



UFSM

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS
DE SELÊNIO E DE TELÚRIO SOBRE A INTEGRIDADE
ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE CÉLULAS SANGUÍNEAS
HUMANAS**

Danúbia Bonfanti dos Santos

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS
DE SELÊNIO E DE TELÚRIO SOBRE A INTEGRIDADE
ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE CÉLULAS SANGUÍNEAS
HUMANAS**

por

Danúbia Bonfanti dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica (PPGBT), 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

Orientadora: Nilda Berenice de Vargas Barbosa

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

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

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE
SELÊNIO E DE TELÚRIO SOBRE A INTEGRIDADE ESTRUTURAL E
FUNCIONAL DE CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS**

Elaborada por

Danúbia Bonfanti dos Santos

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

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a **Nilda Berenice de Vargas Barbosa** (UFSM)

Presidente/Orientadora

Prof. Dr. **Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues** (UFSM)

Prof. Dr. **Robson Luiz Puntel** (UNIPAMPA)

Santa Maria, 09 de Janeiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais...

... Por todo amor, carinho, compreensão e apoio.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades e principalmente pela vida.

Agradeço todas as pessoas que de certa forma colaboraram para realização desse trabalho.

Aos meus pais Paulo e Inês pelo amor, incentivo, compreensão em todos os momentos. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse vencer umais essa etapa.

A toda minha família em especial aos meus irmãos Débora, Dani e Diógenes por sempre estarem torcendo por mim.

A minha orientadora Nilda, pela paciência, dedicação e pela oportunidade de aprendizado. Também pelo exemplo de determinação e por me apoiar no crescimento profissional. Agradeço também a minha co-orientadora, Cristina, pelo apoio e aprendizado e por ter participado dessa trajetória.

Ao Professor João Batista Teixeira da Rocha por ter aberto as portas do laboratório para mim, pela disponibilização do espaço físico, pela contribuição que deu para a realização do trabalho e, principalmente, por tudo o que representou em minha formação.

E aos colegas de laboratório: Jéssie, Carol, Sally, Cássia, Rose, Daniel, Alessandra, Alessandro, Romaiana, Fernanda, Tammy, Douglas e a todos os outros pela amizade, companheirismo e parceria em momentos tão importantes, muito obrigada! Aos amigos que estão longe, mas que guardo um carinho especial Verônica e Patrícia. Também para amigos de perto, Dani!

Também agradeço aos professores Félix e Gilson, e aos colegas do laboratório pela amizade.

Sou grata as minhas grandes amigas e que me ensinaram muito, Viviane e Marinei! Agradeço também minhas ICs, Daia e Josi, pela amizade, dedicação na realização desse trabalho. Muito obrigada também para uma pessoa que foi muito especial nesses últimos meses, ajudando-me e apoiando nas horas difíceis, sendo companheiro e amigo, meu namorado Marcelo!

À Universidade Federal de Santa Maria, pela possibilidade de realização deste curso.

Aos professores da banca, pela disponibilidade por fazer a leitura desta dissertação e compor sua examinadora.

Aos professores do curso, ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica toxicológica e a CAPES, pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

E a todos que de certa forma colaboraram para realização desse trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

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

Avaliação dos efeitos de compostos orgânicos de selênio e de telúrio sobre a integridade estrutural e funcional de células sanguíneas humanas

AUTORA: Danúbia Bonfanti dos Santos
ORIENTADORA: Nilda de Vargas Barbosa
CO-ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira
LOCAL e DATA da DEFESA: Santa Maria, 09 de Janeiro de 2008.

Tendo em vista a ambigüidade de efeitos que podem ser exibidos pelos organocalcogênios e a necessidade de ampliar os estudos toxicológicos dos mesmos nos sistemas biológicos; o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da exposição de compostos orgânicos de selênio (Se) e telúrio (Te) sobre a integridade estrutural e funcional de eritrócitos humanos *in vitro*, assim como sobre o DNA de leucócitos humanos *in vitro*. Os eritrócitos e os leucócitos foram isolados e incubados com o veículo e diferentes compostos de Se e Te nas concentrações de 50, 75 e 100 μM . Após o período de incubação, a integridade estrutural e funcional dos eritrócitos foi avaliada através do teste de fragilidade osmótica, da atividade das enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e catalase e da determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de grupos -SH. Em leucócitos foi avaliado o dano no DNA e a viabilidade celular. Os resultados obtidos demonstraram que a hemólise, calculada através do teste de fragilidade osmótica, foi significativamente aumentada nos eritrócitos expostos aos compostos seleneto de difenila (**II**), disseleneto de difenila (**III**), telureto de difenila (**IV**), diterureto de difenila (**V**), (S)-2-amino-1-disseleneto-3-metilpropanil (**IX**), butil(stiril)telureto (**XIII**) e 2-(butiltelúrio)furano (**XIV**) quando comparado com os compostos usados como controles. Os compostos orgânicos de Se e de Te que apresentaram maior efeito hemolítico sobre os eritrócitos (**II** e **XIII**), não alteraram a atividade da enzima catalase e os níveis de EROs e grupos -SH. No entanto, ambos os compostos (**II** e **XIII**) causaram uma inibição significativa na atividade da enzima sulfidrídica $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, que foi dependente da concentração desses. Esta inibição foi totalmente revertida pela adição de ditioneitol (DTT), demonstrando que os organocalcogênios testados possuem afinidade pelos grupos tióis da enzima. Além disso, os compostos **II** e **XIII** exibiram atividade tiol oxidase, aumentando a taxa de oxidação do DTT. Em leucócitos os organocalcogênios **II** e **XIII** causaram efeitos genotóxicos e citotóxicos, verificados pelo testes do cometa e de viabilidade celular.

Palavras-chave: Telúrio, selênio, organocalcogênios, eritrócitos, leucócitos, DNA.

ABSTRACT

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

Effects of organic compounds of selenium and tellurium on the structural and functional integrity of human blood cells *in vitro*

AUTHOR: Danúbia Bonfanti dos Santos

ADVISOR: Nilda de Vargas Barbosa

CO-ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira

DATE and PLACE of the DEFENSE: Santa Maria, January 09, 2009.

In view of the need to expand the toxicologic studies of organochalcogens in biological systems, the aim of this study was to investigate the effect of exposure to organic compounds of selenium (Se) and tellurium (Te) on the structural and functional integrity of human cells *in vitro*. The erythrocytes and leukocytes cells were isolated and incubated with the vehicle or different compounds of Se and Te at concentrations of 50, 75 and 100 μM . After the incubation period, the structural and functional integrity of erythrocytes were evaluated through the osmotic fragility test, Na^+/K^+ ATPase and catalase activities, reactive oxygen species and SH levels. In leukocytes was verified the cell viability and DNA damage. The results showed that the hemolysis, measured through the test of osmotic fragility, was significantly increased in erythrocytes exposed to the compound diphenyl selenide (**II**), diphenyl diselenide (**III**), diphenyl telluride (**IV**), diphenyl ditelluride (**V**), (S)-2-amino-1-diselenide-3-methylpropanyl (**IX**), butyl (styryl) telluride (**XIII**) and 2 - (butyltellurium) furan (**XIV**) when compared to controls. The organic compounds **II** and **XIII**, that had greater hemolytic effect, did not alter the activity of catalase and reactive oxygen species (ROS) and $-\text{SH}$ levels. However, these compounds caused a significant inhibition on the activity of the enzyme Na^+/K^+ ATPase in a concentration dependent manner. This inhibition was totally reversed by addition of DTT, showing that the organochalcogens have affinity for thiol groups of the enzyme. Moreover, the rate of oxidation of DTT was significantly increased in the presence of both compounds, suggesting a thiol oxidase activity. Indeed, the compounds **II** and **XIII** were genotoxic and cytotoxic to human leukocytes.

Key-Words: Tellurium, selenium, organochalcogens, leukocytes, erythrocytes, DNA.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Representação das células sanguíneas: eritrócitos (a) e leucócitos(b). 11
- Figura 2.** Dano oxidativo em macromoléculas biológicas. 12

MANUSCRITO

Figure 1. Effect of organochalcogens diphenyl selenide **(II)** and butyl(styryl)telluride **(XIII)** on Na^+/K^+ ATPase activity of erythrocytes ghosts. The organochalcogens were pre-incubated with whole blood at 37°C for 10 min. After, ATP and/or DTT (3mM) were added to the medium and incubated for 90 min. The reaction was stoped with 250 μL of TCA 10% (TCA + HgCl 10mM). Results are expressed as mean \pm SEM for four independent experiments. Data of Na^+/K^+ ATPase activity are presented as nmol/Pi (mg/protein/min). *Denoted $p < 0.05$ compared to the control (ANOVA/Duncan). ^aDenoted $p < 0.05$ compared to the tubes with DTT (ANOVA/Duncan). 58

Figure 2. Effect of organochalcogens diphenyl selenide **(II)** and butyl(styryl)telluride **(XIII)** on the DTT oxidation. The rate of DTT oxidation was determined in the absence **(2A)** and presence of erythrocytes cells **(2B)** at different times (60, 180, 240 and 380 min). Data are means of five independent experiments. *Denoted $p < 0.05$ compared to controls (ANOVA/Duncan). 59

Figure 3. Effect of organochalcogens diphenyl selenide **(II)** and butyl(styryl)telluride **(XIII)** on Cell viability. Cell viability was determined after 90 min of incubation and calculated as the number of living cells divided by the total number of cells multiplied by 100. *Denoted $p > 0.05$ compared to control (DMSO) values in the same time of incubation (ANOVA/Duncan). 60

Figure 4A. Classification of DNA damage in human leukocytes. DNA damage index was classified in the visual score by the measurement of DNA migration length and on the amount of DNA in the tail. 61

Figure 4B. Effect of organochalcogens diphenyl selenide **(II)** and

butyl(styryl)telluride (**XIII**) in cometa assay. Peripheral blood leukocytes were incubated for 90 min with the control (DMSO), **II** and **XIII** compounds at concentrations of 50, 75 and 100 μM . The damage score for each sample can range from 0 (completely undamaged – 100 cells x 0) to 4 (maximum damaged – 100 cells x 4). Results are expressed as mean \pm SEM for four independent experiments. ^aDenoted $p < 0.05$ compared to control compound (ANOVA/Duncan). [#]Significant difference among the same concentrations of the differ compounds ($p < 0.05$; ANOVA/Duncan).

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

- Table 1.** Hemolytic potency of biphenyl **(I)**, diphenyl selenide **(II)**, diphenyl diselenide **(III)**, diphenyl telluride **(IV)**, diphenyl ditelluride **(V)** in the OF test in human erythrocytes. 51
- Table 2.** Hemolytic potency of (S)-2-amino-3-methyl-butan 1-ol **(VI)**, (S)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-methylbutan-2-ylcarbamate **(VII)**, (S)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-phenylpropan-2-ylcarbamate **(VIII)**, (S) 2-amino-1-diselenide-3-methylpropanyl **(IX)**, (S)-2-amino-1 diselenide-3-phenylpropanyl **(X)** on OF test in human erythrocytes. 52
- Table 3.** Hemolytic effect of benzene **(XI)**, thiophene **(XII)**, butyl(styryl)telluride, 2-(butyltellurium)thiophene **(XIV)** and 2 (butyltellurium)furan **(XV)** on OF test in human erythrocytes. 53
- Table 4.** Effect of organochalcogens diphenyl selenide **(II)** and butyl(styryl)telluride **(XIII)** on -SH content, catalase activity and ROS levels. 54
- Table 5.** Effect of organochalcogens diphenyl selenide **(II)** and butyl(styryl)telluride **(XIII)** on the rate of DTT oxidation . 55

LISTA DE ABREVIATURAS

EROs -espécies reativas de oxigênio

Se - selênio

Te - telúrio

GSH - glutathiona reduzida

GPx - glutathiona peroxidase

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

DMSO - dimetil sulfóxido

DTT - DL-ditionitrosol

CAT - catalase

SOD - superóxido dismutase

Na₂SeO₃ - selenito de sódio

SeO₂ - dióxido de selênio

DNA - Ácido desoxirribonucléico

PCR - Reação em cadeia da polimerase

ANOVA - análise de variância

-SH - tióis

SHT - tióis totais

SHNP - tióis não protéicos

(PhTe)₂ - ditelureto de difenila

(PhSe)₂ - disseleneto de difenila

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
Agradecimentos	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
APRESENTAÇÃO	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Selênio	4
2.2 Telúrio	5
2.3 Compostos Organocalcogênios	7
2.3.1 Compostos orgânicos de selênio: propriedades farmacológicas e toxicológicas	8
2.3.2 Compostos orgânicos de telúrio: propriedades farmacológicas e toxicológicas	9
2.4 Células sangüíneas: um modelo simples para avaliação de parâmetros farmacológicos e toxicológicos	10
2.5 Indicativos de toxicidade	11
2.5.1 Fragilidade osmótica e hemólise	11
2.5.2 As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes	12
2.5.3 Enzima Na ⁺ /K ⁺ ATPase	13
2.5.4 Viabilidade celular e teste cometa	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4 MANUSCRITO	15
4.1 Hemolytic and Genotoxic Evaluation of Organochalcogens in	16

Human Blood Cells <i>in vitro</i>.	
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	68
7 PERSPECTIVAS	69
8 DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E MESTRADO	70
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação está escrita da seguinte forma: primeiramente são apresentados os itens Introdução, Revisão Bibliográfica e Objetivos. A seguir os resultados serão apresentados na forma de manuscrito, o qual foi escrito seguindo as normas do periódico submetido à publicação. Os itens discussão e conclusão, dispostos no manuscrito contêm interpretação e comentários gerais referente ao manuscrito. As Referências Bibliográficas citadas ao final da dissertação referem-se aos itens Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão.

No item **INTRODUÇÃO**, é feita uma abordagem geral sobre o tema desta dissertação. No item **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, está descrita uma sucinta revisão sobre os temas trabalhados e seus objetivos. Já as seções **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. No item **PERSPECTIVAS**, estão expostos os possíveis estudos para continuação deste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

Os elementos selênio (Se) e telúrio (Te) pertencem à família dos calcogênios e deste modo, compartilham algumas características e propriedades químicas (RAMADAN e cols., 1989; BUDISA e cols., 1995). A maioria das descobertas importantes sobre o Se foram realizadas nas décadas de 30 e 40 do século anterior e, tiveram um papel fundamental no estudo dos efeitos tóxicos deste elemento quando ingerido em altas concentrações (MOXON E RHIAN, 1943). Por outro lado, na década de 50, o Se foi identificado como um micronutriente essencial à dieta de humanos e outros animais (SCHWARTZ E FOLTZ, 1957). Desde então, a pesquisa para elucidar o metabolismo e o papel biológico deste elemento aumentou notavelmente.

Atualmente, é bem reconhecido que o Se além de ser componente de enzimas importantes, como das isoformas da glutathiona peroxidase e do sistema tioredoxina redutase (ROTRUCK e cols., 1973; GANTHER, 1999; RAYMAN, 2000); também exerce atividades farmacológicas na prevenção e tratamento de inúmeras patologias, como por exemplo, o câncer e desordens cardiovasculares (EL-BAYOUMY, 1991).

De acordo, estudos mais recentes têm demonstrado que determinados compostos orgânicos de Se, como o ebselen e o disseleneto de difenila (PhSe)₂, exibem propriedades antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica, antidiabetogênica e hepato-protetora, entre outras (RAYMAN, 2000; MUGESH e cols., 2001; KLOTZ E SIES, 2003; EL-BAYOUMY E SINHA, 2004; DAS e cols., 2005; BORGES e cols., 2006; BARBOSA e cols., 2008). No entanto, a dose e/ou concentração dos compostos de Se a ser utilizada constitui um fator importante na sua atividade biológica, uma vez que, em doses maiores que as farmacológicas o Se pode causar efeitos tóxicos em diferentes espécies e tecidos (NOGUEIRA e cols., 2004). Embora os mecanismos pelos quais o Se exerça toxicidade não se encontrem totalmente elucidados, tem sido fortemente sugerido que a ação tóxica de determinados compostos de Se está associada a sua capacidade de promover a oxidação de tióis e a gênese de espécies reativas de oxigênio (BARBOSA e cols., 1998; SPALLHOZ, 2001; NOGUEIRA e cols., 2004;). De acordo com tais constatações, estudos têm mostrado que o composto orgânico de Se, (PhSe)₂, é

capaz de inibir a enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) *in vivo* e *in vitro*, de promover a depleção de grupos tióis de importância biológica e de causar danos cerebrais e hepáticos em animais experimentais devido a sua atividade pró-oxidante (BARBOSA e cols., 1998; MACIEL e cols., 2000; JACQUES-SILVA e cols., 2001; e FARINA e cols., 2004).

Determinados compostos orgânicos de telúrio, bem como o Te elementar, apresentam muitas aplicações químico-industriais. No entanto, pouco se sabe sobre a ocorrência do elemento Te nos sistemas biológicos (CHASTEEN E BENTLEY, 2003). Alguns estudos têm evidenciado que alguns organotelúrios exibem propriedades farmacológicas como agentes imunomoduladores (NYSKA e cols., 1989), antioxidantes e antiinflamatórios (ENGMAN e cols., 1992; ANDERSSON e cols., 1993; ENGMAN e cols., 1995; KANSKI e cols., 2001; NOGUEIRA e cols., 2004).

Com relação à toxicologia, tem sido observado que muitos compostos orgânicos de Te são altamente tóxicos para células neurais e sanguíneas, assim como podem induzir efeitos teratogênicos em ratos (NOGUEIRA e cols., 2003B, BORGES e cols., 2004; STANGHERLIN e cols., 2005). Semelhante a alguns compostos orgânicos de selênio, a toxicidade de compostos de Te parece envolver uma atividade pró-oxidante.

