mercúrio (Holmberg & Ferm, 1969; Nobunaga e cols., 1979).

As diferenças interespecies quanto aos processos farmacocinéticos de absorção, metabolização, bioativação e eliminação dificultam a extrapolação dos dados obtidos experimentalmente para humanos. No entanto, como os efeitos adversos observados neste estudo aparecem apenas em uma dose muito alta, ele não impossibilita ou descarta a continuidade e a importância de pesquisas adicionais sobre as propriedades farmacológicas deste composto, uma vez que o $(\text{OSe})_2$ desempenha suas propriedades em doses bem abaixo das testadas neste trabalho.

Um outro foco deste estudo foi a avaliação dos efeitos do $(\text{OSe})_2$ sobre o desenvolvimento da prole de ratos Wistar expostos sub-cronicamente a este composto no período que precede o acasalamento (**Artigo 2**). Os dados obtidos no presente estudo indicaram que a administração sub-crônica de $(\text{OSe})_2$ (por um período de 4 ou 8 semanas) a ratos Wistar não afetou o desenvolvimento intra-uterino de sua progênie. Além disso, não foram observados sinais clínicos de toxicidade e mortalidade nos grupos de machos expostos ao $(\text{OSe})_2$ bem como nas fêmeas acasaladas com eles. Apesar disso, um ganho diminuído de peso corporal foi observado no grupo de ratos expostos por 4 semanas. Como mencionado anteriormente, há trabalhos na literatura que relacionam perda de peso à exposição a compostos de Se.

Estudos realizados pelo nosso grupo não demonstraram nenhuma interferência do $(\text{ØSe})_2$ sobre a performance reprodutiva de ratos Wistar (Stangherlin e cols., 2006a). De fato, o tratamento com $(\text{ØSe})_2$ não provocou mudanças em parâmetros sensíveis que avaliam a toxicidade reprodutiva em machos. A administração aguda ou sub-crônica de $(\text{ØSe})_2$ a ratos Wistar não teve efeitos sobre os índices de acasalamento e fertilidade, sobre a contagem de espermatozoides da cauda do epidídimo e sobre a histopatologia testicular. Além disso, no presente estudo nós demonstramos que o tratamento com $(\text{ØSe})_2$ não causa diferenças significativas no peso dos órgãos sexuais (testículos e epidídimos), bem como não afeta os índices de acasalamento e fertilidade (todos os machos fertilizaram ao menos uma fêmea). Portanto, nossos achados corroboram com o estudo anterior e reafirmam que o $(\text{ØSe})_2$ não causa prejuízos na fertilidade de ratos Wistar. Uma vez que alterações na fertilidade e o aparecimento de anormalidades na progênie de machos não estão diretamente relacionados, a avaliação dos efeitos da exposição ao $(\text{ØSe})_2$ sobre o desenvolvimento da prole destes ratos é de extrema importância.

O aumento no número de sítios de implantação, observado nas fêmeas acasaladas com os machos tratados por 8 semanas com o $(\text{ØSe})_2$, não foi atribuído ao composto uma vez que os valores de ambos os grupos (controle e expostos ao $(\text{ØSe})_2$ por 8 semanas) encontram-se dentro da média histórica (8,4-12,4) dos dados obtidos no nosso laboratório utilizando a mesma linhagem de roedores (Wistar), nos últimos 3 anos. Assim, nós acreditamos que a diferença observada entre os grupos deve ter sido causada principalmente por valores não usuais do que indicar um efeito particular do composto testado sobre o período de implantação. Como consequência, o aumento no número de sítios de implantação levou a um pequeno aumento no tamanho das ninhadas do grupo exposto ao $(\text{ØSe})_2$ por 8 semanas (não significativo). Além disso, o aumento no peso corporal observado, ao final da gestação, nas fêmeas acasaladas com os machos tratados por 8 semanas, foi correlacionado diretamente com os achados acima citados.

