

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS
DE SELÊNIO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
E DE VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE
CÓRTEX DE RATOS JOVENS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paula Eliete Rodrigues Bitencourt

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS DE
SELÊNIO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE
VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE CÓRTEX DE
RATOS JOVENS**

Paula Eliete Rodrigues Bitencourt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Moretto

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

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

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS DE SELÊNIO
SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE VIABILIDADE CELULAR
EM FATIAS DE CÓRTEX DE RATOS JOVENS**

elaborada por
Paula Eliete Rodrigues Bitencourt

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maria Beatriz Moretto, Dr.^a
(Presidente/Orientadora)

Juliana Trevisan da Rocha, Dr.^a (UFSM)

Paula Rossini Augusti, Dr.^a (UFRGS)

Santa Maria, 29 de janeiro de 2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

" É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais."

Coelho Neto

Dedico esse trabalho aos meus pais, Catarina e João Alberto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, simplesmente, por tudo! Por todas as oportunidades, pelas pessoas que cruzaram meu caminho, por estar do meu lado em cada decisão que tomei na minha vida, guiando-me sempre!

A minha orientadora, Maria Beatriz, por auxiliar-me tanto na formação acadêmica quanto na vida pessoal, por tantos ensinamentos, conselhos... amizade! Por ter me apresentado à docência e ter me feito descobrir o que eu realmente pretendo ser.

Às professoras Dra. Paula Augusti, Dra. Juliana Trevisan e Dra. Thissiane Gonçalves, pela disponibilidade em avaliar meu trabalho.

Aos meus pais pela educação, amor, carinho, incentivo, compreensão, por terem me ensinado a ser quem sou, por terem me ensinado a base de tudo que move a vida: nossos princípios. Ao meu irmão, Júnior, por todo apoio, carinho e amizade. Sei que vocês têm muito orgulho dos resultados de todos meus esforços... mas vocês que são meu maior orgulho!

Aos meus tios, Nara e Paulo, e padrinhos, Alzira e Antônio, pelo carinho e palavras de incentivo durante todos esses anos que, mesmo longe, foram muito importantes para chegar até aqui.

Ao meu marido Régis, pelo amor, incentivo, (muita) paciência, carinho, respeito... Ah! e pelos puxões de orelha também! Ter você ao meu lado em tantos momentos é a certeza de que encontrei a metade da minha laranja! Não tenho palavras para descrever a tua importância na minha vida, Te Amo! A minha sogra, Salete, por todo apoio e orações para que tudo desse certo!

As minhas amigas, Laura, Márcia e Pauline, pela amizade desde a graduação, pela lealdade e cumplicidade que sempre tivemos e por me proporcionarem momentos tão maravilhosos! Vocês são únicas...

Ao Ernesto, Simone e Ana Luísa, que me adotaram em Santa Maria e fizeram o início da minha caminhada mais leve e feliz!

Às amigadas criadas em laboratório (risos), Faída e Luziane, que foram meu primeiro contato com o mundo científico, que me ensinaram muito do que eu sei... só tenho a agradecer por tudo, principalmente, pela amizade de todos esses anos que foi além do trabalho! À Lariane e à Priscila, que além da amizade e do carinho, me

ajudaram em tudo sempre! Quero ter vocês comigo sempre e pra sempre! As minhas colegas do Laboratório 1207, Karine e Gabriela, pela amizade, ensinamentos, conversas científicas, por serem exemplos de crescimento como pesquisadoras! À Rapha e à Thainan, pela amizade e auxílios. Todas estarão sempre no meu coração!!!

Não posso deixar de agradecer aos meus anjinhos de quatro patas, que me trazem tanta paz e carinho!