Os eritrócitos representam mais de 90% das células sanguíneas e devido às suas características estruturais e moleculares têm sido extensivamente usados como modelos experimentais em estudos toxicológicos e farmacológicos, principalmente para a avaliação de efeitos de agentes pró-oxidantes. Realmente, a fragilidade osmótica (FO), a atividade de ATPases de membrana, bem como o estado antioxidante eritrocitário, encontram-se significativamente alterados em diversas patologias que têm o estresse oxidativo como evento envolvido em sua gênese e/ou desenvolvimento (PADMA e cols., 2001; NANDHINI e cols., 2003; REDDY e cols., 2007). Estudos recentes têm investigado a ação de compostos de selênio sobre eritrócitos humanos com o propósito de ampliar os conhecimentos sobre os efeitos biológicos e toxicológicos do elemento. O efeito hemolítico causado por determinadas formas orgânicas e inorgânicas de Se parece depender do tempo de exposição e da concentração do composto (TIANO e cols., 2000; BRANDÃO e cols., 2005; SCHIAR e cols., 2007). Além disso, a hemólise induzida por compostos de Se, como selenito de sódio (Na_2SeO_3) e dióxido de selênio (SeO_2), parece estar

associada à capacidade dos mesmos em promover a depleção do conteúdo de GSH celular (HU E SPALLHOZ, 1983; BRANDÃO e cols., 2005). Por outro lado, em baixas concentrações, o Na_2SeO_3 é capaz de proteger eritrócitos humanos de alterações provocadas pelo envelhecimento como: aumento na fluidez de membranas, inibição das enzimas Na^+/K^+ ATPase e glutathiona peroxidase (GPX), assim como, decréscimo no conteúdo da proteína espectrina (WO e YANG, 1986). Neste contexto, também tem sido demonstrado que o tratamento com antioxidantes é eficaz em diminuir a fragilidade osmótica induzida por insultos oxidativos em eritrócitos (KUNWAR e cols., 2007; IP e cols., 2007; REDDY e cols., 2007).

A avaliação de dano ao DNA, determinada pelo teste do cometa em leucócitos, também é um método bastante utilizado como indicativo de toxicidade para diversos agentes pró-oxidantes. Com relação à organocalcogênios, há evidências de que determinados compostos de Se, mesmo com atividades farmacológicas já bem estabelecidas, assim como alguns compostos organotelúrios, são altamente genotóxicos quando usados em doses altas ou de forma crônica (KURANTSIN-MILLS e cols., 1988; TIANO e cols., 2000; EL-BAYOUMY, 2001; ROSA e cols., 2004; CEMELI e cols., 2006).

Considerando o uso de eritrócitos e leucócitos humanos como modelos simples e eficientes para investigar injúrias oxidativas em células humanas; além da necessidade de ampliar os estudos toxicológicos e farmacológicos sobre os organocalcogênios, faz-se importante à realização de trabalhos que investiguem os efeitos de diferentes compostos de Se e Te sobre a funcionalidade destas células sangüíneas. Além disso, devido ao fato dos organocalcogênios serem comumente usados na síntese orgânica, é de crucial importância determinar o potencial genotóxico dos mesmos para a tomada de cuidados e prevenções durante a exposição ocupacional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O selênio

O selênio foi descoberto em 1817, pelo químico sueco J. J. Berzelius. Esse elemento químico do grupo 16 da tabela periódica, conhecido como um calcogênio, pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}). Devido à similaridade entre as propriedades químicas do selênio com o enxofre, tem sido estimulada tanto a síntese como o estudo, com fins comparativos, de uma grande variedade de moléculas contendo selênio com semelhança estrutural aos tióis (PARNHAM e GRAF, 1991). Entretanto, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre Se e enxofre constituem as bases de seus papéis biológicos específicos (STADTMAN, 1980).

O Se é um elemento traço, cuja essencialidade nutricional, foi demonstrada pela primeira vez em 1957, em ratos (SCHWARTZ e FOLTZ, 1957). Nos últimos anos, níveis baixos de selênio têm sido descritos como fator de predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose cardiovascular, cirrose e diabetes (NAVARRO-ALARCÓN e LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000). Problemas musculares, alterações digestivas, doenças cardiovasculares e alterações reumáticas também estão associados à deficiência de Se no organismo (NEVE e cols., 1987). Além disso, níveis normais de Se no organismo parecem ser indispensáveis para o apropriado funcionamento do sistema imunológico (RAYMAN, 2000). Com base em tais constatações, a suplementação de dietas com Se foi aceita pela comunidade científica e a Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propôs uma ingestão diária de 50 - 200 μg para humanos (Food and Nutrition Board, 1989).

A essencialidade do Se reside principalmente no fato do mesmo fazer parte, sob a forma de selenocisteína, do centro ativo de enzimas com atividade antioxidante como a glutathione peroxidase (GPx) (FLOHE e cols., 1989; ROTRUCKE cols., 1973) e a fosfolípídeo hidroperóxido glutathione peroxidase (URSINI e cols., 1982). Como consequência do papel fundamental do Se no sítio ativo de enzimas antioxidantes e da procura pelo entendimento das funções fisiológicas do Se na

regulação do dano oxidativo (CADENAS e SIES, 1985; URSINI e BINDOLI, 1987), aumentou consideravelmente o interesse científico pela síntese de compostos orgânicos contendo Se que possuam propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (PARNHAM e GRAF, 1991). No entanto, a dose de Se a ser administrada e/ou ingerida também constitui um fator crítico na atividade biológica do elemento, uma vez que a quantidade nutricionalmente requerida de selênio é muito próxima da quantidade considerada tóxica.

Embora o Se seja bem reconhecido como elemento essencial e apresente uma variedade de efeitos protetores para humanos e animais (COMBS e GRAY, 1998), sua toxicidade foi descrita ainda em 1941 (PAINTER, 1941). Apesar, do mecanismo pelo qual este elemento exerce toxicidade não se encontrar totalmente elucidado, vários estudos tem evidenciado que os efeitos tóxicos do Se estão relacionados com a sua habilidade em catalisar a oxidação de tióis endógenos e com a formação de radicais livres (SEKO e cols., 1989, SPALLHOZ e cols., 1994; BARBOSA e cols., 1998; NOGUEIRA e cols., 2003A; 2004). De acordo, estudos têm evidenciado que determinados compostos orgânicos de Se, como o $(\text{PhSe})_2$, quando em altas concentrações, inibem enzimas sulfidrílicas como a δ -ALA-D e a Na^+/K^+ ATPase *in vitro* e *in vivo* por oxidarem seus grupamentos -SH (BARBOSA e cols., 1998; MACIEL e cols., 2003; NOGUEIRA e cols., 2004).

2.2 O telúrio

O elemento Te foi descoberto em 1782, entretanto, a inclusão deste átomo em moléculas orgânicas ocorreu somente no início do século XIX. Os efeitos do Te sobre o organismo animal começaram ser estudados por Gmelin em 1824. Contudo, os primeiros relatos a respeito da toxicidade deste elemento aconteceram após o acidente de Windscale (UK) na Europa (STEWART e CROOKS, 1958). No Brasil, a química do Te foi introduzida pelo professor Nicola Petraghani, o qual se dedica ao estudo de compostos orgânicos contendo Te e sua aplicabilidade como intermediários em síntese orgânica (PETRAGNANI, 1995; COMASSETO e cols. 1997).

O Te, assim como o enxofre e o Se, pertence ao grupo 16, da tabela periódica e pode apresentar-se sob diferentes estados de oxidação: telurato (Te^{+6}), telurito (Te^{+4}), telúrio elementar (Te^0) e telureto (Te^{-2}); sendo encontrado com maior frequência na forma de teluretos (SCANSETTI, 1992). O Te elementar (Te^0) é usado como componente de ligas metálicas, na composição da borracha, na indústria de microchips, de componentes eletrônicos e em sistemas de energia fotovoltaica. Ele também é utilizado na produção industrial de vidro e aço, e como um aditivo anti-detonante na gasolina (FAIRHILL, 1969). O Te pode ser encontrado em muitos minérios, juntamente com o Se, e é sintetizado como um sub-produto no refinamento do cobre, do chumbo, do bismuto e de outros metais (U.S. Bureau of Mines, 1985). O Te inorgânico pode ser encontrado em soluções oxidantes para polir metais (YAREMA e CURRY, 2005) e na indústria de semicondutores particulados (GREEN e cols., 2007; ZHANG e SWIHART, 2007).

Ao contrário do Se, o Te não apresenta nenhuma função biológica descrita até o momento (TAYLOR, 1996; NOGUEIRA e cols., 2004). Entretanto, as configurações eletrônicas do Se e do Te são semelhantes, e conseqüentemente, estes apresentam algumas características similares, dentre elas, a toxicidade.

O Te pode ser prontamente absorvido pelo organismo, através da dieta, principalmente na forma de compostos orgânicos. Entretanto, a exposição e a absorção de Te inorgânico na forma de teluritos e teluratos também pode ocorrer (LARNER, 1995). Casos de intoxicação ocupacional aguda por Te são raros, entretanto, quando ocorrem podem causar sintomas como dores de cabeça, sonolência, náuseas, alteração da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho na respiração e na urina (MÜLLER e cols., 1989; TAYLOR, 1996).

Estudos têm evidenciado que alguns compostos de Te inorgânico, como o telurito inorgânico, são potentes agentes neurotóxicos e teratogênicos para ratos (AGNEW, 1972; LACASSE e RICHTER, 1976). Além disso, a exposição a determinadas formas de compostos de Te pode causar hidrocefalia, hipomielinização ou desmielinização cerebral (PEREZD'GREGORIO e MILLER, 1988; TAYLOR, 1996). A toxicidade do Te em mamíferos em desenvolvimento, também pode afetar outros tecidos e órgãos como, por exemplo, pele e rins (TAYLOR, 1996).

A ação tóxica do Te parece estar relacionada ao seu estado de oxidação (VAN VLEET e cols., 1982) e o mecanismo proposto para explicar a toxicidade de alguns compostos contendo Te envolve sua capacidade em oxidar grupos -SH de moléculas biologicamente ativas (BLAIS e cols., 1972; YOUNG e cols., 1981; DEUTICKE e cols., 1992). De fato, determinados compostos de Te são considerados potentes agentes neurotóxicos por bloquearem a síntese do colesterol, um precursor da mielina, via inibição da enzima sulfidrílica esqualeno monooxigenase (LADEN e PORTER, 2001). Sendo assim, o Te inibe a síntese de colesterol nas células de Schwann, o que resulta no bloqueio da formação de mielina e no acúmulo de esqualeno. A consequência desse processo é uma desmielinização ou hipomielinização neuronal, que pode ser a causa das neuropatias ocasionadas pela exposição a compostos de Te (WAGNER-RECIO e cols., 1991). Além disso, a exposição ao Te pode causar o desenvolvimento de neuropatia periférica (DUCKETT e cols., 1979; HARRY e cols., 1989; LAMPERT e GARRETT, 1971) por afetar a produção de proteínas mielínicas à nível de gene (MORELL e cols., 1994). De fato, alterações neuromusculares têm sido identificadas em animais após a administração de telurito inorgânico (DUCKETT e cols., 1979). A suscetibilidade preferencial do sistema nervoso periférico à toxicidade do Te parece depender da grande demanda de colesterol pelos nervos periféricos, e da menor taxa de acúmulo de colesterol no cérebro (RAWLINS e SMITH, 1971).

2.3 Compostos Organocalcogênios

O interesse pelos organocalcogênios teve início a partir de 1930, após a descoberta de aplicações sintéticas e de propriedades biológicas interessantes para esta classe de compostos (PETRAGNANI e cols., 1976; COMASSETO, 1983; PARNHAM e GRAF, 1991; KANDA e cols., 1999). Consequentemente, a tentativa crescente de desenvolver compostos que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas aumentou notavelmente nas últimas décadas (PARNHAM e GRAF, 1991). Porém, o risco de contaminação ocupacional também tem motivado os estudos toxicológicos sobre os organocalcogênios, uma vez que estes são importantes intermediários e reagentes utilizados em síntese orgânica (PAULMIER, 1986).

2.3.1 Compostos orgânicos de Se: Propriedades Farmacológicas e Toxicológicas

Vários trabalhos têm demonstrado que compostos orgânicos de Se, como o disseleneto de difenila (PhSe)₂ e o ebselen exibem propriedades farmacológicas bastante importantes (BARBOSA e cols., 2008; CENTURIÃO e cols., 2004; NOGUEIRA e cols., 2004). Estes compostos estão sendo alvo de estudos desde a década de 80, principalmente por apresentar atividade mimética da enzima glutationa peroxidase (GPx) (MÜLLER e cols., 1984; WENDEL e cols., 1984; WILSON e cols., 1989). Desde então, vem crescendo enormemente o número de evidências mostrando que estes compostos exercem proteção nos mais diversos tipos celulares para os mais diversos tipos de injúria tecidual como (PARNHAM e GRAF, 1991; NOGUEIRA e cols., 2003a; 2004). De fato, o disseleneto de difenila, por exemplo, apresenta atividade antiinflamatória, anti-nociceptiva, neuroprotetora, quimioprotetora, antidiabetogênica e antioxidante (COMMANDEUR e cols., 2001; ROSSATO e cols., 2002a; GHISLENI e cols., 2003; NOGUEIRA e cols., 2003b., BARBOSA e cols., 2008) e não causa efeitos tóxicos quando administrado em baixas doses e de forma aguda em ratos e camundongos. Além disso, este composto facilita a memória de reconhecimento de objetos em roedores, o que pode estar relacionado com as suas ações neuroprotetoras (ROSA e cols., 2003).

Entretanto, apesar de suas propriedades farmacológicas benéficas, o disseleneto de difenila também pode causar efeitos tóxicos em várias espécies (LETAVAYOVÁ e cols., 2008; SCHIAR e cols., 2007). Tem sido demonstrado que a exposição prolongada a doses altas do composto causa neurotoxicidade em roedores (NOGUEIRA e cols., 2003a). Neste contexto, estudos com camundongos evidenciaram que, devido a sua grande lipofilicidade, o composto atravessa facilmente a barreira cérebro-sangue após tratamento agudo ou prolongado, aumentando os níveis de Se no cérebro dos animais (JACQUES-SILVA e cols., 2001; MACIEL e cols., 2003). Assim, esses trabalhos dão suporte para a hipótese que o cérebro é um órgão alvo tanto para as ações terapêuticas como para as ações tóxicas do composto orgânico (PhSe)₂.

Nosso grupo tem demonstrado ainda que determinadas formas orgânicas de Se podem ser nocivas para e enzimas de diversos tecidos de mamíferos, como a δ-ALA-D e Na⁺/K⁺ ATPase (NOGUEIRA e cols., 2004; BORGES e cols., 2005, 2007;

KADE e cols., 2008). De acordo, em mamíferos, a toxicidade do composto $(\text{PhSe})_2$ é caracterizada pela perda de peso (FAVERO e cols., 2005), pela neurotoxicidade (BORGES e cols., 2005; ROSA e cols., 2007A) e pelo desenvolvimento de transtornos hematológicos, tais como anemia e leucopenia (BORGES e cols., 2007), que podem ser causados por perturbações no equilíbrio tiol (MACIEL e cols., 2000). Além disso, a genotoxicidade e a citotoxicidade de alguns compostos de Se tem sido associada às suas propriedades pró-oxidantes (SHAMBERGER, 1985; CEMELI e cols., 2006; LETAVAYOVÁ e cols., 2006; ROSA e cols., 2004, 2007B).

2.3.2 Compostos orgânicos de Te: Propriedades Farmacológicas e Toxicológicas

Os compostos orgânicos de Te apresentam propriedades imunomoduladoras, podendo ser usados como drogas antitumorais, antivirais e antiinflamatórias (SREDNI e cols., 1987, 1988; NYSKA e cols., 1989, SUN e cols., 1996). Além disso, estudos têm demonstrado que os diteluretos de diarila podem exibir atividade antioxidante (ENGMAN e cols., 1995; ANDERSSON e cols., 1994; KANDA e cols., 1999) e são capazes de mimetizar a atividade da enzima GPx (ANDERSSON e cols., 1993; ENGMAN e cols., 1992), uma importante enzima endógena que participa de reações de neutralização de agentes pró-oxidantes. Conseqüentemente, o emprego farmacológico desses agentes poderá crescer nas próximas décadas.

De acordo, o composto orgânico de Te ditelureto de difenila $(\text{PhTe})_2$, exibe atividade tiol peroxidase, decompondo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e uma variedade de outros hidroperóxidos lipídicos em água ou seus alcoóis equivalentes, utilizando glutathione (GSH) ou outros tióis sintéticos reduzidos como doadores de elétrons (ENGMAN e cols., 1992; KANDA e cols., 1999; KLOTZ e cols., 2003; NOGUEIRA e cols., 2004). Contudo, o composto $(\text{PhTe})_2$ também possui efeitos tóxicos, os quais parecem ser mais potentes que os causados pelo seu análogo estrutural $(\text{PhSe})_2$. Dentre estes efeitos, cabe salientar os neurotóxicos observados em camundongos após exposição aguda e/ou prolongada ao composto (MACIEL e cols., 2000; WIDY-TYSZIEWICZ e cols., 2002). Além disso, estudos mais recentes têm constatado que a exposição à este composto, causa teratogênese (STANGHERLIN e cols., 2005), e induz efeitos tóxicos em plaquetas, leucócitos, eritrócitos e promielócitos (SAILER e cols., 2003; BORGES e cols., 2004, 2007) de

ratos. Da mesma forma, há evidências de que alguns teluretos de diarila são potentes agentes genotóxicos quando usados em doses altas ou de forma crônica (TIANO et al., 2000).

2.4 Células Sangüíneas: Um modelo simples para a Avaliação de Parâmetros Farmacológicos e Toxicológicos

O sangue humano constitui uma fonte simples de vários tipos celulares com propriedades estruturais e metabólicas peculiares, que o tornam um tecido-alvo para estudos farmacológicos e toxicológicos, bem como para o biomonitoramento de intoxicações ocupacionais e de doenças (COLLINS e cols., 1998; 2008).

Os eritrócitos (Figura 1a) são células sanguíneas que contêm altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferrosos (NIKI e cols., 1991). Como conseqüência, são altamente vulneráveis à ação de agentes oxidantes e de radicais livres e, portanto muito suscetíveis à peroxidação lipídica, a depleção de GSH celular (ROHN e cols., 1993; EL-MISSIRY E ABOU-SEIF, 2000; DEVASENA e cols., 2001) e à alterações na integridade estrutural como: mudanças na fluidez da membrana e hemólise (ZAVODNIK e cols., 1986; PRASANTHI e cols., 2005; SICIŃSKA e cols., 2007). No entanto, como resposta compensatória à alta susceptibilidade aos insultos oxidantes, os eritrócitos são dotados de um eficiente sistema antioxidante citoplasmático representado principalmente pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), GPx e uma alta quantidade de GSH (CLEMENS E WAILER, 1987).

Já os leucócitos (Figura 1b) são geralmente as únicas células que estão disponíveis para o biomonitoramento da genotoxicidade em humanos. As vantagens do uso de leucócitos para esse fim, reside no fato dos mesmos serem facilmente obtidos em grandes quantidades e não requererem facilidades no seu cultivo celular, uma vez que são células diplóides e estão quase todos na mesma fase do ciclo celular (COLLINS e cols., 2008).