Em relação aos parâmetros fetais, não foram observadas mudanças no peso, bem como no aparecimento de anomalias externas em ambos os grupos tratados (4 ou 8 semanas) com o $(\text{ØSe})_2$. Além disso, não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento ósseo (centros de ossificações e anomalias) dos fetos obtidos de fêmeas acasaladas com os machos tratados com o $(\text{ØSe})_2$. Baseado nos resultados deste estudo,

podemos inferir que a exposição ao $(\text{OSe})_2$ não causa efeitos adversos sobre o desenvolvimento intra-uterino da prole de ratos Wistar, quando submetidos ao protocolo experimental utilizado. Entretanto, uma extrapolação dos dados obtidos em animais para possíveis efeitos em humanos deve ser tomada com cautela já que existem diferenças entre uma espécie e outra.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos inferir o seguinte:

- A administração única de $(\text{ØSe})_2$ pela via s.c. não causa o aparecimento de malformações externas nos fetos quando administrado em diferentes períodos gestacionais;
- A administração única de $(\text{ØSe})_2$ pela via s.c. aumenta a incidência de anomalias no esqueleto, um sinal de retardo no desenvolvimento intra-uterino;
- A administração sub-crônica de $(\text{ØSe})_2$ (por um período de 4 ou 8 semanas) a ratos Wistar não afeta o desenvolvimento intra-uterino de sua progênie no protocolo experimental utilizado.

6. PERSPECTIVAS

Em relação aos estudos de teratogenicidade fazem-se necessários:

- Realizar um estudo comparativo com outras espécies animais, como por exemplo, camundongos e coelhos;
- Investigar os possíveis efeitos de administrações repetidas de $(\text{OSe})_2$, em doses baixas, durante o período de principal organogênese em ratos Wistar (do 6° ao 15° dia de gestação);
- Avaliar os efeitos do $(\text{OSe})_2$ sobre o desenvolvimento físico, neuro-comportamental e reprodutivo da prole de ratas Wistar expostas a esse composto durante os períodos gestacional e/ou lactacional;
- Determinar os possíveis metabólitos do $(\text{OSe})_2$ na prole de ratas Wistar expostas a esse composto durante os períodos gestacional e/ou lactacional.

Quanto aos estudos de exposição paterna:

- Investigar possíveis alterações genéticas causadas pelo composto, utilizando o mesmo protocolo e, adicionalmente, doses maiores durante o mesmo período de tratamento;
- Realizar um estudo comparativo com outras espécies animais, como por exemplo, camundongos e coelhos;
- Avaliar dos efeitos do $(\text{OSe})_2$ sobre o desenvolvimento físico, neuro-comportamental e reprodutivo da prole de ratos Wistar expostos a esse composto durante o período que precede o acasalamento.

DEMAIS TRABALHADOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO:

STANGHERLIN, E.C., FAVERO, A.M., WEIS, S.N., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Assessment of Reproductive Toxicity in Male Rats Following Acute and Sub-Chronic Exposures to Diphenyl Diselenide and Diphenyl Ditelluride. **Food Chem. Toxicol.**, 44, 662-669, 2006.

STANGHERLIN, E.C., FAVERO, A.M., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Exposure of Mothers to Diphenyl Ditelluride During the Suckling Period Changes Behavioral Tendencies in their Offspring. **Brain Res. Bul.**, 69, 311-317, 2006.

FAVERO, A.M., WEIS, S.N., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl Diselenide Changes Behavior in Female Pups. **Neurotoxicol. Teratol.**, (aceito).

WEIS, S.N., FAVERO, A.M., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Repeated Administration of Diphenyl Diselenide to Pregnant Rats Induces Adverse Effects on Embryonic/Fetal Development. **Reprod. Toxicol.**, (em revisão).

FAVERO, A.M., WEIS, S.N., STANGHERLIN, E.C., SANTOS, F.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl Diselenide Increases Selenium Levels Transferred to Newborn Offspring Through Maternal Milk. **Environ. Toxicol. Pharm.**, (submetido).