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, muito obrigada por tudo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores que, de alguma forma, contribuíram para minha formação.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela infraestrutura e ensino público de qualidade.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS DE SELÊNIO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE CÓRTEX DE RATOS JOVENS

AUTORA: PAULA ELIETE RODRIGUES BITENCOURT
ORIENTADORA: PROF.^a Dr.^a MARIA BEATRIZ MORETTO
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 29 de janeiro de 2014

O selênio (Se) é um oligoelemento essencial em vários processos biológicos. Possui propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do cérebro. A adenosina deaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4) é uma enzima chave no metabolismo das purinas, pois auxilia na regulação dos níveis intra e extracelulares de adenosina, um importante nucleosídeo que atua na neuromodulação dos sistemas nervoso e imune. O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua desintoxicação através de sistemas que removem ou reparam os danos por elas causados. Nesse contexto, vários compostos de Se vêm sendo desenvolvidos e estudados, entre eles podemos citar o 3-metil-1-fenil-2-(fenilselênio)oct-2-en-1-um ($C_{12}H_{22}HOSe$), um organocalcogênio com uma cetona α , β -insaturada funcionando como um vinil calcogênio e o selenato de sódio (Na_2SeO_4), principal Se inorgânico encontrado em animais e plantas. Este estudo teve como objetivo comparar os efeitos do $C_{12}H_{22}HOSe$ (Se orgânico) e Na_2SeO_4 (Se inorgânico) na viabilidade celular, parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e atividade da ADA em fatias de córtex de ratos jovens. Os resultados demonstraram que apenas o Se orgânico provocou a diminuição na atividade da ADA nas concentrações de 1, 10 e $30\mu M$ nas fatias de córtex cerebral dos ratos testados. No entanto, esse resultado não tem relação com a oxidação de seus grupamentos tióis, já que esse composto não alterou os níveis de NP-SH e de LDH. Apesar de ambos os compostos não alterarem os níveis de lipoperoxidação, o Se orgânico apresentou capacidade de sequestrar radicais NO na maior concentração testada. Já o composto inorgânico de Se protegeu as fatias de córtex cerebral contra o dano induzido pelo nitroprussiato de sódio e aumentou os níveis de NP-SH. Os testes de viabilidade celular (LDH e MTT) sugerem a manutenção da integridade celular em fatias de córtex de ratos jovens quando expostos aos compostos de Se. Assim, nossos resultados sugerem que o Se orgânico apresenta propriedades imunomoduladoras por reduzir a atividade da ADA, além de atuar na manutenção da integridade celular. Já o Se inorgânico teve sua atividade antioxidante confirmada. Portanto, os resultados obtidos neste estudo destacam um caminho promissor a ser explorado por ambos os compostos no SNC.

Palavras-chave: 3-metil-1-fenil-2-(fenilselênio) oct-2-en-1-um. selenato de sódio. NP-SH. ADA. citotoxicidade. lipoperoxidação.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

COMPARISON OF THE EFFECTS OF SELENIUM COMPOUNDS ON THE BIOCHEMICAL AND CELL VIABILITY PARAMETERS IN CORTEX SLICES OF YOUNG RATS

AUTHOR: PAULA ELIETE RODRIGUES BITENCOURT

ADVISOR: PROF. DR. MARIA BEATRIZ MORETTO

Place and Date: Santa Maria, January 29th, 2014

Selenium (Se) is an oligoelement crucial for various biological processes. Se has anti-inflammatory and antioxidant properties and plays a key role in brain development. Adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) is a key enzyme in purine metabolism because it helps in the regulation of intracellular and extracellular levels of adenosine, an important nucleoside that acts in the neuromodulation of the immune and nervous systems. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between the production of reactive species and their detoxification by systems that remove or repair the resulting damage. In this context, several Se compounds have been developed and studied, among them the 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one ($C_{12}H_{20}HSe$), which is an α , β -unsaturated ketone functionalized vinyl chalcogenide, and sodium selenate (Na_2SeO_4), the main inorganic form of Se found in animals and plants. The aim of this study was to compare the effects of $C_{12}H_{20}HSe$ (organic Se) and Na_2SeO_4 (inorganic Se) on the cell viability, lipoperoxidation and ADA activity in cortex slices of young rats. The results showed that only organic Se caused a reduction in ADA activity at the concentrations of 1, 10 and $30\mu M$ in the cerebral cortex slices of the rats tested. However, this result is not related to the oxidation of the thiol groups, since this compound did not alter the NP-SH and LDH levels. Both compounds did not affect the lipoperoxidation levels, although the organic Se was capable of sequestering NO radicals at the highest concentration tested. The inorganic Se protected the cerebral cortex slices against the sodium nitroprusside-induced damage and increased the NP-SH levels. The tests used to evaluate cell viability (LDH and MTT) suggest the maintenance of the cell integrity of the cortex slices exposed to Se compounds. Therefore, our results suggest that organic Se has immunomodulatory properties, due to the reduction in ADA activity, and acted in the maintenance of the cell integrity. In turn, the antioxidant activity of inorganic Se was reaffirmed. Hence, the results of this study paved the way to explore both Se compounds in the CNS.