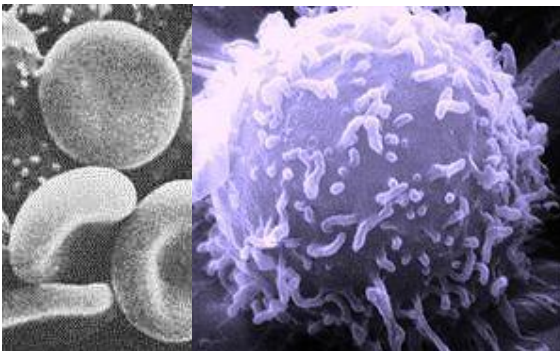


Figura 1. Microscopia eletrônica de eritrócitos (1a, direita) e leucócitos (1b, esquerda).

2.5 Indicadores de toxicidade

2.5.1 Fragilidade osmótica e Hemólise

A capacidade da membrana celular em controlar as funções celulares envolve a integridade dos arranjos espaciais e intermoleculares de seus componentes. No entanto, tal arranjo pode ser perdido como consequência de inúmeras situações como pelo ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante eventos que causem ou aumentem o estresse oxidativo. Em tais condições pode haver ruptura da membrana e hemólise celular.

O teste de fragilidade osmótica é freqüentemente realizado para avaliar a sensibilidade dos eritrócitos em um meio com salina hipotônica, ou seja, este teste reflete a habilidade dos eritrócitos em ocupar uma determinada quantidade de água antes da lise. A capacidade normal de eritrócitos para resistir a hipotonicidade resulta da sua forma bicôncava, que lhes permite aumentar o volume em cerca de 70% da superfície da membrana. Depois que esse limite é atingido, ocorre a lise da membrana. Portanto, a medida da fragilidade osmótica fornece um indicador útil para determinar se a funcionalidade dos eritrócitos de um paciente encontra-se normal.

2.5.2. As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as Defesas Antioxidantes

As células estão continuamente produzindo radicais livres e EROs como parte dos processos metabólicos. Tais espécies são capazes de gerar estresse oxidativo em decorrência de suas propriedades oxidantes. As principais EROs vinculadas ao estresse oxidativo são o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}), o H_2O_2 , o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1989). Estas espécies podem ser neutralizadas por um elaborado sistema de defesas antioxidantes. As defesas enzimáticas são representadas principalmente pelas enzimas CAT, SOD, GPx, glutathiona redutase e glutathiona S-transferase, e as não-enzimáticas pelas vitaminas A, E e C, flavonóides, ubiquinonas e pela GSH (JI e FU, 1992; MIEYAL e cols., 1995; ALEXI e cols., 1998; GIANNI e cols., 2004).

Assim, o estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que ocorre uma diminuição nos níveis das defesas antioxidantes tanto enzimáticas quanto não enzimáticas do organismo, de uma elevada produção de espécies reativas ou de uma combinação de ambos os fatores. Esse quadro de estresse oxidativo pode causar danos a todas as estruturas celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas de membranas biológicas (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1989; DAWSON e DAWSON, 1996) (Figura 2). Assim a determinação dos níveis de EROs bem como das defesas antioxidantes celulares servem como medidas efetivas para a avaliação de estresse oxidativo e dano celular.

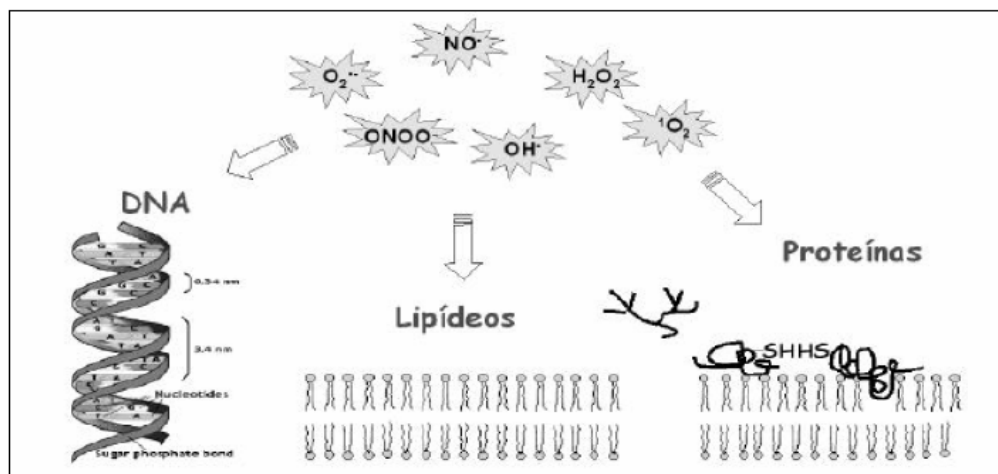


Fig 2. Dano oxidativo em macromoléculas biológicas.

(adaptado de Torres, 2003)

2.5.3 Enzima Na⁺/K⁺ ATPase

A Na⁺/K⁺ ATPase (EC 3.6.1.37) é uma enzima de natureza sulfidrílica, sensível a agentes oxidantes (FOLMER e cols., 2004). Ela se encontra embebida na membrana celular e é responsável pelo transporte ativo dos íons sódio e potássio nas células. Sendo assim, sua ação regula as concentrações de Na⁺ e K⁺, e, portanto, o gradiente iônico através da membrana plasmática. Esse processo é requerido para funções vitais como co-transportes pela membrana, regulação do volume celular e excitabilidade (DOUCET, 1988; JORGENSEN, 1986). A inativação da enzima Na⁺/K⁺ ATPase leva à uma despolarização parcial da membrana, seguida de uma entrada excessiva de Ca²⁺ para dentro das células, o que culmina com a geração de eventos tóxicos, tais como a excitotoxicidade (BEAL e cols., 1993). Em eritrócitos a atividade da enzima Na⁺/K⁺ ATPase também é de fundamental importância para estabilidade osmótica.

2.5.4 Viabilidade Celular e Teste do Cometa

A alta viabilidade é requerida como um dos pré-requisitos para o teste cometa. As células que são levadas à morte são ditas inviáveis. O uso do azul de Tripán apesar de não medir viabilidade, indica se as membranas das células estão intactas. As células com dano nas membranas são ditas azul de Tripán positivas, mas podem se recuperar e sobreviver. Então por definição elas poderiam ser viáveis (COLLINS e cols., 2008).

O teste cometa denominado também de eletroforese de gel em células individuais é um método simples para a medida de quebra da fita do ácido desoxirribonucléico (DNA) em células eucarióticas. O dano no DNA verificado no teste do cometa pode ser induzido por vários agentes genotóxicos, como por exemplo, pelo H₂O₂, que causa um dano oxidativo no DNA (GABRIELSON e cols., 1989). Assim, o teste tem importantes aplicações na verificação dos efeitos genotóxicos de compostos químicos, na monitorização ambiental, na contaminação com agentes genotóxicos, no biomonitoramento de intoxicações em humanos, na epidemiologia molecular e em pesquisas que visem avaliar dano e reparo do DNA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo principal do trabalho está centrado em verificar os efeitos da exposição de compostos orgânicos de selênio e telúrio sobre a integridade estrutural e funcional de eritrócitos humanos *in vitro* e sobre o DNA de leucócitos *in vitro*, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos em tais efeitos.

Realizar “um estudo de triagem”, através de técnicas relativamente simples, na escolha por organocalcogênios que possam causar efeitos tóxicos aos seres humanos.

3.2 Objetivos Específicos

- 1 - Avaliar o efeito de distintos organocalcogênios, em diferentes concentrações, sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos;
- 2 - determinar a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase de eritrócitos (ghost) humanos expostos aos organocalcogênios que apresentarem maior ação hemolítica;
- 3 - avaliar os possíveis danos oxidativos causados pelos organocalcogênios que exibirem maior potencial hemolítico, através da determinação da atividade da enzima catalase e da análise dos níveis de ROS, tióis não proteicos (SHNP) e tióis totais (SHT) em eritrócitos e plasma;
- 4 - avaliar a viabilidade de leucócitos expostos aos organocalcogênios que apresentarem maior potencial hemolítico;
- 5 - investigar o possível efeito genotóxico dos organocalcogênios, que exibirem maior potencial hemolítico, através do teste cometa em leucócitos;
- 6 - investigar o possível mecanismo de ação envolvido nos efeitos tóxicos dos organocalcogênios testados.

4 MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. O **Manuscrito** está disposto na forma como foi submetido para a revista científica selecionada.

4.1 Avaliação hemolítica e genotóxica de organocalcogênios em células do sangue humano *in vitro*

Manuscrito

Hemolytic and Genotoxic Evaluation of Organochalcogens in Human Blood Cells *in vitro*.

Danúbia Bonfanti dos Santos^a, Viviane Patrícia P. Schiar^a, Márcio Weber Paixão^a,
Cristina W. Nogueira^a, Mychael Aschner^b, João Batista T. Rocha^a e Nilda B. Vargas
Barbosa^{*a}.

Submetido à Toxicology *In Vitro*, dezembro 2008.

**Hemolytic and Genotoxic Evaluation of Organochalcogens in Human Blood
Cells *in vitro*.**

Santos D.B.^a; Schiar V.P.P.^a; Paixão M.W.^a, Rocha J.B.T.^a; Nogueira C.W.^a, Aschner
M.^b and Barbosa N.B.V.^{*a}.

^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade
Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil,

^bDepartment of Pediatrics, B-3307 Medical Center North, Vanderbilt University
School of Medicine, Nashville, TN 37232-2495, USA

*Correspondence should be sent to:

Nilda Berenice de Vargas Barbosa
Universidade Federal de Santa Maria
Departamento de Química
Avenida Roraima, Prédio 18
CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil
Fone: 55-55 3220 8140
Fax: 55-55 3220 8978
E-mail: nvbarbosa@yahoo.com.br

Abstract

This study was designed to investigate the hemolytic and genotoxic effect of different organoselenium and organotellurium compounds in human blood cells, as simple tests for screening the toxicity of some chalcogenides. For osmotic fragility (OF) test, samples of total blood were incubated with the organochalcogens at 50, 75 and 100 μ M or vehicle (DMSO) for 90 min at 37°C. The EC₅₀ values for hemolysis was significantly increased in erythrocytes exposed to organochalcogens diphenyl selenide (**II**), diphenyl diselenide (**III**), diphenyl telluride (**IV**), diphenyl ditelluride (**V**), (S)-2-amino-1-diselenide-3-methylpropanyl (**IX**), butyl(styryl)telluride (**XIII**) and 2-(butyltellurium)furan (**XIV**) when compared to control compounds. The exposure of erythrocytes to organochalcogens **II** and **XIII**, which had greater hemolytic effect, did not modify catalase activity, reactive oxygen species (ROS) production and -SH content. On the other hand, the Na⁺/K⁺ ATPase activity of erythrocyte ghosts was significantly inhibited by compounds **II** and **XIII** (P<0.05) in a concentration-dependent manner. The inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase activity was completely reversed by dithiotreitol (DTT); indicating the ability of these organochalcogens in reacting with thiol groups of the enzyme. The thiol oxidase of compounds **II** and **XIII** was supported by the fact that the rate of DTT oxidation was increased significantly by both chalcogens. In addition, the compounds **II** and **XIII** were strongly genotoxic and cytotoxic to human leukocytes cells, as verified by the DNA damage and cell viability evaluation. Our results suggest that organochalcogenides tested, at relatively high concentrations, exhibit hemolytic and genotoxic action in human blood cells, which are probably linked to thiol oxidase activity.

Key Words: Selenium, tellurium, erythrocytes, osmotic fragility, Na⁺/K⁺ ATPase, DNA damage

1. Introduction

The chalcogen selenium has been described to possess very interesting biological activities. Se intake at low concentrations is recognized as an essential trace element in the human body (Navarro-Alarcón and Lopes-Martinez, 2000). In the form of selenocysteine, this element is a component of a number of antioxidant enzymes, e.g. glutathione peroxidase isoforms and thioredoxin reductase (Arner et al., 2000; Rotruck et al., 1973). Of particular importance, different classes of organoselenium compounds have been well documented as promising pharmacological agents against a number of diseases due to its antioxidant and glutathione peroxidase-like properties (Borges et al., 2008; Mugesh et al. 2001; Nogueira et al., 2004; Rosa et al., al. 2007). On the other hand, the intake of an excess of selenium may be cytotoxic via its ability to catalyze the oxidation of thiols and to generate free radicals (Barbosa et al., 1998; Nogueira et al., 2004). In this regard, data from our research group have shown that organic forms of selenium can be noxious for proteins and enzymes of several tissues of mammals, such as δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) and Na^+/K^+ ATPase (Borges et al., 2005; 2007a; Kade et al., 2008; Nogueira et al., 2004). In mammals, diphenyl diselenide toxicity is characterized by loss of weight (Favero et al., 2005), neurotoxicity (Borges et al., 2005; Brito et al. 2007, Rosa et al., 2007a) and hematological disorders, such as hypochromic anemia and leucopenia (Borges et al., 2007a), which can be caused by disruption in thiol balance (Maciel et al. 2000). In addition, the genotoxicity of some selenium compounds has been associated with their pro-oxidant properties (Cemeli et al., 2006; Hi and Si, 2007; Letavayová et al., 2006; Rosa et al., 2004, 2007b; Shamberger, 1985).

Tellurium has a similar electronic configuration to selenium and, consequently, it shares some chemical properties with this element. However, tellurium is not an essential micronutrient and, indeed, induces both acute and chronic toxicity in a variety of species (Deuticke et al., 1992; Nogueira et al., 2004; Tiano et al., 2000). Accordingly, organotellurium compounds have been reported as toxic agents for neuronal (Morell et al., 1996; Nogueira et al., 2001), promyelocytic (Sailer et al., 1999, 2004), erythrocytes (Tiano et al., 2000) and thymocytes cells (Iwase et al., 2004). In this context, persuasive evidence has indicated that diphenyl ditelluride, a simple synthetic intermediate in organic synthesis, is teratogenic to rat fetuses (Stangherlin et al., 2005) and induces toxicological effects in brain of rodents (Moretto et al., 2007; Nogueira et al., 2001) as well as in platelets, leukocytes, erythrocytes and promyelocytic cells (Borges et al., 2004, 2007a, 2007b; Nogueira et al., 2001; Sailer et al., 2003). However, little is known about the molecular mechanism involved in tellurium toxicity. Organotellurium, in analogy to organoselenium compounds, can react with thiol groups from biologically important molecules, oxidizing them to disulfides (Goeger et al., 1994) and can also act as a glutathione peroxidase-like mimetic (Anderson et al., 1994; Engman et al., 1992; Nogueira et al., 2004).

Blood cells have been used extensively as a simple model system for investigating mechanisms of cell injury. Really, the integrity of the RBCs determined by measurement of changes in osmotic fragility, enzymatic activity and in antioxidant defenses has been applied to the diagnosis of oxidative damage and hemolytic process caused by different agents (Chiu et al., 1989; Devasena et al., 2001; Jain et al., 1983; Kolanjiappana et al., 2002; Pribush et al., 2003). Similarly, DNA damage

evaluation in leukocytes cells has potential use in determining chemical and biological characteristics of genotoxic agents (Heuser et al., 2008).

Thus, following our interest in determining the boundary between the potential protective and deleterious properties of organochalcogens as preliminary screen to decide which compound could be worth to be further explored in *in vivo* studies, the present study was planned to evaluate the effect of exposure to different classes of organochalcogens in the structural integrity of erythrocytes. Subsequently, we analyzed the genotoxicity of some selected compounds in leukocytes cells using the alkaline comet assay.

2. Materials and Methods

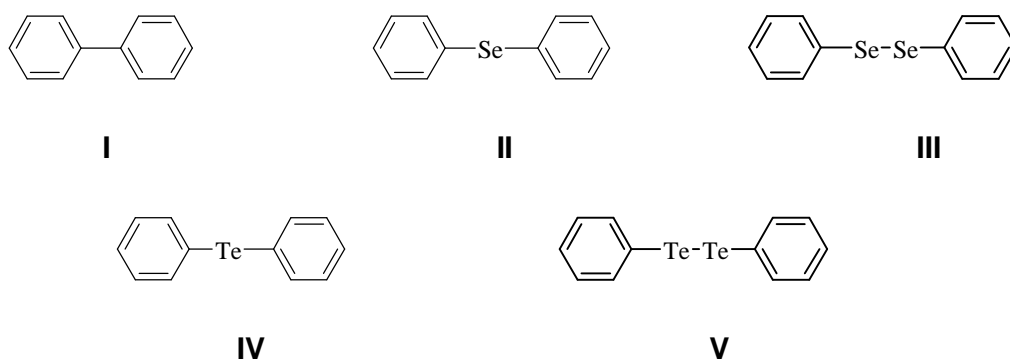
2.1. Chemicals

The structure of organochalcogens tested in this study are shown in Scheme 1: **(II)** diphenyl selenide, **(III)** diphenyl diselenide (Paulmier, 1986), **(IV)** diphenyl telluride, **(V)** diphenyl ditelluride, **(VII)** (S)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-methylbutan-2-ylcarbamate, **(VIII)** (S)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-phenylpropan-2-ylcarbamate, **(IX)** (S)-2-amino-1-diselenide-3-methylpropanyl, **(X)** (S)-2-amino-1-diselenide-3-phenylpropanyl, **(XIII)** butyl(styryl)telluride (Petraghani, 1994), **(XIV)** 2-(butyltellurium)thiophene (Braga et al., 2003), **(XV)** 2-(butyltellurium)furan (Zeni et al., 2001a, 2001b). The organoselenium and organotellurium compounds were prepared according to published procedures. The compounds **(I)** biphenyl, **(VI)** (S)-2-amino-3-methylbutan-1-ol, **(XI)** benzene, **(XII)** thiophene and all other reagents were of pure analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. DMSO, 5.5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and dithiothreitol (DTT) were obtained from

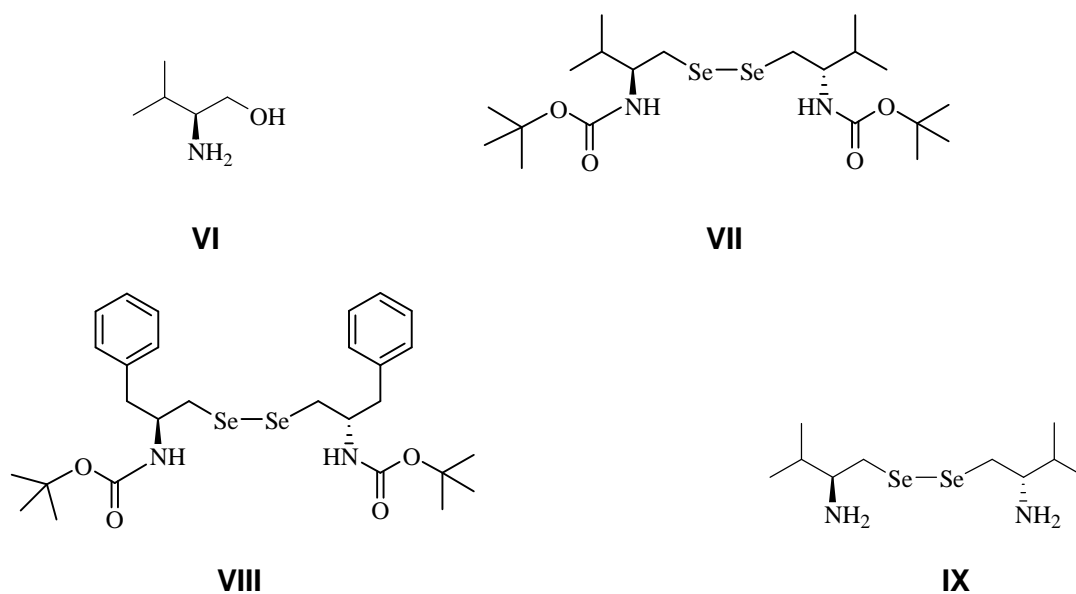
Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical reagent grade and purchased from Merck (Rio de Janeiro, Brazil).