FAVERO, A.M., WEIS, S.N., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Sub-Chronic Exposure of Adult Male Rats to Diphenyl Ditelluride did not Affect the Development of their Progeny. **Food Chem. Toxicol.**, (submetido).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFORD, C.A., PASS, R.F., STAGNO, S. Chronic congenital infections: common environmental causes for severe and subtle birth defects. **Birth Defects**, 9, 87-96, 1983.
- ALKALAY, A.L., POMERANCE, J.J., RIMOIN, D.L. Fetal varicella syndrome. **J. Pediatr.**, 111, 320-323, 1987.
- ARVIN A.M., MALDONADO, Y.A. Other viral infections of the fetus and newborn. In: REMINGTON, J.S., KLEIN, J.O., editors. **Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. Philadelphia, PA: Saunders, 745-756, 1995.
- BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., ZENI, G., EMANUELLI, T., BEQUE, M.C., BRAGA, A.L. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 149, 243-253, 1998.
- BEDWAL, R.S., BAHUGUNA, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**, 50, 626-640, 1994.
- BEHNE, D., HOFER, T., WALLRABE, R.B., ELGER, W. Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. **J. Nutr.**, 102, 1682-1687, 1982.
- BEHNE, D., DUK, M., ELGER, W. Selenium content and glutathione peroxidase activity in the testis of the maturing rat. **J. Nutr.**, 116, 1442-1447, 1986.
- BEHNE, D., KYRIAKOPOULOS, A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, 173, 1143-1149, 1990.

- BEHNE, D., WEILER, H., KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **J. Reprod. Fertil.**, 106, 291-297, 1996.
- BERGMAN, K., CEKAN, E., SLANINA, P., GABRIELSSON, J., HELLENÅS, K.E. Effects of dietary sodium selenite supplementation on salicylate-induced embryo- and fetotoxicity in the rat. **Toxicology**, 61, 135-146, 1990.
- BLATT, J., MULVIHILL, J.J., ZIEGLER, J., YOUNG, R.C., POPLACK, D.G. Pregnancy outcome following cancer chemotherapy. **Am. J. Med.**, 69, 828-832, 1980.
- BOLZAN, R.C., FOLMER, V., FARINA, M., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T., EMANUELLI, T. Aminolevulinate dehydratase inhibition by phenyl selenoacetilene: effects of reaction with hydrogen peroxide. **Pharmacol. Toxicol.**, 90, 214-219, 2002.
- BORGES, L.P., BORGES, V.C., MORO, A.V., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, 210, 1-8, 2005.
- BRAGA, A.L., SILVEIRA, C.C., ZENI, G., SEVERO, W.A., STEFANI, H.A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J. Chem. Res.**, 206-207, 1996.
- CEKAN, E., SLANINA, P., BERGMAN, K., TRIBUKAIT, B. Effects of dietary supplementation with selenomethionine on the teratogenic effect of ionizing radiation in mice. **Acta Radiol. Oncol.**, 24, 459-463, 1985.
- COLIE C.F. Male mediated teratogenesis. **Reprod. Toxicol.**, 7, 3- 9, 1993.
- COMASSETO, J.V. Vinylic selenides. **J. Organomet. Chem.**, 253, 131-181, 1983.

- DAVIS, D.L., FRIEDLER, G., MATTISON, D., MORRIS, R. Male-mediated teratogenesis and other reproductive effects: biologic and epidemiologic findings and a plea for clinical research. **Reprod. Toxicol.**, 6, 289-292, 1992.
- EHLERS, K., SÜRJE, H., MERKER, H.J. Valproic acid-induced spina bifida: a mouse model. **Teratology**, 45, 145-154, 1992.
- FARINA, M., FOLMER, V., BOLZAN, R.C., ANDRADE, L.H., ZENI, G., BRAGA, A.L., ROCHA, J.B.T. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicol. Lett.**, 119, 27-37, 2001.
- FERM, V.H., HANLON, D.P., WILLHITE, C.C., CHOY, W.N., BOOK, S.A. Embryotoxicity and dose-responses relationships of selenium in hamsters. **Reprod. Toxicol.**, 4, 183-190, 1990.
- FLOHÉ, L., GUNZLER, W.A., SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. **FEBS Lett.**, 32, 132-134, 1973.
- FRIEDLER, G. Effects of limited paternal exposure to xenobiotic agents on the development of progeny. **Neurobehav. Toxicol. Ter.**, 7, 739-743, 1985.
- FRIEDLER, G. Paternal exposures: Impact on reproductive and developmental outcome. An overview. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 55, 691-700, 1996.
- JOFFE, J.M., SOYKA, L.F. Effects of drug exposure on male reproductive processes and progeny. **Period. Biol.**, 83, 351-362, 1981.
- JOFFE, J.M., PERUZOVIC, M., MILKOVIC K. Progeny of male rats treated with methadone: Physiological and behavioral effects. **Mutat. Res.**, 229, 201-211, 1990.