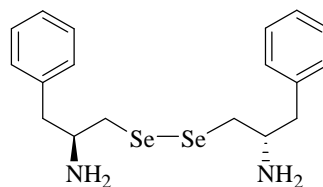
Scheme 1.

Organochalcogen aromatic derivatives

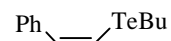
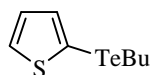
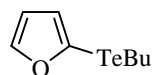


Organochalcogen amino acid derivatives



**X**

Organotellurium heterocycle and aromatic derivatives

**XI****XII****XIII****XIV****XV**

2.2. Sample preparation

Heparinized venous blood was obtained from healthy volunteer donors from the Hospital of Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil (age 30 ± 12). The erythrocytes were separated by centrifugation (2000 rpm for 10 min at room temperature) and the plasma was aspirated. The cell pellet was washed three times with phosphate buffer saline (6.1 mM and pH 7.4, containing 150 mM NaCl). The method for separation of leukocytes consisted of differential erythrocyte sedimentation with dextran and posterior adjust of samples to 2×10^6 leukocytes/mL with HBSS/heparin.

2.3. Exposure of blood to organochalcogens

The samples of total blood, leukocytes and erythrocytes were pre-incubated with organochalcogens or to control compounds at 50, 75 and 100 μM or vehicle (DMSO) for 90 min at 37°C. After pre-incubation, plasma and cells were used for the *in vitro* assays. For Na^+ , K^+ ATPase activity quantification, erythrocyte membranes were further processed as described below.

The protocol of study was reviewed and approved by the appropriate institutional review board from Guidelines of the Committee of UFSM (0089.0.243.000-07).

2.4. Osmotic fragility test

The osmotic fragility (OF) of erythrocytes was measured by the method of Godal and Heisto (1981). Twenty-five μL of heparinized fresh blood was added to 5mL of Tris 2.5mM buffer containing calcium (2.5mM) and magnesium (0.85mM), pH 7.4 and varying concentrations of NaCl (0 to 0.9%). The tubes were kept at 37°C for 90 min with gentle stirring. After incubation, the sample was remixed and centrifuged at 2000 rpm for 8 min. Hemoglobin content in the supernatant was read at 540 nm (A). A value of 100% lysis was assigned to the supernatant of the tube with erythrocytes and distilled water (A_1). The percentage of hemolysis in each assay tube was calculated by the equation:

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{A}{A_1} \times 100 \%$$

The effective concentration (EC) of NaCl solution inducing 50% of hemolysis in the erythrocytes was calculated from the osmotic fragility (OF) curve using a

straight-line equation between the adjacent below and above points to 50% of hemolysis.

For determination of cell viability, DNA damage, -SH content, ROS levels, DTT oxidation, catalase and Na^+/K^+ ATPase activities only those compounds showing higher hemolytic potency were used.

2.5. -SH levels determination

The levels of total (T) -SH from plasma and non-protein -SH (NPSH) from erythrocytes were determined as described by Ellman (1959) as modified by Santos et al., (2008). For NPSH, the erythrocytes pellet (300 μL) was hemolysated with 100 μL of triton 10% for 10 min and the protein fraction was precipitated with 200 μL of 20% trichloroacetic acid (TCA) followed by centrifugation. The colorimetric assay was carried out in phosphate buffer 1M, pH 7.4. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the non-protein thiol groups in the cells samples. The content of -SH was expressed as $\mu\text{mol}/\text{ml}$ plasma and/or $\mu\text{mol}/\text{mL}$ erythrocytes for total -SH and NPSH respectively.

2.6. Catalase activity

Erythrocytic catalase activity was measured by the method of Aebi et al., (1995). Packed erythrocytes were hemolyzed by adding one hundred volumes of distilled water, then, 20 μL of this hemolyzed sample was added to a cuvette and the reaction was started by the addition of 100 μL of freshly prepared H_2O_2 300 mM in phosphate buffer 50 mM, pH 7.0. The rate of H_2O_2 decomposition was measured spectrophotometrically at 240nm during 120s. The activity of catalase was expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mL}$.

2.7. ROS determination

To estimate the level of total blood reactive oxygen species (ROS) production, heparinized samples were diluted (1:10) in phosphate buffer-saline (pH 7.4) and incubated with 1.6 μM of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA). The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was measured for the detection of DFC reactive species (DCF-RS) using the method described in Colpo et al., (2008). The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 20 min after the addition of DCHF-DA to the medium.

2.8. Preparation of erythrocyte ghosts

Erythrocyte ghosts were prepared according to Bjerrum (1979). Hemoglobin content present in ghost membranes was measured at 540 nm as the cyano-met-Hb form, but no hemoglobin was detected.

2.9. Na^+/K^+ ATPase activity of erythrocyte ghosts

Na^+/K^+ ATPase activity of erythrocyte ghosts was measured by determining the organic phosphate (Pi) released according to the method of Fiske and Subbarow (1925). The reaction was initiated by addition of ATP 3mM to a medium containing MgCl 3mM, NaCl 125 mM, KCl 20mM and Tris-HCl 50mM, pH 7.4, sodium azide 10mM, in a final volume of 500 μl . Enzymatic activity was calculated by the difference in absorbance determined in the absence (total Mg^{2+} ATPase) and presence of 0.1mM of ouabain (Rocha et al., 1990). To check a possible involvement of sulfhydryl groups on the inhibitory effect of organochalcogens in Na^+/K^+ ATPase activity, the preventive effect of thiol reducing agent, dithiotreitol (DTT, 3mM), was examined.

2.10. Dithiothreitol (DTT) oxidation.

The thiol oxidase activity of compounds was evaluated by measuring the rate of DTT oxidation. The rate of thiol oxidation by compounds (100 μM) was determined in both presence and absence of erythrocytes cells under the same conditions as used for the Na^+/K^+ ATPase assay. The rate of DTT (1.5mM) oxidation was evaluated by measuring the disappearance of -SH groups. Free -SH groups were determined according to the method of Ellman (1959). Incubation was initiated by adding the tissue samples immediately after DTT addition. At 0, 60, 240 and 360min, aliquots of the reaction mixture (200 μL) were checked for the amount of -SH groups at 412 nm. The concentrations of the -SH groups of DTT in the presence of cell samples were calculated as the difference between the -SH concentration in the tube containing DTT + erythrocytes and the -SH concentration in the tube containing erythrocytes alone.

2.11. Cell viability analysis

The percentages of viable and nonviable leukocytes in samples incubated (90 min) with the organochalcogens (50, 75 and 100 μM) min were determined by Trypan blue following the method of Mischell and Shiingi (1980). Cell viability was calculated as the number of living cells divided by the total number of cells multiplied by 100. The comet assay was performed only when cell viability was >60%, as defined by method of Singh et al. (1988).

2.12. Comet assay

The alkaline comet assay was performed as described by Collins et al. (2004). Peripheral blood leukocytes were incubated for 90 min with different concentrations (50, 75 and 100 μM) of compounds **II** and **XIII**. Then 15 μL leukocytes suspension (2×10^6 leukocytes/mL) were mixed with low-melting point agarose and subsequently added to 90 μL of LMP agarose 0.75 % (w/v), mixed, and placed on a microscope slide pre-coated with normal melting point agarose 1.0 % (w/v). A coverslip was added, and the slides were immediately placed on ice for 5 min. Slides were immersed in a lysis solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris, pH 10.0–10.5) containing 1% Triton X-100 and 10% DMSO at 4°C and protected from the light for approximately 14 h. They were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1mM EDTA, pH > 13.5) for 20 min for DNA unwinding. Electrophoresis (20 min at 300 mA and 25 V) was performed in the same buffer. Every step was carried out under indirect red light. After electrophoresis, the slides were neutralized in Tris 400mM (pH 7.5), rinsed three times in distilled water, and left to dry overnight at room temperature. The dry slides were re-hydrated for 3 min in distilled water and were then fixed for 10 min in trichloroacetic acid 15% (w/v), zinc sulfate 5 % (w/v) and glycerol 5% (v/v), rinsed three times in distilled water, and dried for least 5 h. The dry slides were re-hydrated for 3 min in distilled water, and then stained (sodium carbonate 5% (w/v), ammonium nitrate 0.1% (w/v), silver nitrate 0.1% (w/v), tungstosilicic acid 0.25%, formaldehyde 0.15% (w/v), freshly prepared in the dark), and constantly shaken for 25 min. The slides were submerged in acetic acid (1%), rinsed again, and immediately tagged for analysis.

One hundred randomly selected cells per sample were scored visually according to tail intensity into five classes (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4). Thus, the damage score for each sample can range from 0

(completely undamaged – 100 cells x 0) to 4 (maximum damaged – 100 cells x 4). The damage index is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail and calculated by multiplying the number of cells by it respectively index score and than summed up.

2.13. Protein measurement

The protein content was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard.

2.14. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test when appropriate. Osmotic fragility was examined using repeated measure ANOVA/MANOVA. All values were presented as mean \pm SEM and the differences were considered significant when $p < 0.05$ and $P < 0.01$.

3. Results

3.1. Effect of organochalcogen aromatic derivatives on the OF test in human RBCs

The effect of compounds biphenyl **(I)**, diphenyl selenide **(II)**, diphenyl diselenide **(III)**, diphenyl telluride **(IV)**, diphenyl ditelluride **(V)** on the OF test in erythrocytes is depicted in Table 1. Compound biphenyl **(I)** which was used to check the possible interference of phenyl structure of organochalcogens in the OF test, did not change the osmotic fragility values. However, the EC₅₀ values for hemolysis was significantly increased when the erythrocytes were pre-incubated with compounds **II**

($p < 0.01$), **III** ($p < 0.05$), **IV** ($p < 0.05$) and **V** ($p < 0.01$) (Table 1). The hemolytic effect produced by compounds **II** and **IV** was significant at concentration of $75\mu\text{M}$ and $100\mu\text{M}$; and by compounds **III** and **V** ($p < 0.01$) only at concentration of $100\mu\text{M}$ (Table 1). Statistical analysis revealed that compound **II**, at concentrations of 75 and $100\mu\text{M}$, was the most effective in increasing osmotic fragility when compared to other compounds. The hemolytic potency of compounds showed in Table 1 was in the following order: **II** > **IV** > **V** > **III** > **I** ($p < 0.05$).

3.2. Effect of amino acid derivatives on the OF test in human erythrocytes

Table 2 shows the effect of compounds (S)-2-amino-3-methyl-butan-1-ol (**VI**), (S)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-methylbutan-2-ylcarbamate (**VII**), (S)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (**VIII**), (S)-2-amino-1-diselenide-3-methylpropanyl (**IX**), (S)-2-amino-1-diselenide-3-phenylpropanyl (**X**) on osmotic fragility of human erythrocytes. Compound (S)-2-amino-3-methyl-butan-1-ol (**VI**) which was used as control for these organochalcogens did not cause alteration in OF test. Statistical analysis revealed that only compound **IX** produced a modest but significant increase in hemolysis of human erythrocytes ($p < 0.05$). In contrast, the exposure of erythrocytes to the other organoselenium compounds did not affect the integrity structural of cells (Table 2).

3.3. Effect of heterocycle organotellurium and aromatic derivatives on the OF test in human RBCs

Data on table 3 show that organotellurium compound butyl(styryl)telluride (**XIII**) enhanced significantly the osmotic fragility of human erythrocytes, at all concentrations tested, when compared to control values ($p < 0.05$). Furthermore,

benzene (**XI**) which was used as control for this compound had no significant pro-hemolytic effect. For compound 2-(butyltellurium)thiophene (**XIV**), the hemolytic effect was observed only at the highest concentration tested (Table 3) and thiophene (**XII**) (which was used as control) had not significant hemolytic effect. The hemolytic potential of tellurium compounds at 100 μ M was in the order **XIII**>**XIV** ($p < 0.05$).

3.4. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (II) and butyl(styryl)telluride (XIII) in the markers of oxidative stress in the human erythrocytes

Data in table 4 show that the exposure of erythrocytes to organochalcogens **II** and **XIII** was not associated with significant changes in the oxidative stress parameters. In fact, they did not modify erythrocytic catalase activity and -SH content. Similarly, no alteration was observed on the levels of DFC reactive species in the blood after the exposure to organochalcogens.

3.5. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (II) and butyl(styryl)telluride (XIII) on the Na⁺/K⁺ ATPase activity of erythrocyte ghosts

The exposure of erythrocytes to organochalcogen **II** and **XIII** caused a significant inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase activity of erythrocyte ghosts (Figure 1). The addition of dithiotreitol (3mM), a sulfhydryl reagent commonly used as a thiol group protector, was able to recover completely the enzyme inhibition induced by both organoselenium and organotellurium compounds at all concentrations tested.

3.6. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (II) and butyl(styryl)telluride (XIII) on the rate of DTT oxidation

In order to verify whether the inhibition of Na^+/K^+ ATPase activity of erythrocytes ghosts by organocalchogen **II** and **XIII** could involve the oxidation of cysteinyl groups of enzyme, we investigate the effect of these compounds as pro-oxidants of sulfhydryl groups, using DTT as substrate and determining the rate of oxidation of this dithiol by compounds in both presence and absence of erythrocytes cells. The rate of DTT oxidation was increased significantly by both compounds tested (Figure 2 and Table 5). At 240 and 360 min, the compound **II** caused a increase in the rate of oxidation of DTT about 30% and 34% respectively ($p < 0.05$). The compound **XIII** increased the DTT oxidation by 20%, 30% and 38% at 180, 240 and 360 min respectively ($p < 0.05$). The potency of thiol oxidase activity exhibited by compounds was enhanced in the presence of erythrocytes (Figure 2). The time required for 50% of maximal oxidation by compounds **II** and **XIII** in absence of erythrocytes was 306 and 262 min respectively. In the presence of erythrocytes these times decreased about 38 and 61% respectively (Table 5).

3.7. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (II) and butyl(styryl)telluride (XIII) on Cell viability and Cometa assay

Figure 3 shows that the compounds **II** and **XIII** produced significant cell death as defined by loss of ability to exclude Trypan blue dye. The compound **II** at 50, 75 and 100 μM caused a reduction in cell viability around 20%, 25% and 30% respectively. For compound **XIII** this effect was observed only at concentration of 100 μM (28%).

The potential genotoxic effect of compounds **II** and **XIII** in human leukocytes were investigated using the cometa assay. DNA damage index was calculated from cells in different damage classes, which were classified in the visual score by the

measurement of DNA migration length and on the amount of DNA in the tail, as showed in figure 4A.

Diphenyl selenide (**II**) and butyl(styryl)telluride (**XIII**) were strongly genotoxic to leucocytes cells when compared to control (Figure 4B). This effect was observed by both compounds in all the concentrations tested (50, 75 and 100 μ M). Moreover, the statistical analysis revealed that the extent of DNA strand breakage verified in comet assay was greater in cells exposed to tellurium than selenium compound.

Discussion

The knowledge of the relative toxicity of tellurium and selenium-containing compounds is of fundamental importance, since that the use of chalcogens in organic synthesis, industrial applications, and as possible components of a variety of pharmacological agents has been increasing remarkably in recent decades (Barbosa et al., 2008; Ineu et al., 2008). Really, in the last 3 decades, organochalcogenides have been investigated for their potential antioxidant and protective activity, namely as neuroprotectors, in different *in vivo* and *in vitro* models. However, their toxicity has not yet been thoroughly evaluated. In fact, *in vitro* assay that could be used as a preliminary screen step to decide which compounds are worth to be further examined *in vivo* models are not available. Thus, the current study was carried out to screen the toxicity of a variety of chalcogens using blood cells as simple models of cell injury. Assay were conducted specifically in erythrocytes cells and in whole blood leukocytes; and the ability of organochalcogenides to induce hemolysis and DNA damage were examined by osmotic fragility (OF) test and the alkaline comet assay respectively. Our results demonstrated that the short term exposure of human blood

cells to relatively high concentrations of organochalcogens caused significant alterations in the integrity structural of erythrocytes as well as damage to DNA of leucocytes. In hemolysis assay, the organotellurium compounds diphenyl telluride (**IV**), diphenyl ditelluride (**V**), butyl(styryl)telluride (**XIII**) and 2-(butyltellurium)thiophene (**XIV**) as well as the organoselenium compounds diphenyl selenide (**II**), diphenyl diselenide (**III**) and (S)-2-amino-1-diselenide-3-methylpropanyl (**IX**) produced an decrease on osmotic stability of human erythrocytes *in vitro*. The hemolytic effect induced by these organochalcogens appears to be associated with the presence of Se and/or Te atoms in their moieties, since the organic structure without these elements (**I**) biphenyl, (**VI**) (S)-2-amino-3-methyl-butan-1-ol, (**XI**) benzene, (**XII**) thiophene compounds) did not alter the OF test in human RBCs. Indeed, the compounds diphenyl selenide (**II**) and butyl(styryl)telluride (**XIII**), which had greater hemolytic effect were genotoxic to leukocytes cells. In these cells, the DNA damage was associated with alterations in cell viability.

In line with our study, previous literature reports have demonstrated that diaryl tellurides and organoselenium compounds, at higher concentrations, induce DNA damage and accelerate the hemolysis in trout and human erythrocytes (Schiar et al., 2006; Tiano et al., 2000). On the other hand, at low concentrations (>10 μ M) some organotellurides and organoselenides as ebselen presents antigenotoxic effect without altering the hemolysis rate (Tiano et al., 2000). In line with this, literature data have indicated that diphenyl diselenide prevents the genotoxicity induced by different mutagens in Chinese hamster V79 cells when used in pharmacological doses (Rosa et al., 2007a) and induces mutagenic effect in bacteria and yeast at high doses (Rosa et al., 2004; 2007b). In general, is commonly accepted that both mutagenic and anti-mutagenic effects of some selenium compounds are highly dose-

dependent and certainly related to their dual properties as pro-oxidant and/or antioxidant agents.

Numerous erythrocytes studies have shown that oxidative stress play a relevant role in the life of red blood cells; and that hemolysis process induced by oxidant agents should be associated with cellular events such as an increase in ROS production as well as a reduction in antioxidant defenses levels (Marcin et al., 1997; Siems et al., 2003). However, the chemical and biochemical mechanisms underlying in lytic action of organochalcogens in human erythrocytes are little known. In this context, the results obtained in our study indicate that the hemolysis induced by organochalcogens in human erythrocytes seems to be not directly correlated with an increase in the ROS production or with alterations in the levels of antioxidant defenses, since catalase activity, -SH levels and ROS production were not altered in this cells after exposure to compounds **II** and **XIII**. In contrast to that observed here, Hu and collaborators (1983) have demonstrated a relationship between GSH depletion and in *vitro* hemolysis by other selenium compounds as selenocystine, selenite and selenium dioxide (Hu and Spallhoz, 1983).

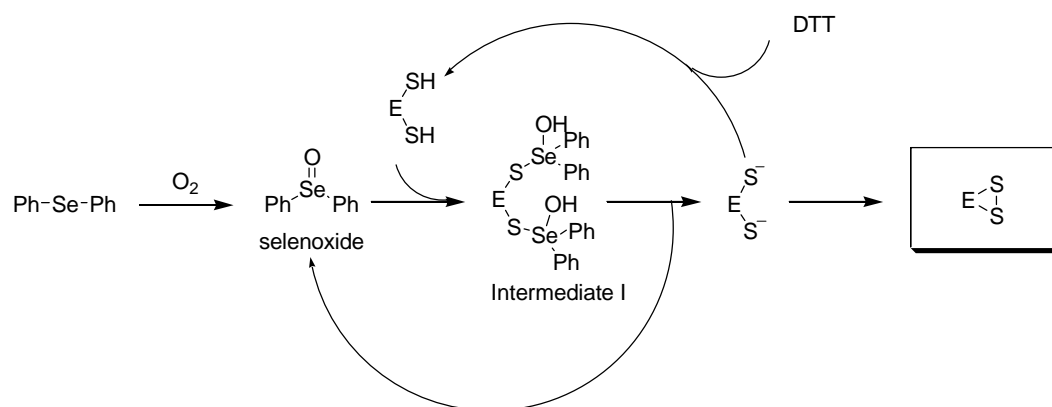
There are conclusive lines of evidence showing that oxidation of sulfhydryl enzymes is one of mechanisms by which organochalcogen compounds induce toxicity in mammals (Barbosa et al., 1998; Nogueira et al., 2004). In fact, sulfhydryl enzymes, such as squalene mono-oxygenase and δ -ALA-D, which are extremely sensitive to the presence of oxidizing agents, are inhibited by organoselenium and organotellurium compounds via binding to -SH groups in the active site of the enzyme (Gupta et al., 2001; Laden et al., 2001; Nogueira et al., 2004; Wagner et al., 1991). Thus, to evaluate whether the organochalcogens diphenyl selenide and butyl(styryl)telluride (**II** and **XIII**), could promote the oxidation of -SH groups in

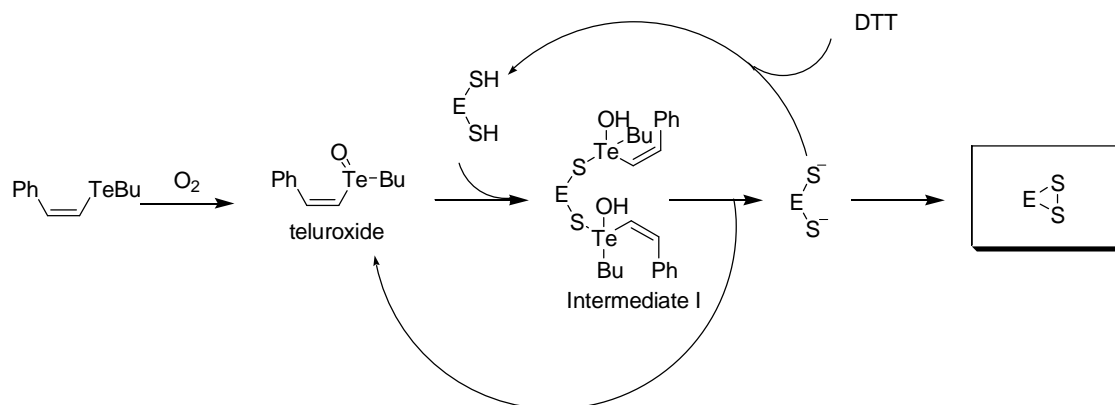
membrane-bound enzyme, we determined the activity of Na^+/K^+ ATPase of erythrocyte ghosts. The Na^+/K^+ ATPase pump is responsible for the control of hydration, volume, nutrient uptake and fluidity of cells (Hu et al., 2000). Na^+/K^+ ATPase subunits are rich in cysteine residues and the oxidation of their groups has been reported to inhibit enzyme activity (Drobota et al., 1999; Huang et al., 1994; Kade et al., 2008; Martin, 2005). Here we have observed that the exposure of erythrocytes to organochalcogens **II** and **XIII** promoted a significant inhibition in Na^+/K^+ ATPase activity of erythrocyte ghosts apparently by interacting with cysteinyl residues that are important for the enzyme activity in reduced form. This hypothesis is supported by the fact that DTT abolished Na^+/K^+ ATPase inhibition induced by organochalcogens **II** and **XIII**. Moreover, compatible with the evidences that the toxicological properties of chalcogenides are associated with their thiol oxidase activity, we demonstrated that these compounds were capable of catalyze the oxidation of -SH groups by increasing the rate of oxidation of DTT in both the absence and presence of erythrocytes. Accordingly, a recent study demonstrated that the inhibition of cerebral Na^+/K^+ ATPase by organochalcogen diphenyl diselenide involves the oxidation of a critical -SH group at the ATP binding site of the enzyme (Kade et al., 2008). Of note, was the fact that of the thiol oxidase activity exhibited by compounds **II** and **XIII** to be significantly improved in the presence of erythrocytes cell. This early observation suggests that some tissue factor present in erythrocytes cell can activate the compounds, enhancing their oxidative effects toward sulfhydryl groups. Accordingly, literature reports have showed that hepatic supernatants from fish as well as rat liver supernatants are able to increase the oxidation of DTT in the presence of the diphenyl diselenide compound (Barbosa et al., 1998; Soares et al., 2005).

It is interesting to note that the exposure of erythrocytes to organochalcogens **II** and **XIII** caused a significant oxidation in sulfhydryl groups of enzyme Na^+/K^+ ATPase, but did not affect the erythrocytic and plasmatic content of total and non-protein -SH. This response, suggest that the compounds exhibited a greater affinity for cysteinyl residues of Na^+/K^+ ATPase than for low-molecular weight thiol-containing molecules (mainly GSH) and other thiol containing proteins. This specific effect may be related to the fact that selenides and tellurides oxidize preferentially vicinal thiol groups (Farina et al. 2002, Maciel et al. 2000, Schiar et al. in press).

In view of this, we propose that in our experimental protocol the cysteinyl residues of membrane bound-enzyme are presumably the primary target for oxidation by organochalcogens in human erythrocytes and that the thiol oxidase exhibited by compounds **II** and **XIII** probably involves the formation of an unstable S–Se or S–Te bond between the -SH groups of enzyme and Se or Te atoms of diphenyl selenide or butyl(styryl)telluride compounds as showed in the scheme below (Scheme 2):

Scheme 2:





In summary, our results suggest that organochalcogenides tested, at relatively high concentrations, exhibits hemolytic and genotoxic action in human blood cells, which are probably linked to their pro-oxidant properties, namely the thiol oxidase activity.

Acknowledgements

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

References

1. Aebi, H., 1984. Catalase "*in vitro*". *Methods in Enzymology* 105, 121-127.
2. Anderson, C.M., Brattsand, R., Hallberg, A., Engman, L., Persson, J., Moldeus, P., Cotgreave, I., 1994. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical system. *Free Radical Research* 206, 401-410.
3. Arner, E.S., Holmgren, P., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267, 6102-6109.
4. Barbosa, N.B., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A.L., 1998. Effect of organic forms of selenium on α -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 149, 243-253.
5. Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Soares, J.C.M., Wondracek, D.C., Gonçalves, J.F., Schetinger, M.R.C., Nogueira, C.W., 2008. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 46, 186-194.
7. Bazzoni, B.G., Bollini, A.N., Hernández, G.N., Contini, M.C., Chiarotto, M.M., Rasia, M.L., 2005. In vivo effect of aluminium upon the physical properties of the erythrocyte membrane. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 822-827.
8. Bjerrum, P.J., 1979. Hemoglobin-depleted human erythrocyte ghosts: characterization of morphology and transport functions. *The Journal of Membrane Biology* 48, 43-67.
9. Borges, V.C., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B., 2004. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. *Neurochemical Research* 29, 1505-1509.
10. Borges, V.C., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2005. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology* 215, 191-197.

11. Borges, V.C., Rocha, J.B., Savegnago, L., Nogueira, C.W., 2007a. Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal published for the British Industrial Biological Research Association* 45, 1453-1458.
11. Borges, V.C., Dadalt, G., Savegnago, L., Moro, A.V., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2007b. 1,1,2-Tris-organoselenide alkene derivatives, but not 1,2-bis-organoselenide alkene derivatives, inhibited delta-aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology in Vitro* 21, 387-391.
12. Borges, V.C., Savegnago, L., Pinton, S., Jesse, C.R., Alves, D., Nogueira, C.W., 2008. Vinylic telluride derivatives as promising pharmacological compounds with low toxicity. *Journal of Applied Toxicology* 28, 839-848.
13. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
14. Braga, AL., Paixão, M.W., Ludtke, D.S., Silveira, C.C., Rodrigues, O. E., 2003. Synthesis of new chiral aliphatic amino diselenides and their application as catalysts for the enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes. *Organic Letters* 5, 2635-2638.
15. Brito, V.B., Folmer, V., Puntel, G.O., Fachinetto, R., Soares, J.C.M, Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2006. Diphenyl diselenide and 2,3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice. *Brain Research Bulletin* 68, 414-418.
16. Cemeli, E., Marcos,R., Anderson,D., 2006. Genotoxic and antigenotoxic properties of selenium compounds in the in vitro micronucleus assay with human

whole blood lymphocytes and TK6 lymphoblastoid cells. *The Scientific World Journal* 6, 1202-10.

17. Chen, C.Y., Lin, TH., 2000. Effects of selenium dioxide on blood and femoral bone marrow of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 59, 553-60.

18. Chiu, D., Kuvners, F., Lubin, B., 1989. Lipid peroxidation in human red cells. *Seminars in Hematology* 26, 251-216.

19. Collins, A.R., 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.

20. Colpo, E., Bem, A.F., Pieniz, S., Schettert, S.D., Santos, R.M., Farias, I.L.G., Bertencello, I., Moreira, C.M., Moretto, M.B., Rocha, J.B.T., 2008. A single high dose of ascorbic acid and iron is not correlated with oxidative stress in healthy volunteers. *Annals of Nutrition and Metabolism* 53, 79-85.

21. Deuticke, B., Lütke-meier, P., Poser, B., 1992. Tellurite-induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 10, 97-107.

22. Devasena, T., Lalitha, S., Padma, K., 2001. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry* 308, 155-161.

23. Dobrota, D., Matejovicova, M., Kurella, E.G., Boldyrev, A.A., 1999. Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cellular and Molecular Neurobiology* 19, 141-149.

24. Ellman, G.L., 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77.

25. Engman, L., Stem, D., Cotgreave, I.A., Anderson, C.M., 1992. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides determined by a ¹H NMR Method. *Journal of the American Chemical Society* 114, 9737-9743.
26. Farina, M., Barbosa, N.B.V., Nogueira, C.W., Folmer, V., Zeni, G., Andrade, L.H., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2002. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinatase from rat liver and cucumber leaves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 623-631.
27. Favero, A.M., Weis, S.N., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reproductive toxicology* 20, 561-568.
28. Fiske, C.F., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorous. *The Journal of Biological Chemistry* 66, 375-40.
29. Godal, H.C., Heisto, H., 1981. High prevalence of increased osmotic fragility of red blood cells among Norwegian blood donors. *Scandinavian Journal of Haematology* 27, 30-34.
30. Goeger, D.E., Ganther, H.E., 1994. Oxidation of dimethylselenide to dimethylselenoxide by microsomes from rat liver and lung by flavin-containing monooxygenase from pig liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 310, 448-451.
31. Gupta, N., Porter, T.D., 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by selenium compounds. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 16, 18–23.
32. Heuser, V.D. Andrade, V.M., Peres, A., Braga, L.M.G.M., Chies, J.A.B., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biology International* 32, 1223-1229.

33. Hu, M.L., Spallholz, J.E., 1983. In vitro hemolysis of rat erythrocytes by selenium compounds. *Biochemical Pharmacology* 32, 957-961.
34. Huang WH, Wang Y, Askari A, Zolotarjova N, Ganjeizadeh M., 1994. Different sensitivities of the Na⁺/K⁺-ATPase isoforms to oxidants. *Biochimica et Biophysica Acta* 23, 108-114.
35. Ineu, R.P., Pereira, M.E., Aschner, M., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2008. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3023-029.
36. Iwase, K., Tatsuishi, T., Nishimura, Y., Yamaguchi, J.Y., Oyama, Y., Miyoshi, N., Wada, M., 2004. Cytometric analysis diphenyl ditelluride of adverse action of on rat thymocytes: Cell shrinkage as a cytotoxic parameter. *Environmental Toxicology* 19, 614-619.
37. Jain, S.K., Mohandas, N., Clark, M.R., Shobel, S.B., 1983. The effect of MDA, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and ⁵¹Cr survival of erythrocytes. *British Journal of Haematology* 53, 247-52.
38. Kade IJ, Paixão MW, Rodrigues OE, Barbosa NB, Braga AL, Avila DS, Nogueira CW, Rocha JB., 2008. Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. *Neurochemical Research* 33, 167-178.
39. Kolanjiappana, K., Manoharana, S., Kayalvizhib, M., 2002. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical* 326, 143-14.
40. Klug, R.K., Kurantsin-Mills, J., 1991. Selective erythrocyte potassium efflux following pulse treatment with tellurite. *Journal of Biochemical Toxicology* 6, 247-51.

41. Kurantsin-Mills, J., Klug, R.K., Lessin, L.S., 1988. Irreversible erythrocytes volume expansion induced by tellurite. *British Journal of Haematology* 70, 369-74.
42. Laden, B.P., Porter, T.D., 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *Journal of Lipid Research* 42, 235-240.
43. Letavayová, L., Vlčková, V., Brozmanová, J., 2006. Selenium: from **cancer** prevention to DNA damage. *Toxicology* 227, 1-14.
44. Maciel, E.N., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 14, 310-319.
45. Marcin, J., Maciej, J., Michael, J., Szczypka, M., Gajewska, J., Laskowska-Kilita, T., 1997. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clinica Chimica Acta* 267, 129-142.
46. Martin, D.W., 2005. Structure-function relationships in the Na⁺,K⁺-pump. *Seminars in Nephrology* 25, 282-291.
47. Mischell, B.B., Shiingi, S.M., 1980. Selected methods in cellular immunology, W. H. Freeman Company, New York, pp. 1 - 469.
48. Morell, P., Toews, A.D., 1996. Schwann cells as targets for neurotoxicants. *Neurotoxicology* 17, 685-695.
49. Moretto, M.B., Rossato, J.I., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Voltage-dependent selenium and diorganochalcogenides inhibition of Ca²⁺ influx

into brain synaptosomes. *Journal of biochemical and molecular toxicology: official journal of the European Histamine Research Society* 17, 154-160.

50. Moretto, M. B., Boff B., Franco, J., Posser, T., Roessler, T.M., Souza, D.O., Nogueira, C.W., Wofchuk, S., Rocha, J.B.T., 2007. Ca^{2+} Influx in Rat Brain: Effect of Diorganylchalcogenides Compounds. *Toxicological Sciences* 99, 566-571.

51. Mugesh, G., Panda, A., Singh, H.B., Puneekar, N.S., Butcher, R.J., 2001. Glutathione Peroxidase-like Antioxidant Activity of Diaryl Diselenides: A Mechanistic Study. *Journal of the American Chemical Society* 123, 839-850.

52. Navarro-Alarcón, M., Lopes-Martinez, M.C., 2000. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *The Science of the Total Environment* 249, 347-371.

53. Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Research* 906, 157-163.

54. Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Evidence for anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflammation Research* 52, 56-63.

55. Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews* 104, 6255-6286.

56. Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed), *Selenium reagents and intermediates in organic synthesis*. first ed. Oxford: Pergamon Press, pp. 25-51.

57. Petragnani, N., 1994. *Tellurium in Organic Synthesis*. London: Academic Press, pp. 9-88.

58. Pribush, A., Hatskelzon, L., Kapelushnik, J., Meyersteina, N., 2003. Osmotic swelling and hole formation in membranes of thalassemic and spherocytic erythrocytes. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 31, 43-47.
59. Rocha, J.B, Mello, C.F., Sarkis, J.J., Dias, R.D., 1990. Undernutrition during the preweaning period changes calcium ATPase and ADPase activities of synaptosomal fractions of weanling rats. *The British Journal of Nutrition* 63, 273-283.
60. Rosa, R.M., Sulzbacher, K., Picada, J.N, Roesler, R., Say, J., Brendel, M., Henriques, J.A.P., 2004. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutation Research* 563, 107-115.
61. Rosa, R.M., Roesler, R., Braga, A.L., Saffi, J., Henriques, J.A.P., 2007a. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40, 1287-1304.
62. Rosa, R.M., Picada, J.N., Saffia, J., Henriques, J.A.P., 2007b. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutation Research* 628, 87-98.
63. Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G., 1973. Selenium- Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590.
64. Sailer, B.L., Prow, T., Dickerson, S., Watson, J., Liles, N., Patel, S.J., Van, Fleet-Stalder V., Chasteen, T.G., 1999. Bacterial cytotoxicity and induction of apoptosis in promyelocytic (line HL-60) cells by novel organotellurium compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2926-2933.
65. Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Chasteen, T.G., 2003. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Archives of Toxicology* 77, 30-36.

66. Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Summers, S., 2004. Chasteen TG. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicology in Vitro* 18, 475-482.
67. Santos, R.M., Bem, A.F., Colpo, E., Bertoncetto, I., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2008. Plasmatic vitaminC in nontreated hepatitis C patients is negatively associated with aspartate aminotransferase. *Liver International* 1478, 54-60.
68. Schiar, V.P., Santos, D.B., Lüdtke, D.S., Vargas, F., Paixão, M.W., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2006. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicology in Vitro* 21, 139-145.
68. Schiar, V.P.P., Santos, D.B., Paixão, M.W., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2009. Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: A possible involvement of reactive oxygen species. *Chemico-Biological Interactions* 177, 28-33.
69. Siems, W.G., Sommerburg, O., Grune, T., 2000. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clinical Nephrology* 53, 09-17.
70. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175 184-191.
71. Shamberger, R.J., 1985. The genotoxicity of selenium. *Mutation Research: Reviews in Genetic Toxicology* 154, 29-48.
72. Soares, F.A., Farina, M., Boettchera, A., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2005. Organic and inorganic forms of selenium inhibited differently fish (*Rhamdia quelen*) and rat (*Rattus norvegicus albinus*) d-aminolevulinate dehydratase. *Environmental Research* 98 46-54.

73. Stangherlin, E.C., Fávero, A.M., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 207, 231-239.
74. Tiano, L., Fedeli, D., Santroni, A.M., Villarini, M., Engman, L., Falcioni, G., 2000. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Mutation Research* 464, 269-277.
75. Tinggi, U., 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters* 137, 103-110.
76. Wagner-Recio, M., Toews, A.D., Morell, P., 1991. Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: Preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. *Journal of Neurochemistry* 57, 1891-1901.
77. Wo, W.H., Yang, F.Y., 1986. Study on the interaction of Se and erythrocyte membrane-protective effect of Se on the erythrocyte membranes. *Scientia Sinica* 29, 1177-1185.
78. Yang, F.Y., Wo, W.H., 1986. Study on the interaction of Se and erythrocyte membrane-effect of Se on the Na, K-ATPase activity and fluidity of erythrocyte membranes. *Scientia Sinica* 29, 1077-1083.
79. Yang, F.Y., Wo, W.H., 1987. Role of Se in stabilization of human erythrocyte membrane skeleton. *Biochemistry International* 15, 475-482.
80. Yang, F.Y., Yang, M.Z., 1989. Reaction of Se with SH groups in spectrin is involved in the stabilization of erythrocyte membrane skeleton. *Biochemistry International* 18, 1085-91.
81. Yi, H., Si, L., 2007. *Vicia* root-mirconucleus and sister chromatid exchange assays on the genotoxicity of selenium compounds. *Mutation Research* 630, 92–96.

82. Zeni, G., Nogueira, C.W., Panatieri, R.B., Silva, D.O., Menezes, P.H., Braga, A.L., Silveira, C.C., Stefani, H.A., Rocha, J.B.T., 2001a. Synthesis and anti-inflammatory activity of acetylenic thiophenes. *Tetrahedron Letters* 42, 7921-7923.

83. Zeni, G., Ludtke, D.S., Nogueira, C.W., Panatieri, R.B., Braga, A.L., Silveira, C.C., Stefani, H.A., Rocha, J.B.T., 2001b. New acetylenic furan derivatives: synthesis and anti-inflammatory activity. *Tetrahedron Letters* 42, 8927-8930.

Tables

Table 1. Hemolytic potency of biphenyl (I), diphenyl selenide (II), diphenyl diselenide (III), diphenyl telluride (IV), diphenyl ditelluride (V) in the OF test in human erythrocytes

Compounds	<i>EC</i> _{50%}			
	0	50 μ M	75 μ M	100 μ M
I	0.480 \pm 0.008	0.497 \pm 0.018	0.484 \pm 0.024	0.495 \pm 0.025
II	0.480 \pm 0.004	0.507 \pm 0.006	0.555 \pm 0.011 ^{a,b}	0.657 \pm 0.021 ^{a,c,*}
III	0.465 \pm 0.003	0.473 \pm 0.014	0.491 \pm 0.012	0.501 \pm 0.006 ^a
IV	0.475 \pm 0.005	0.498 \pm 0.006	0.508 \pm 0.006 ^a	0.527 \pm 0.004 ^a
V	0.476 \pm 0.004	0.487 \pm 0.004	0.501 \pm 0.005	0.512 \pm 0.006 ^a

Results are expressed as mean \pm SEM for four independent experiments. ^aSignificant difference compared to the control values (0). ^{b,c}Significant difference among concentrations of the same compounds. ^{*}Significant difference among the same concentrations of the differ compounds.

EC 50% Concentração de NaCl, onde ocorreu 50% de hemólise. ^aDiferente do controle (0 / DMSO), $p < 0,05$ (Média \pm EP, $n=3$). ^{b,c}Diferença significativa entre as concentrações testadas do mesmo composto (mesma linha).

Table 2. Hemolytic potency of (S)-2-amino-3-methyl-butan-1-ol (**VI**), (S)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-methylbutan-2-ylcarbamate (**VII**), (S)-*tert*-butyl 1-diselenide-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (**VIII**), (S)-2-amino-1-diselenide-3-methylpropanyl (**IX**), (S)-2-amino-1-diselenide-3-phenylpropanyl (**X**) on OF test in human erythrocytes.

Compounds	<i>EC</i> _{50%}			
	0	50 μ M	75 μ M	100 μ M
VI	0.473 \pm 0.008	0.476 \pm 0.006	0.473 \pm 0.004	0.491 \pm 0.010
VII	0.473 \pm 0.007	0.479 \pm 0.006	0.479 \pm 0.009	0.482 \pm 0.006
VIII	0.499 \pm 0.010	0.511 \pm 0.022	0.511 \pm 0.027	0.513 \pm 0.024
IX	0.469 \pm 0.002	0.476 \pm 0.003	0.477 \pm 0.001	0.494 \pm 0.003 ^a
X	0.498 \pm 0.011	0.511 \pm 0.002	0.510 \pm 0.008	0.508 \pm 0.010

Results are expressed as mean \pm SEM for four independent experiments. ^aSignificant difference among concentrations of the same compounds compared to the control values.

EC 50% Concentração de NaCl, onde ocorreu 50% de hemólise. ^aDiferente do controle (0 / DMSO), $p < 0,05$ (Média \pm EP, $n=3$). ^{b,c}Diferença significativa entre as concentrações testadas do mesmo composto (mesma linha).

Table 3. Hemolytic effect of benzene (XI), thiophene (XII), butyl(styryl)telluride, 2-(butyltellurium)thiophene (XIV) and 2-(butyltellurium)furan (XV) on OF test in human erythrocytes

Compounds	<i>EC</i> _{50%}			
	0	50 μ M	75 μ M	100 μ M
XI	0.480 \pm 0.001	0.491 \pm 0,020	0.492 \pm 0,023	0.501 \pm 0.020
XII	0.474 \pm 0.005	0.477 \pm 0,014	0.476 \pm 0,014	0.470 \pm 0.008
XIII	0.480 \pm 0.002	0.530 \pm 0,010 ^a	0.520 \pm 0,002 ^a	0.541 \pm 0.010 ^a
XIV	0.482 \pm 0.001	0.487 \pm 0,005	0.488 \pm 0,004	0.524 \pm 0.006 ^{a,b}
XV	0.482 \pm 0.001	0.483 \pm 0,001	0.490 \pm 0,002	0.492 \pm 0.0014

Results are expressed as mean \pm SEM for four independent experiments.

^aSignificant difference among concentrations of the same compounds compared to the control values (0). ^bSignificant difference among concentrations of the same compounds.

EC 50% Concentração de NaCl, onde ocorreu 50% de hemólise. ^aDiferente do controle (0 / DMSO), $p < 0,05$ (Média \pm EP, $n=3$). ^{b,c}Diferença significativa entre as concentrações testadas do mesmo composto (mesma linha).

Table 4. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (**II**) and butyl(styryl)telluride (**XIII**) on -SH content, catalase activity and ROS levels

Groups	Catalase activity^a	Total -SH levels^b	NPSH^c	ROS levels[*]
Control	28.7±0.41	507±10.0	1633±38.3	25.03±0.25
Se₅₀ μM	28.5±4.19	534±27.0	1757±85.5	26.10±0.48
Se₇₅ μM	31.5±2.88	539±27.2	1711±233	24.61±0.49
Se₁₀₀ μM	32.3±3.56	546±26.5	1551±268	24.04±0.22
Te₅₀ μM	26.0±1.35	575±44.4	1724±235	23.09±0.59
Te₇₅ μM	29.2±4.75	552±40.6	1662±192	24.60±0.32
Te₁₀₀ μM	30.5±4.02	515±67.9	1611±278	23.65±0.12

Data are expressed as means±SEM of four experiments. ^aCatalase activity is expressed as μmol H₂O₂/ml erythrocytes/min. ^{bc}Data of total and non-protein (NPSH), -SH levels are presented as μmol/ml plasma and μmol/ml/erythrocytes respectively. ^{*} Data of reactive species (ROS) levels are presented as arbitrary fluorescence units (AFU).

Table 5. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (**II**) and butyl(styryl)telluride (**XIII**) on the rate of DTT oxidation

OxiT ₅₀ (mean ± S.E.M.)		
Compounds	DTT	DTT + erythrocytes
control	> 360	332.69 ± 3.40
II	306.37 ± 26.29 ^a	119.62 ± 12.49 ^{a,b}
XIII	262.38 ± 14.19 ^a	161.92 ± 10.29 ^{a,b}

Oxidation is expressed as the time required for 50% of maximal oxidation (OxiT₅₀ in min) to compounds **II** and **XIII** in the presence and absence of erythrocytes (100μM). Data are reported as mean±SEM of four experiments. ^aDenoted significant difference from control. ^bDenoted significant difference on DTT oxidation in the presence and absence of erythrocytes cell.

Legend

Figure 1. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (**II**) and butyl(styryl)telluride (**XIII**) on Na^+/K^+ ATPase activity of erythrocytes ghosts. The organochalcogens were pre-incubated with whole blood at 37°C for 10 min. After, ATP and/or DTT (3mM) were added to the medium and incubated for 90 min. The reaction was stopped with 250 μl of TCA 10% (TCA+ HgCl 10mM). Results are expressed as mean \pm SEM for four independent experiments. Data of Na^+/K^+ ATPase activity are presented as nmol/Pi (mg/protein/min). *Denoted $p < 0.05$ compared to the control (ANOVA/Duncan). ^aDenoted $p < 0.05$ compared to the tubes with DTT (ANOVA/Duncan).

Figure 2. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (**II**) and butyl(styryl)telluride (**XIII**) on the DTT oxidation. The rate of DTT oxidation was determined in the absence (**2A**) and presence of erythrocytes cells (**2B**) at different times (60, 180, 240 and 380 min). Data are means of five independent experiments. *Denoted $p < 0.05$ compared to controls (ANOVA/Duncan).

Figure 3. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (**II**) and butyl(styryl)telluride (**XIII**) on Cell viability. Cell viability was determined after 90 min of incubation and calculated as the number of living cells divided by the total number of cells multiplied by 100. *Denoted $p > 0.05$ compared to control (DMSO) values in the same time of incubation (ANOVA/Duncan).

Figure 4A. Classifications of DNA damage in human leukocytes. DNA damage index was classified in the visual score by the measurement of DNA migration length and on the amount of DNA in the tail.

Figure 4B. Effect of organochalcogens diphenyl selenide (**II**) and butyl(styryl)telluride (**XIII**) in cometa assay. Peripheral blood leukocytes were incubated for 90 min with the control (DMSO) and **II** and **XIII** compounds at concentrations of 50, 75 and 100 μM .

The damage score for each sample can range from 0 (completely undamaged – 100 cells x 0) to 4 (maximum damaged – 100 cells x 4). Results are expressed as mean \pm SEM for four independent experiments. ^aDenoted $p < 0.05$ compared to control compound (ANOVA/Duncan). [#]Significant difference among the same concentrations of the differ compounds ($p < 0.05$; ANOVA/Duncan).

Figure 1

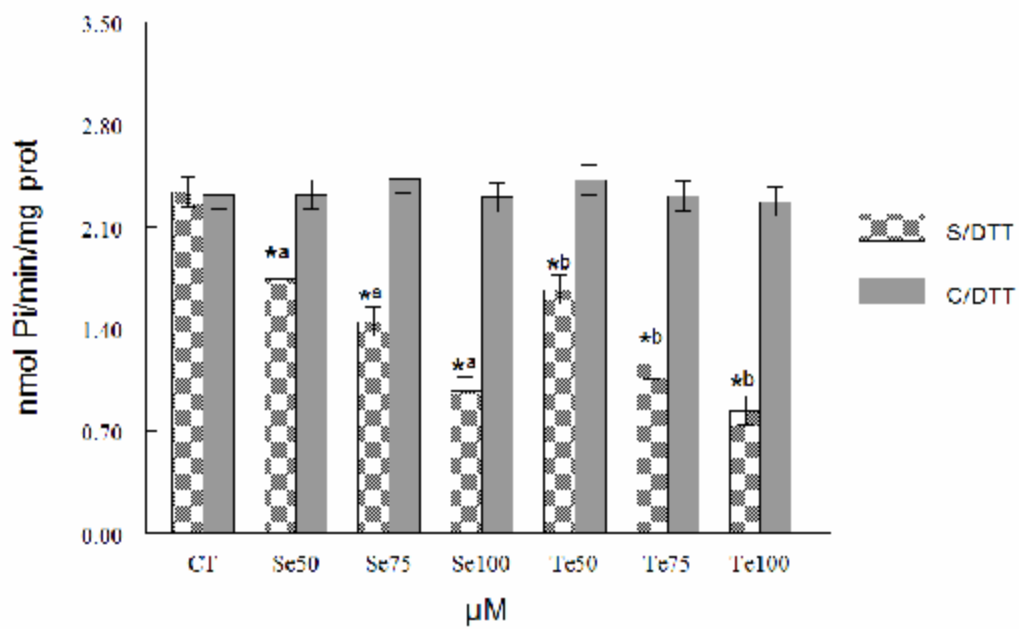


Figure 2.

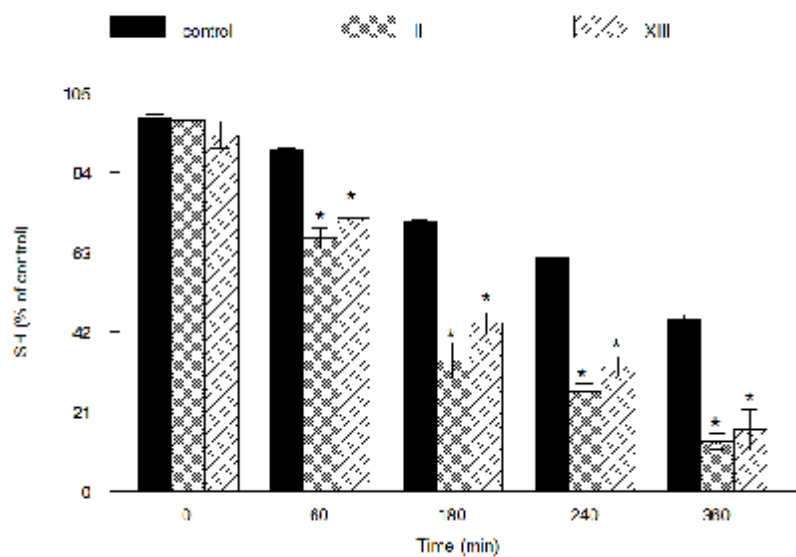
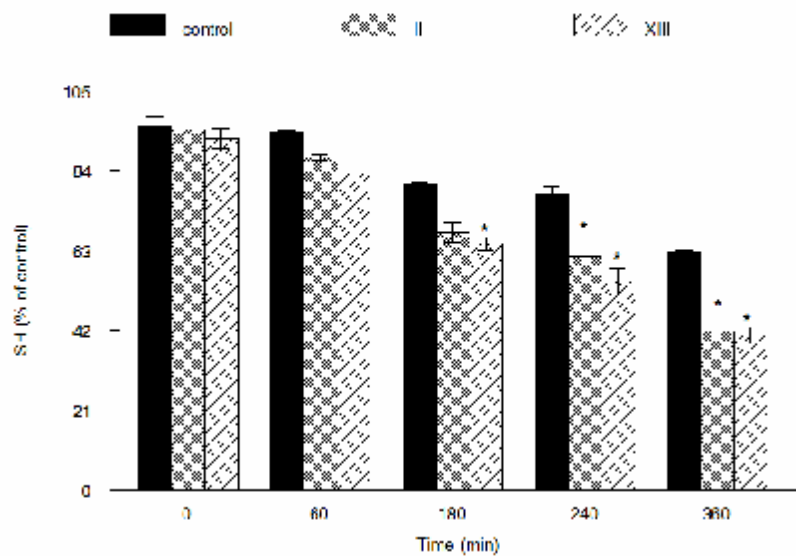


Figure 3.