- GERBER, N., LYNN, R.K. Excretion of methadone in semen from methadone addicts: Comparison with blood levels. **Life Sci.**, 19, 787-792, 1976.
- GERSHON, A.A. Chickenpox, measles, and mumps. In: REMINGTON, J.S., KLEIN, J.O., editors. **Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. Philadelphia, PA: Saunders, 565-618, 1995.
- GOLDZTEIN, L., MURPHY, D.P. Etiology of ill health in children born after maternal pelvic irradiation: Defective children born after postconception pelvic irradiation. **Am. J. Roentgenol.**, 22, 322, 1929.
- HANSEN, J.C., DEGUCHI, Y. Selenium and fertility in animals and man—a review. **Acta Vet. Scand.**, 37, 19–30, 1996.
- HIGA, K., DAN, K., MANABE, H. Varicella-zoster virus infections during pregnancy: Hipótesis concerning the mechanisms of congenital malformations. **Obstet. Gynecol.**, 69, 214-222, 1987.
- HOFFMAN, D.J., HEINZ, G.H. Embriotoxicity and teratogenic effects of selenium in the diet of mallards. **J. Toxicol. Environ. Health**, 24, 477-490, 1988.
- HOLMBERG, R.E., FERM, V.H. Interrelationships of selenium, cadmium and arsenic in mammalian teratogenesis. **Arch. Environ. Health**, 18, 873-877, 1969.
- HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu. Rev. Biochem.**, 54, 237-271, 1985.
- JELÍNEK, R. The contribution of new findings and ideas to the old principles of teratology. **Reprod. Toxicol.**, 20, 295-300, 2005.
- JONES, K.L., SMITH, D.W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early pregnancy. **Lancet**, 2, 989, 1973.

- KALTER, H. Teratology in the 20th century. Environment causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neurotoxicol. Teratol.**, 25, 131-282, 2003.
- KANDA, T., ENGMAN, L., COTGREAVE, I.A., POWIS, G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **J. Org. Chem.**, 64, 8161-8169, 1999.
- KAUR, P., BANSAL, M.P. Effect of selenium induced oxidative stress on the cell kinetics in testis and reproductive ability of male mice. **Nutrition**, 21, 351-357, 2005.
- KELSEY, F.O. Regulatory aspects of teratology: Role of the Food and Drug Administration, **Teratology**, 25, 193-199, 1982.
- KLAYMAN, D.L., GÜNTHER, W.H. (eds.). Organic selenium compounds: their chemistry and biology. New York: John Wiley and sons, 68-157, 1973.
- LAPORTE, J.R., TOGNONI, G., ROZENFELD, S. Epidemiologia do medicamento. São Paulo/Rio de Janeiro: Hucitec/Abrasco, 1989.
- LEE, M., CHAN, K.K., SAIRENJI, E., NIIKUNI, S.O. Effect of sodium selenite on methylmercury induced cleft palate in the mouse. **Environ. Res.**, 19, 39-48, 1979.
- LEMONICA, I.P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S., **Fundamentos de toxicologia**, 1. ed., São Paulo, Atheneu., 1996.
- LENZ, W. A short history of thalidomide embryopathy. **Teratology**, 38, 203-215, 1988.
- LUTWAK-MANN, C. Observations on progeny of thalidomide-treated male rabbits. **BMJ**, 1, 1090-1091, 1964.

- MACIEL, N., BOLZAN, R.C., BRAGA, A.L., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxic.**, 14, 310-319, 2000.
- MAIORINO, M., FLOHE, L., ROVERI, A., STEINERT, P., WISSING, J.B., URSINI, F. Selenium and reproduction. **BioFactors**, 10, 251–256, 1999.
- MANN, T., LUTWAK-MANN, C. Passage of chemicals into human and animal semen: Mechanisms and significance. In: Crit. Rev. Toxicol. CRC Press, Inc. Fla., 2, 1-14, 1982.
- MATTISON, D.R., OLSHAN A., (eds.). Male-mediated effects on reproduction and development. New York: Liss., 1994.
- 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., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environm. Res.**, 94, 276-282, 2004.
- MIRKIN, B.L. Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 14, 643-647, 1973.
- MORETTO, M.B., ROSSATO, J.I., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into brain synaptosomes is voltage-dependent. **J. Biochem. Mol. Toxic.**, 17, 154-160, 2003.