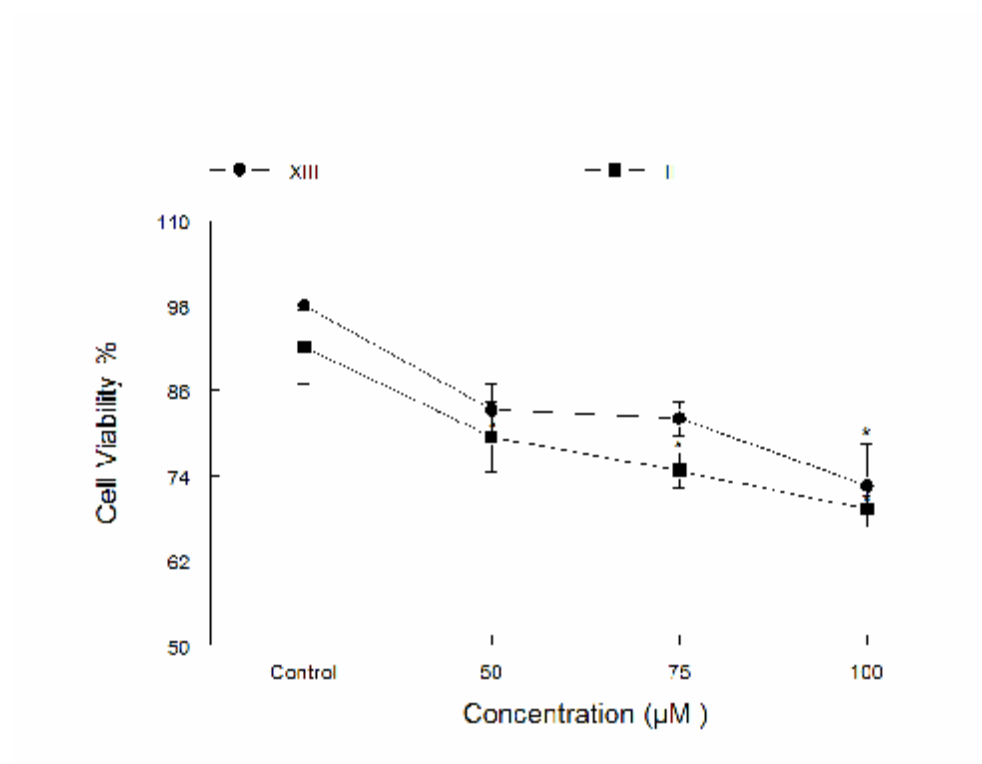


Figure 4A

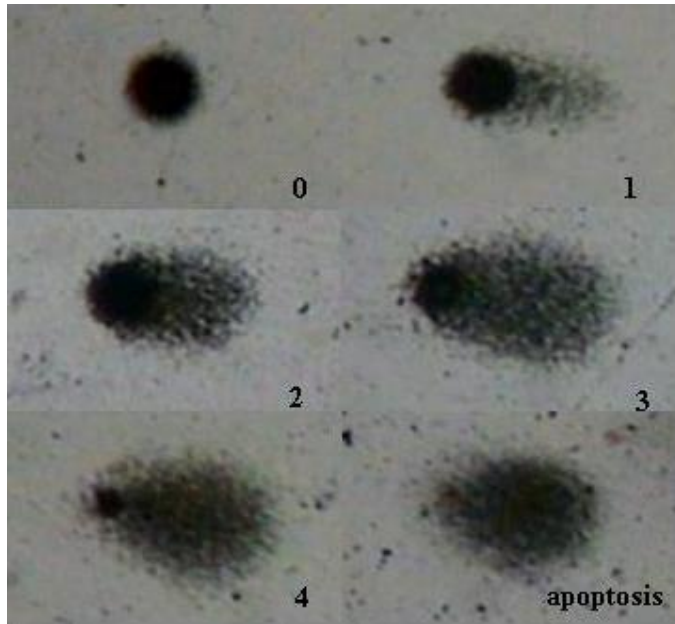
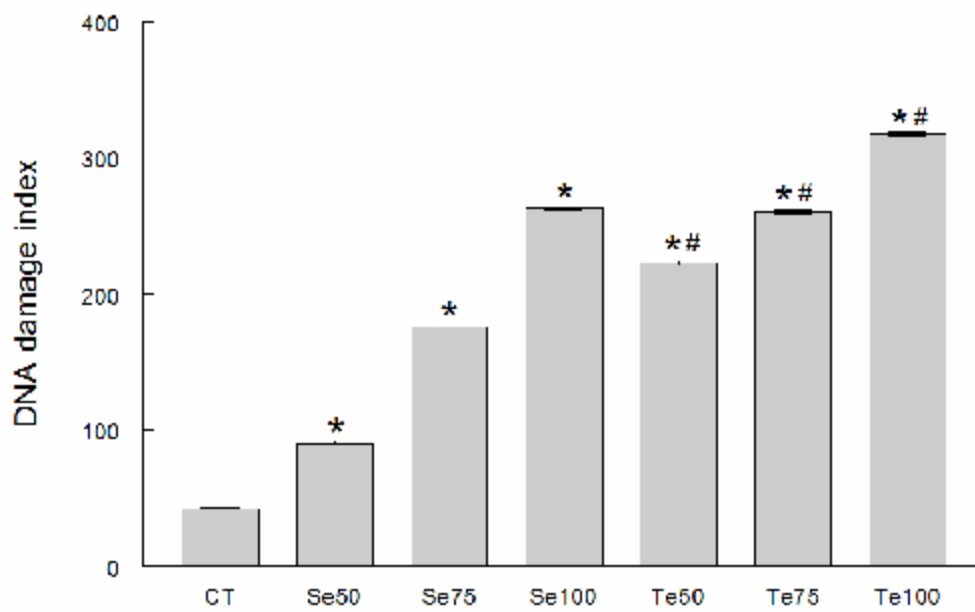


Figure 4B



5 DISCUSSÃO

O conhecimento da toxicidade de compostos contendo Se e Te, é de fundamental importância, uma vez que a utilização desses calcogênios vem aumentando notavelmente em processos de síntese orgânica, de aplicações industriais, e no uso como agentes farmacológicos (BARBOSA e cols., 2008; INEU e cols., 2008). Nas últimas 3 décadas, têm-se estudado principalmente o potencial antioxidante e as atividades farmacológicas dos organocalcogênios em diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, os efeitos tóxicos causados por esta classe de compostos são bem menos investigados e ensaios *in vitro* que possam contribuir como um “screening” para a escolha de organocalcogênios que possam ser testados farmacologicamente em modelos *in vivo* são poucos descritos na literatura.

Neste contexto, o presente estudo foi realizado para avaliar a toxicidade de uma variedade de compostos orgânicos de Se e de Te utilizando células sanguíneas como um modelo simples de dano celular. Os ensaios foram realizados especificamente com eritrócitos e leucócitos totais, com o objetivo de analisar a capacidade de vários organocalcogênios de Se e Te em induzir hemólise e dano no DNA. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a exposição de células sanguíneas humanas, a concentrações relativamente elevadas dos organocalcogênios causaram significativas alterações na integridade estrutural dos eritrócitos, bem como danos ao DNA dos leucócitos. No ensaio de hemólise, os compostos orgânicos de Te, telureto de difenila (IV), ditelureto de difenila (V), butil (estiril) telureto (XIII) e 2 - (butiltelúrio) tiofeno (XIV), bem como compostos orgânicos de Se, seleneto de difenila (II), disseleneto de difenila (III) e (S)-2-amino-1-diseleneto-3-metilpropanil (IX) promoveram uma diminuição na estabilidade osmótica de eritrócitos humanos *in vitro*.

O efeito hemolítico induzido por esses compostos parece estar associado à presença de átomos de Se e/ou Te em suas estruturas, uma vez que as formas orgânicas testadas sem esses elementos, (I) bifenila, (VI) (S)-2-amino-3 -metilbutano-1-butanol, (XI) benzeno e (XII) tiofeno, não alteraram o teste de fragilidade osmótica nos eritrócitos humanos. Dentre os compostos testados, o seleneto de difenila (II) e butil (estiril) telureto (XIII), foram os que exibiram maiores efeitos hemolíticos e portanto testados nos demais ensaios. Os compostos II e XIII

compostos foram genotóxico para leucócitos humanos e o dano no DNA causado pela exposição a ambos os compostos foi associado com alterações na viabilidade celular. De acordo com nosso estudo, dados na literatura tem demonstrado que diaril teluretos e compostos orgânicos de Se, em concentrações mais elevadas, induzem e aceleram o dano no DNA e a hemólise em eritrócitos humanos e de peixes (SCHIAR e cols., 2007; TIANO e cols., 2000). Por outro lado, em baixas concentrações (> 10 µM) alguns organotelúrios e organossênios como ebselen apresentam efeito antígenotóxico e não alteram a taxa de hemólise (TIANO e cols., 2000). Da mesma forma, tem sido relatado que o composto (PhSe)₂ impede a genotoxicidade induzida por diferentes agentes mutagênicos em células de hamster chinês V79, quando utilizado em doses farmacológicas (ROSA e cols., 2007a), mas também induz efeitos mutagênicos em bactérias e leveduras quando usado em altas concentrações (ROSA e cols., 2004, 2007b). Em geral, é comumente aceito que ambos efeitos mutagênicos e anti-mutagênicos de alguns compostos de Se sejam altamente dependentes da dose e, esteja sem dúvida, relacionado com as suas propriedades de agir como pró-oxidante e/ou antioxidantes.

A hemólise provocada por agentes oxidantes pode estar associada a eventos celulares, tais como um aumento na produção EROs, bem como uma redução nos níveis defesas antioxidantes (MARCIN e cols., 1997; SIEMS e cols., 2000). No entanto, os mecanismos químicos e bioquímicos subjacentes na ação lítica de organocalcogênios em eritrócitos humanos são pouco conhecidos. Neste contexto, os resultados obtidos em nosso estudo indicam que a hemólise induzida pelos organocalcogênios em eritrócitos humanos não parece estar diretamente relacionada com um aumento na produção EROs ou com modificações nos níveis das defesas antioxidantes, uma vez que atividade da enzima catalase, e os níveis de -SH e EROs não foram alterados após a exposição aos compostos **II** e **XIII**.

Contrariamente ao observado nesse trabalho, Hu e Spallholz (1983) demonstraram uma relação entre a depleção de GSH e a hemólise induzida por outros compostos como de Se como a selenocistina, o Na₂SeO₃ e o SeO₂.

Existem evidências conclusivas de que a oxidação de grupos sulfidrílicos de enzimas é um dos mecanismos pelos quais os compostos organocalcogênios induzem toxicidade em mamíferos (BARBOSA e cols., 1998; NOGUEIRA e cols., 2004).

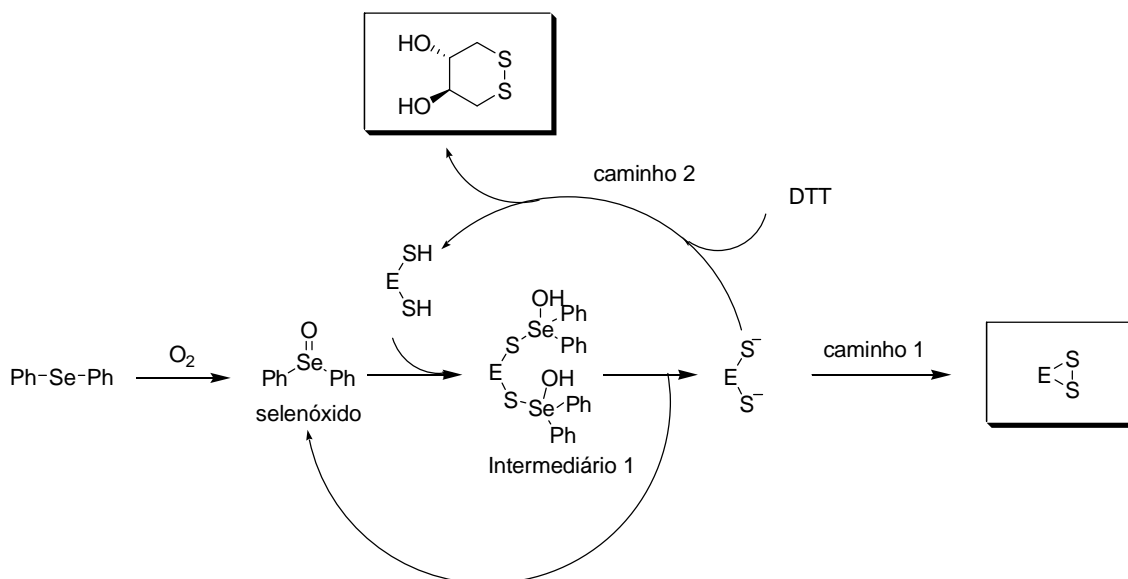
A bomba Na^+/K^+ ATPase de membrana é responsável pelo controle da hidratação, volume e fluidez das células e pode ter sua atividade inibida pela oxidação dos resíduos de cisteína presentes em suas subunidades (DROBOTA e cols., 1999; HUANG e cols., 1994; KADE e cols., 2008; MARTIN, 2005). Assim, para avaliar se a hemólise induzida pelos organocalcogênios seleneto de difenila e butil (estiril) telureto (**II** e **XIII**), poderia estar relacionada com a inibição da enzima sulfidrílica de membrana Na^+/K^+ ATPase via oxidação de grupos -SH, determinou-se a atividade da Na^+/K^+ ATPase de eritrócitos (ghost). Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que os organocalcogênios **II** e **XIII** causaram uma significativa inibição na atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase de eritrócitos aparentemente por oxidarem seus resíduos cisteinil. Estas observações foram reforçadas pelo fato de que a adição do ditiol DTT reverteu aos níveis do controle a atividade da enzima inibida pelos organocalcogênios **II** e **XIII**.

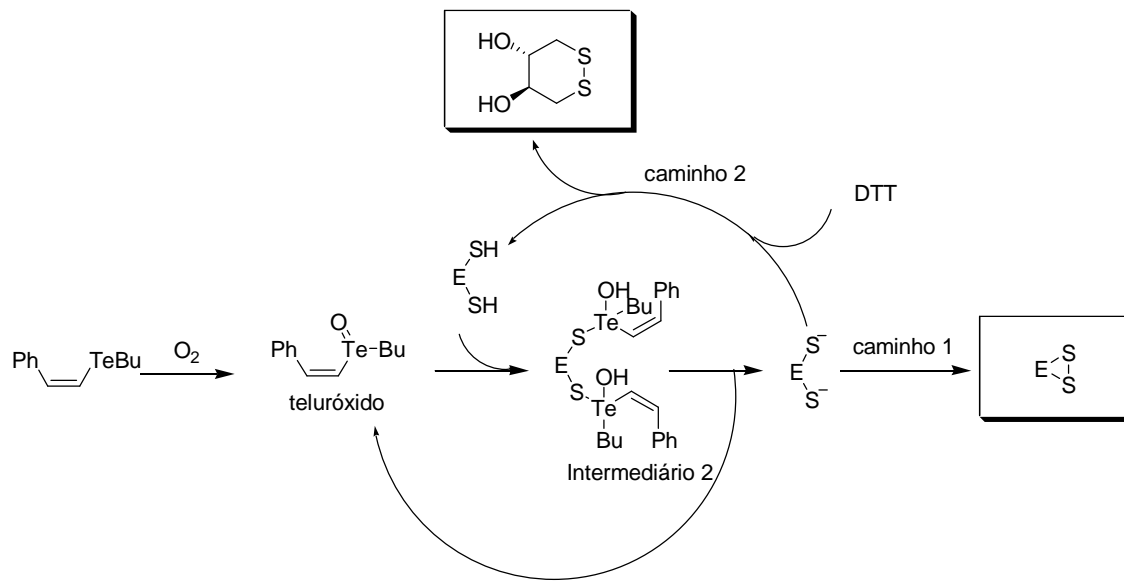
Além disso, nossos dados revelaram que estes compostos exibem atividade tiol oxidase, uma vez que promoveram um aumento na taxa de oxidação do DTT, tanto na ausência como na presença de eritrócitos. De acordo com esses resultados, um recente estudo demonstrou que a inibição da enzima Na^+/K^+ ATPase cerebral pelo $(\text{PhSe})_2$ envolve a oxidação de grupos -SH no sítio ativo da enzima; os quais são essenciais para a ligação da molécula de ATP (KADE e cols., 2008). Além disso, a atividade tiol oxidase exibida pelos compostos **II** e **XIII** foi aumentada de forma significativamente na presença de eritrócitos. Esta constatação sugere que algum fator tecidual possa ativar e/ou potencializar a ação dos compostos, aumentando seus efeitos oxidativos. De forma similar, dados na literatura evidenciaram que a oxidação do DTT causada pelo composto $(\text{PhSe})_2$ é potencializada na presença de homogeneizados hepáticos de peixes e de ratos (BARBOSA e cols., 1998, SOARES e cols., 2005).

É interessante notar que embora a exposição dos eritrócitos aos organocalcogênios **II** e **XIII** tenha causado a oxidação dos grupos sulfidrílicos da enzima Na^+/K^+ ATPase, não houve alteração no conteúdo eritrocitário e plasmático de SHT e SHNP. Esta resposta sugere que os compostos apresentaram uma maior afinidade pelos resíduos cisteinil da Na^+/K^+ ATPase do que por moléculas tiólicas de baixo peso molecular (principalmente GSH) e outras proteínas contendo tióis. Este efeito específico pode estar relacionado, em parte, ao fato de que selenetos e

teluretos oxidam preferencialmente grupos tióis vicinais de biomoléculas como enzimas (FARINA e cols. 2002, MACIEL e cols., 2000, SCHIAR e cols., 2009).

Diante dos dados obtidos, nós propomos que em nosso protocolo experimental os resíduos -SH da enzima ligada a membrana dos eritrócitos sejam o alvo primário para a oxidação induzida pelos organocalcogênicos; e que a atividade tiol oxidase exibida pelos compostos **II** e **XIII** provavelmente envolva a formação de uma ligação instável S-Se ou S-Te entre os grupos -SH da enzima e os átomos de Se ou Te dos compostos seleneto de difenila ou butil (estiril) telureto (**II** e **XIII**) (Esquema 2):





Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os organocalcogênios testados, quando usados em concentrações relativamente elevadas, podem ser considerados agentes hemolíticos e genotóxicos para células sanguíneas humanas devido suas propriedades tiol oxidase.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos inferir que:

- Ø Os organocalcogênios de Te: telureto de difenila, ditelureto de difenila, butil (estiril) telureto, 2-(butiltelúrio) furano e os de Se: seleneto de difenila e disseleneto de difenila foram capazes de diminuir a estabilidade osmótica de eritrócitos humanos *in vitro*;
- Ø O aumento na FO está possivelmente associado com a presença dos elementos Se e Te na estrutura dos compostos orgânicos de Se e de Te;
- Ø Os compostos, que apresentaram maior efeito hemolítico, não alteraram os parâmetros de estresse oxidativo avaliados pelos níveis de EROs e defesas antioxidantes nos eritrócitos;
- Ø Os compostos seleneto de difenila (II) e butil (estiril) telureto (XIII), os quais exibiram maior potencial hemolítico, inibiram a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase por apresentarem atividade tiol-oxidase e promoverem a oxidação de resíduos -SH da enzima;
- Ø Os compostos seleneto de difenila (II) e butil (estiril) telureto (XIII) induziram efeitos citotóxicos em leucócitos humanos por alteraram a viabilidade celular destas células;
- Ø Os danos causados no DNA de leucócitos humanos expostos aos organocalcogênios seleneto de difenila (II) e butil (estiril) telureto (XIII) sugere que estes compostos, quando em concentrações relativamente elevadas, sejam genotóxicos aos seres humanos;

7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados nesta dissertação, faz-se ainda necessário investigar:

1. Para ensaios *in vitro*:

- Ø avaliar o potencial de oxidação dos compostos na presença e ausência de oxigênio;
- Ø medir o consumo de oxigênio dos diferentes compostos na presença e ausência de tióis;
- Ø investigar se os possíveis efeitos genotóxicos dos compostos de Se e Te envolvem a atividade de enzimas de reparo de DNA como: formamido pirimidina DNA glicosilase (FPG) e endonuclease III;

2. Para ensaios *in vivo*:

- Ø através do teste do cometa, avaliar o efeito do tratamento com compostos orgânicos de Se e Te sobre o DNA de camundongos;
- Ø investigar o possível mecanismo genotóxico dos compostos de Se e Te com a utilização de enzimas de reparo de DNA em leucócitos e outros tecidos de camundongos em tratamento *ex vivo*;
- Ø avaliar a viabilidade de leucócitos de camundongos expostos aos diferentes compostos orgânicos de Se e de Te;
- Ø analisar a expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase através de PCR em animais expostos a organocalcogênios de Se e Te.