- MURPHY, D.P. Outcome of 625 pregnancies in women subjected to pelvic radium or roentgen irradiation. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 18, 79-87, 1929.
- NAU, H., HAUCK, R.S., EHLERS, K. Valproic acid induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug mechanism, pharmacokinetics and possible mechanism. **Pharmacol. Toxicol.**, 69, 310-321, 1991.
- NAVARRO-ALARCÓN, M., LÓPEZ-MARTINEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Tot. Environ.**, 249, 347-371, 2000.
- NELSON, B.K., MOORMAN, W.J., SCHRADER S.M. Review of experimental male-mediated behavioral and neurochemical disorders. **Neurotoxicol. Teratol.**, 18, 611-616, 1996.
- NEWMAN, C.G.H. The thalidomide syndrome: risks of exposure and spectrum of malformations. **Clin. Perinatol.**, 13, 555-573, 1986.
- NOBUNAGA, T., SATOH, H., SUZUKI, T. Effects of sodium selenite on methylmercury embryotoxicity and teratogenicity in mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 47, 79-88, 1979.
- 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., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, 191, 169-178, 2003b.

- NOGUEIRA, C.W., MEOTTI, F.C., CURTE, E., PILLISSÃO, C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Investigations into potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, 83, 29-37, 2003c.
- NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and Pharmacology. **Chem. Rev.**, 104, 6255-6286, 2004.
- NORRIS, M.L., BARTON, S.C., SURANI, M.A.H. The differential role of parental genomes in mammalian development. **Oxford Rev. Exp. Biol.**, 12, 225-244, 1990.
- OLSHAN, A.F., TESCHKE, K., BAIRD, P.A. Paternal occupational and congenital anomalies in offspring. **Am. J. Industrial Med.**, 20, 447-475, 1991.
- OLSHAN, A.F., FAUSTMAN, E.M. Male-mediated developmental toxicity. **Reprod. Toxicol.**, 7, 191-202, 1993.
- OPITZ, J.M. Tópicos recentes em genética clínica. Ribeirão Preto: Ed. Soc. Bras. Genética, 1977.
- PAINTER, E.P. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. **Chem. Rev.**, 28, 179-213, 1941
- PALMER, I.S., ARNOLD, R.L., CARLSON, C.W. Toxicity of various selenium derivatives to chick embryos. **Poultry Sci.**, 52, 1841-1846, 1973.
- PARNHAM, M.J., GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog. Drug Res.**, 36, 9-47, 1991.
- PAULMIER, C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), **Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis**, First ed. Pergamon Press, Oxford, England, p. 25-51, 1986.

- REMYINGTON, J.S., MCLEOD, R., DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S., KLEIN, J.O., editors. **Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. Philadelphia, PA: Saunders, 565-618, 1995.
- ROBAIRE, B. HALES, B.F. Paternal exposition to chemicals before conception. **British Med. J.**, 307, 341-342, 1993.
- ROSENFELD, I., BEATH, O.A. Congenital malformations of eyes of sheep. **J. Agric. Res.**, 75, 93-103, 1947.
- RUSSEL, L.B. The effects of radiation on mammalian prenatal development. In: HOLLAENDER, A., editor. **Radiation Biology**. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1, 861, 1954.
- SAVEGNAGO, L., TREVISAN, M., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Pharmacol. Toxicol.**, 21, 86-92, 2006.
- SCHILSKY, R.L., LEWIS, B.J., SHERINS, R.J., e cols. Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. **Annals of Internal Medicine**, 93, 109-114, 1980.
- SCHUMACHER, G-H. Teratology in cultural documents and today. **Ann. Anat.**, 186, 539-546, 2004.
- SHARIFF, M.A., KRISHNAMURTI, C.R., SCHAEFER, A.L., HEINDZE, A.M. Bidirectional transfer of selenium across the sheep placenta in utero. **Can. J. An. Sci.**, 64, 252-254, 1984.
- SHEPARD, T.H. **Catalog of teratogenic agents**. 7th ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 1992.

- SMITHELLS, R. W., NEWMAN C.G.H. Recognition of thalidomide defects. **J. Med. Genet.**, 29, 716-723, 1992.
- SOPRANO, D.R., SOPRANO, K.J. Retinoids as teratogens. **Annu. Rev. Nutr.**, 15, 111-132, 1995.
- SPRITZER, D.T. Exposição paterna. In: SANSEVERINO, M.T.V., SPRITZER, D.T., SCHÜLER-FACCINI, L. (Orgs.). **Manual de Teratogênese**, Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 469-473, 2001.
- STADTMAN, T.C. Selenium-dependent enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, 49, 93-110, 1980.
- STAGNO, S. Cytomegalovirus. In: REMINGTON, J.S., KLEIN, J.O., editors. **Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. Philadelphia, PA: Saunders, 565-618, 1995.
- STANGHERLIN, E.C., FAVERO, A.M., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Teratogenic vulnerability of rat fetuses to diphenyl ditelluride. **Toxicology**, 207, 231-239, 2005.
- STANGHERLIN, E.C., FAVERO, A.M., WEIS, S.N., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Assessment of reproductive toxicity in male rats following acute and sub-chronic exposures to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. **Food Chem. Toxicol.**, 44, 662-669, 2006a.
- STANGHERLIN, E.C., FAVERO, A.M., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Exposure of mothers to diphenyl ditelluride during the suckling period changes behavioral tendencies in their offspring. **Brain Res. Bul.**, 69, 311-317, 2006b.

- STREISSGUTH, A.P., LANDESMAN-DWYER, S. MARTIN, J.C. SMITH, D.W.
Teratogenic effects of alcohol in human and laboratory animals. **Science**, 209, 353-361, 1980.
- SWAN, C. TOSTEVIN, A.L. Congenital abnormalities in infants following infectious diseases during pregnancy, with special reference to rubella: a third series of cases. **Med. J. Aust.**, 1, 645-659, 1946.
- SCHWARTZ, K., FOLTSZ, P. J. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.**, 79, 200-214, 1957.
- TARANTAL, A.F., WILLHITE, C.C., LASLEY, B.L., MURPHY, C.J., MILLER, C.J., CUKIERSKI, M.J., BOOK, S.A, HENDRICKX, A.G. Developmental toxicity of L-selenomethionine in *Macaca fascicularis*. **Fundam. Appl. Toxicol.**, 16, 147-160, 1991.
- TINGGI U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. **Toxicol. Lett.**, 2003;137:103-10.
- URSINI, F., HEIM, S., KIESS, M., MAIORINO, M., ROVERI, A., WISSING, J., FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, 285, 1393-1396, 1990.
- USAMI, M., OHNO, Y. Teratogenic effects of selenium compounds on cultured postimplantation rat embryos. **Teratog. Carcinog. Mutag.**, 16, 27-36, 1996.
- US Environmental Protection Agency (US EPA). **Guidelines for reproductive toxicity risk assessment**. EPA/630/R-96/009, 1996.
- WARKANY, J., LEMIRE, R.J., COHEN, M.M. **Mental retardation and congenital malformations of the central nervous system**. Chicago, IL: Year Book Medical,

1981.

WILLHITE, C.C. Selenium teratogenesis. Species-dependent response and influence on reproduction. In: Keen CL, Bendich A, Willhite CC (Eds.), Ann NY Acad Sci Vol. 678, **Maternal Nutrition and Pregnancy Outcome**, New York Academic of Science, New York, pp. 167-177, 1993.

WILSON, J.G. Differentiation and the reaction of rat embryos to radiation. **J. Cell. Comp. Physiol. Supp.**, 1, 11, 1954.

WILSON, J.G. Current status of teratology. In: WILSON, J.G., FRASER, F.C. **The handbook of teratology**. New York: Plenum Press, 47-74, 1977.

YONEMOTO, J., SATO, H., HIMENO, S., SUZUKI, T. Toxic effects of sodium selenite on pregnant mice and modification of the effects by vitamin E or reduced glutathione. **Teratology**, 28, 333-340, 1983.

ZASSO, F.B., GONCALES, C.E.P., JUNG, E.A.C., ARALDI, D., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 19, 283–289, 2005.

ZENI, G., PANATIERI, R.B., LISSNER, E., MENEZES, P.H., BRAGA, A.L., STEFANI, H.A. Synthesis of polyacetylenic acids isolated from *Heisteria Acuminata*. **Org. Lett.**, 6, 819-821, 2001.

ZHANG, J., SAVITZ, D.A., SCHWINGL, P.J., CAI, W.W. A case-control study of paternal smoking and birth defects. **Int. J. Epidemiol.**, 21, 273-278, 1992.