8 DE MAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E MESTRADO

- Ø Viviane Patrícia P. Schiar, Danúbia Bonfanti dos Santos, Diogo S. Lüdtkke, Fabrício Vargas, Márcio W. Paixão, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni, João Batista T. Rocha. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in vitro**, 2006; 21: 139-145.

- Ø Viviane Patrícia P. Schiar, Danúbia Bonfanti dos Santos, Márcio W. Paixão, Cristina W. Nogueira, João Batista T. Rocha, Gilson Zeni. Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: A possible involvement of reactive oxygen species. **Chemico-Biological Interactions**, 2008; 177: 28-33.

- Ø Danúbia Bonfanti dos Santos, Viviane Patrícia P. Schiar, Marinei Cristina P. Ribeiro, Ricardo S. Schwab, Daiane F. Meinerz, Josiane Allebrandt, Michael Aschner, Cristina W. Nogueira, João Batista T. Rocha, Nilda B. De Vargas Barbosa. Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes *in vitro*. **Mutation Research**, Submetido, 2008.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNEW, W.F.; CURRY, E. (1972). Period of teratogenic vulnerability of rat embryo to induction of hydrocephalus by tellurium. *Experientia*, 28: 1444-1445.

ALEXI, T.; HUGHES, P.E.; FAULL, R.L.M.; WILLIAMS, C.E. (1998). 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration. *Neuro Report*, 9: R57-R64.

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

ANDERSSON, C.M.; BRATTSAND,R.; HALLBERG, A. (1994). Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Rad Res*, 20:401-410.

BARBOSA, N.B.V.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M.C.; BRAGA, A.L. (1998). Effect of Organic Forms of Selenium on d-Aminolevulinatase Dehydratase from Liver, Kidney, and Brain of Adult Rats. *Toxicol Appl Pharm*, 149:243-253.

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

BEAL, M.F.; HYMAN, B.T.; KOROSHETZ, W. (1993). Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.*, 16: 125–131.

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

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

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

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

BORGES, V.C., ROCHA, J.B., SAVEGNAGO, L., NOGUEIRA, C.W., 2007. Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats. *Food*

and Chemical Toxicology: an International Journal published for the British Industrial Biological Research Association 45, 1453-1458.

BRANDÃO, R.; LARA, F.S.; PAGLIOSA, L.B.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W.; FARINA, M. (2005). Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. *Drug Chem Toxicol*, 28:397-407.

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

CADENAS, E.; SIES, H. (1985). Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enz Regul*, 23: 217-237.

CEMELI, E.; MARCOS, R.; ANDERSON, D. (2006). Genotoxic and antigenotoxic properties of selenium compounds in the in vitro micronucleus assay with human whole blood lymphocytes and TK6 lymphoblastoid cells. *ScientificWorld Journal*, 6:1202-10.

CENTURIÃO, F.B.; CORTE, C.L.; PAIXÃO, M.W.; BRAGA, A.L.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T. (2005). Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. *Brain Res*, 1039: 146–152.

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

CLEMENS, M.R.; WAILER, H.D. (1987). Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids*, 45: 251-268.

COMBS, G. F.; GRAY, W.P. (1998). Chemopreventive Agents: Selenium. *Pharmacol Ther*, 79: 179–192.

COLLINS, A. R.; RAŠLOVÁ, K.; SOMOROVSKÁ, M.; Petrovská, H.; Ondrusová, A.; Vohnout, B.; Fábry, R.; Dusinská, M.(1998). DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 25: 373–377.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23: 143–151.

COMMANDEUR, J.N.; ROOSEBOOM, M.; VERMEULEN, N.P. (2001). Chemistry and biological activity of novel selenium-containing compounds. *Adv Exp Med Biol*, 500: 105-112.

COMASSETO, J. V.; LING, L.W.; PETRAGNANI, N.; STEFANI, H.A. (1997). Vinylic selenides and tellurides – preparations, reactivity and synthetic applications. *Synthesis*, 4: 373-&.

COMASSETO, J.V. (1983). Vinylic selenides. *J Organomet Chem*, 253: 131-181.

DAS, R.K.; HOSSAIN, S.K.U.; BHATTACHARYA, S. (2005). Diphenylmethyl selenocyanate inhibits DMBA-croton oil induced two-stage mouse skin carcinogenesis by inducing apoptosis and inhibiting cutaneous cell proliferation. *Cancer Lett*, 230:1-12.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. (1996). Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ*, 3:71-78.

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

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

DOUCET, A. (1988). Function and control of Na⁺-K⁺-ATPase in single nephron segments of the mammalian kidney. *Kidney Int*, 34: 749-760.

DOBROTA, D.; MATEJOVICOVA, M.; KURELLA, E.G.; BOLDYREV, A.A. (1999). Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell Mol Neurobiol* 19: 141-149.

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

EL-BAYOUMY, K.; UPADHYAYA, P.; DATE, V.; SOHN, O.; FIALA, E. S.; REDDY B. (1991). Metabolism of [14C] Benzyl Selenocyanate in the F344 Rat. *Chem Res Toxicol*, 4: 560-565.

EL-BAYOUMY, K. (2001). The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res*, 475:123-39.

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

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

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

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

FARINA, M.; BARBOSA, N.B.V.; NOGUEIRA, C.W.; FOLMER, V.; ZENI, G.; ANDRADE, L.H.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. (2002). Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinatase from rat liver and cucumber leaves. *Braz J Med Biol Res*, 35: 623-631.

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

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

FAVERO, A.M., WEIS, S.N., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., 2005. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reproductive toxicology* 20, 561-568.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A.; SCHOCK, H.H. (1989) Glutathione peroxidase: A selenium enzyme. *FEBS Lett*, 32: 132-134.

FOLMER, V.; SANTOS, F.W.; SAVEGNAGO, L.; BRITO, V.B.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B. (2004) High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na⁺-K⁺-ATPase but not on and d- aminolevulinatase in mice. *Toxicol Lett.*, 153: 333–341.

GABRIELSON, E.W.; LOPEZPLAZA, I.; BARRETT, J.; POMMIER, Y. (1989). Cytotoxicity and genotoxicity of hydrogen-peroxide for cultured human bronchial epithelial-cells. *Lab Invest*, 60: A31.

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

GIANNI, P.; JAN, K.J.; DOUGLAS, M.J.; STUART, P.M.; TARNOPOLSKY, M.A. (2004). Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 39: 1391-1400.

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

GREEN, M.; HARWOOD, H.; BARROWMAN, C.; RAHMAN, P.; EGGEMAN, A.; FESTRY, F.; DOBSON, P.; NG, T. (2007). A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labelling. *J Mater Chem*, 17: 1989–1994.

GUPTA, N.; PORTER, T.D. (2001). Inhibition of human squalene monooxygenase by selenium compounds. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16: 18–23.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, New York 1989.

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

HU, M.L.; SPALLHOLZ, J.E. (1983). In vitro hemolysis of rat erythrocytes by selenium compounds. *Biochem Pharmacol*, 32:957-61.

HUANG, W.H.; WANG, Y.; ASKARI, A.; ZOLOTARJOVA, N.; GANJEIZADEH, M. (1994). Different sensitivities of the Na⁺/K⁺-ATPase isoforms to oxidants. *Biochim Biophys Acta*, 23: 108-114.

INEU, R.P.; PEREIRA, M.E.; ASCHNER, M.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. (2008). Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 46: 3023-029.

IP, O.; OKPOKO, F.B.; OJOBOR, P.D. (2007) Antioxidant Effects of Vitamins C and E on Phenylhydrazine-Induced Haemolysis in Sprague Dawley Rats: Evidence for A better Protection by Vitamin E. *Niger Postgrad Med J*, 14:1-7.

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

JL, L.L.; FU, R. (1992). Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol*, 72: 549-554.

JORGENSEN, P.L. (1986). Structure, function and regulation of Na⁺-K⁺-ATPase in the kidney. *Kidney Int*, 29: 10–20.

KADE, I.J.; PAIXÃO, M.W.; RODRIGUES, O.E.; BARBOSA, N.B.; BRAGA, A.L.; AVILA, D.S.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B. (2008). Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. *Neurochem Res*, 33: 167-178.

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

KANSKI, J.; DRAKE, J.; AKSENOVA, M.; ENGMAN, L.; BUTTERFIELD, D.A. (2001). Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(*N,N*-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Res*, 911:12-21.

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

KUNWAR, A.; MISHRA, B.; BARIK, A.; KUMBHARE, L.B.; PANDEY, R.; JAIN, V.K.; PRIYADARSINI, K. I. (2007). 3, 3'-Diselenodipropionic Acid, an Efficient Peroxyl Radical Scavenger and a GPx Mimic, Protects Erythrocytes (RBCs) from AAPH-Induced Hemolysis. *Chem Res Toxicol*, 20:1482-1487.

KURANTSIN-MILLS, KLUG, R.K.; LESSIN, L.S. (1988). Irreversible erythrocyte volume expansion induced by telluride. *Br J Haematol*, 70:369-374.

LACASSE, Y.; RICHTER, C. (1976). Toxicité du sélénium et de ses dérivés. *Union Med Canada*, 1192-1199.

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

LAMPERT, P.W.; GARRETT, R.S. (1971). Mechanism of demyelination in tellurium neuropathy. Electron microscopic observations. *Lab Invest*, 25: 380-388.

LARNER, A.J. (1995). Biological effects of tellurium. *Trace Elem Electrolytes*, 12: 26-31.

LETAVAYOVÁ, L.; VLČKOVÁ, V.; BROZMANOVÁ, J. (2006). Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*, 227: 1-14.

LETAVAYOVÁ, L.; VLASÁKOVÁ, D.; SPALLHOLZ, J.E.; BROZMANOVÁ, J.; CHOVANEC, M. (2008). Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 638: 1-10.

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

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

MARCIN, J.; MACIEJ, J.; MICHAEL, J.; SZCZYPKA, M.; GAJEWSKA, J.; LASKOWSKA-KILTA, T. (1997). Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin Chim Acta*, 267: 129-142.

MARTIN, D.W. (2005). Structure-function relationships in the Na⁺,K⁺-pump. *Sem Nephrol*, 25: 282-291.

MIEYAL, J.J.; SRINIVASAN, V.; STARKE, D.W. (1995). Glutathionyl specificity of thioltransferases: mechanistic and physiological implications. In: *Biothiols in Health and Disease*. Parker L, Cadenas E, Marcel D (eds), New York, 305-372.

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

MÜLLER, A.; CADENAS, E.; GRAF, P.; SIES, H. (1984). A novel biologically active seleno-organic compound 1: Glutathione peroxidase-like activity *in vitro* and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem Pharmacol*, 33: 3235-3239.

MÜLLER, R.; ZSCHIESCHE, W.; STEFFEN, H.M.; SCHALLER, K.H. (1989). Tellurium intoxication. *Kiln Wochenschr*, 67: 1152-1155.

MOXON, A.L.; RHIAN M. (1943). Selenium Poisoning. *Physiol Rev*, 23:305-337.

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

NANDHINI, T.A.; ANURADHA, C.V. (2003). Inhibition of lipid peroxidation, protein glycation and elevation of membrane ion pump activity by taurine in RBC exposed to high glucose. *Clin Chim Acta*, 336:129-135.

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

NEVE, J.; HENRY, M.; PERETZ, A.; MARESCHI, J.P. (1987) L'importance nutritionnelle du sélénium. *Cah Nutr Diet*, 22: 145-162.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. (1991). Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr*, 53:201-205.

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

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

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and Pharmacology. *Chem Rev*, 104:6255-6285.

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

PADMA, M.V.; JACOBS, M.; KRAUS, G.; COLLINS, M.; DUNIGAN, K.; MANTIL, J. (2001). ¹¹C-methionine PET imaging of leptomeningeal metastases from primary breast cancer – a case report. *J Neurooncol*, 55: 39-44.

PAINTER, E. P. *Chem Rev*, (1941) 28, 179.

PARNHAM, M.J.; GRAF, E. (1991) Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog Drug Res*, 36: 10-47.

PAULMIER C. *Selenium Reagents and Intermediates in: Organic Synthesis*, Pergamon, Oxford 1986.

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

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

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

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

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

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

RAYMAN, M.P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet*, 56:233-241.

REDDY, C.S.S.S.; SUBRAMANYAM, R. VANI, V.; DEVI, S.A.S. (2007). In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicol Vitro*, 21: 1355-1364.

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

ROSA, R.M.; FLORES, D.G.; APPELT, H.R.; BRAGA, A.L.; HENRIQUES, J.A.; ROESLER, R. (2003). Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett*, 341: 217–220.

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

ROSA, R.M.; ROESLER, R.; BRAGA, A.L.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. (2007a). Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Braz J Med Biol Res*, 40: 1287-1304.

ROSA, R.M.; PICADA, J.N.; SAFFIA, J.; HENRIQUES, J.A.P.(2007b). Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutat Res*, 628: 87-98.

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

ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER H.E. (1973). Selenium: biochemical role as a component of GSHPx. *Science*, 179:588-90.

SAILER, B.L.; LILES, N.; DICKERSON, S.; CHASTEEN, T.G. (2003). Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Archives of Toxicology*, 77: 30-36.

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

SCHIAR, V.P.P.; DOS SANTOS, D.B.; LÜDTKE, D.S.; VARGAS, F.; PAIXÃO, M.W.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.(2007). Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicol Vitro*, 21:139-145.

SCHIAR, V.P.P.; SANTOS, D.B.; PAIXÃO, M.W.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G. (2009). Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: A possible involvement of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact*, 177: 28-33.

SCHWARZ, K.; FLOTZ, C. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against necrotic dietary liver degeneration. *J Am Chem Soc*, 79: 3292-3293.

SEKO, Y.; SAITO, Y.; KITAHARA, J.; IMURA, N. (1989). Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro, in: *Selenium in Biology and Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 70–73.

SHAMBERGER, R.J. (1985). The genotoxicity of selenium. *Mutat Res*, 54: 29-48.

SICIŃSKA, P.; BUKOWSKA, B.; MICHAŁOWICZ, J.; DUDA, W.(2007). Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. *Toxicon*, 47:387-97.

SIEMS, W.G.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T. (2000). Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol*, 53: 09-17.

SOARES, F.A.; FARINA, M.; BOETTCHERA, A.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. (2005). Organic and inorganic forms of selenium inhibited differently fish (*Rhamdia quelen*) and rat (*Rattus norvegicus albinus*) d-aminolevulinate dehydratase. *Environ Res*, 98: 46-54.

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

SREDNI, B.; CASPI, R.R.; KLEIN, A.; KALECHMAN, Y.; DANZIGER, Y.; BENYA'AKOV, M.; TAMARI, T.; SHALIT, F.; ALBECK, M. (1988). The biological activity and immunotherapeutic properties of AS-101, asynthetic organotellurium compound. *Nat Immun Cell Grow*, 7: 163-168.

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

SPALLHOLZ, J.E.;SHRIVER,B.J.; REID,T.W. (2001). Dimethyldiselenide and methylseleninic acid generate superoxide in an in vitro chemiluminescence assay in the presence of glutathione: implications for the anticarcinogenic activity of L-selenomethionine and L-Se-methylselenocysteine. *Nutr Cancer*, 40:34-41.

STADTMAN TC. Selenium-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 93-110.

STANGHERLIN, E.C.; FAVERO, A.M.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W. (2005).Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology*, 207:231-9.

STEWART, N.G.; CROOKS, R.N. (1958). Long-Range Travel of the Radioactive Cloud from the Accident at Windscale. *Nature*, 182: 627- 628.

SUN, X.; Wong, J.R.; Song, K.; Chen, L.B. (1996). Anticarcinoma activity of a novel drug, 3-ethyl-3'methylthiatelluracarbocyanine iodite (Te) a tellurium-containing cyanine targeted at mitochondria.*Clin Canc Res*, 2: 1335-1340.

TAYLOR, A. (1996). Biochemisry of tellurium. *Biol Trace Elem Res*, 55: 231-239.

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

TORRES, B. B. (2003). Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; VALENTE, M.; FERRI, L.; GREGOLIN, C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta*, 710: 197-211.

URSINI, F.; BINDOLI, A. (1987). The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids*, 44: 255-276.

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

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

WAGNER-RECIO, M.; TOEWS, A.D.; MORELL, P. (1991). Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: Preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. *J Neurochem*, 57: 1891-1901.

WENDEL, A.; FAUSEL, M.; HASAN SAFAYHI, H.; TIEGS, G.; OTTER, R. (1984). A novel biologically-active organoselenium compound 2 activity of PZ-51 in relation to glutathione-peroxidase. *Biochem Pharmacol*, 33: 3241-3245.

WILSON, S.R.; ZUCKER, P.A.; HUANG, R.C.; SPECTOR, A. (1989). Development of Synthetic Compounds with Glutathione Peroxidase Activity. *J Am Chem Soc*, 111: 5936-5939.

WIDY-TYSZIEWICZ, E.; PIECHAL, A.; GAJKOWSKA, B.; SMIAŁEK, M. (2002). Tellurium-induced cognitive deficits in rats are related to neuropathological changes in the central nervous system. *Toxicol Lett*, 131: 203-214.

WO, W.H. YANG, F.Y., (1986). Study on the interaction of Se and erythrocyte membrane protective effect of Se on the erythrocyte membranes. *Bioelectrochemistry*, 58:127-35.

YAREMA, M.C.; CURRY, S.C. (2005) Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing solutions. *Pediatrics*, 116: 319-321.

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

ZAVODNIK, I.B.; LAPSHINA, E.A.; ZAVODNIK, L.B.; SOSZYŃSKI, M.; BARTOSZ, G.; BRYSEWSKA, M. (1986). Hypochlorous acid-induced oxidative damage of human red blood cells: effects of tert-butyl hydroperoxide and nitrite on the HOCl reaction with erythrocytes. *Sci Sin*, 29:1177-1185.

ZHANG H.; SWIHART M.T. (2007). Synthesis of Tellurium Dioxide Nanoparticles by Spray Pyrolysis. *Chemistry of Materials*, 19: 1290-1301.