Keywords: 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-um. sodium selenate. NP-SH. ADA. cytotoxicity. lipoperoxidation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - Estrutura química do 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno)oct-2-en-1-um.....	21
FIGURA 2 - Dano oxidativo em macromoléculas	25
FIGURA 3 - Vias de síntese, degradação e recaptação da adenosina	30
FIGURA 4 - Estrutura da enzima adenosina deaminase.....	31
FIGURA 5 - Estrutura da enzima lactato desidrogenase.....	34
FIGURA 6 - Redução do MTT	36

ARTIGO

FIGURA 1 - Chemical structure of 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one.....	40
FIGURA 2 - ADA activity after exposure of cerebral cortex slices of young rats to organoselenium and inorganic Se compounds.....	42
FIGURA 3 - MTT assay in cerebral cortex slices of young rats to organoselenium and inorganic Se compounds	42
FIGURA 4 - Effect os organoselenium and inorganic Se compounds on SNP-induced lipid peroxidation in cerebral cortex slices of young rats	43
FIGURA 5 - Nitric oxide radical-scavenging activity of Se compounds	43

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

TABELA 1 - Effects of organic and inorganic Se compounds on LDH activity43

TABELA 2 - Effects os organic and inorganic Se compounds on NP-SH.....43

LISTA DE ABREVIATURAS

3-ASP- 3-alquinil selenofeno
5'-AMP- 5'- monofosfato de adenosina
[(MeOPhSe)₂]- p,p'-metoxidifenil diseleneto
Ácido ascórbico- vitamina C
ADA- Adenosina deaminase
ADGF's- fatores de crescimento relacionados à adenosina desaminase
ADP- Adenosina difosfato
α-tocoferol- vitamina E
AMPc- adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP- Adenosina trifosfato
ATPase- adenosina trifosfato sódio potássio
β-caroteno- provitamina A
BPD- (E)-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol
BPIS- bis (fenilimidazoselenazolil) disseleneto
Bis seleneto- (Z)-2,3-bis(4-clorofenilselanil) prop-2-en-1-ol
C₂₁H₂HOSe- Se orgânico, 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno) oct-2-en-1 um
CAT- catalase
dAdo- 2'-deoxiadenosina
δ-ALA-D- delta aminolevulinato desidratase
DPPIV- Dipeptidil peptidase IV
DTDS- 2,2'- ditienil diseleneto
Ebselen- 2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3-(2H)-one
ERNS- espécies reativas ao nitrogênio
EROs- espécies reativas de oxigênio
GPx- glutaciona peroxidase
GR- glutaciona redutase
HNE- 4-hidroxi-2-nonenal
HNO₂- ácido nitroso
LDH- Lactato desidrogenase
MeHg- metilmercúrio
MeSeCis- metilselenocisteína
MetS- Síndrome Metabólica
MDA- malondialdeído
MTT- Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol- 2- il)- 2,5-difeniltertrazolim
NADPH- nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
Na₂SeO₄- Selenato de sódio
SNC- Sistema Nervoso Central
NapSe- binafitil diseleneto
NPS- Nitroprussiato de sódio
NP-SH- tióis não-protéicos
N₂O₃- óxido nitroso
NO- óxido nítrico
NO₂⁻- nitritos
NO₃⁻- nitratos
O⁻²- superóxido
OH- radical hidroxil

ONOO⁻- peroxinitrito
((PhSe)₂)- difenil disseleneto
RL- Radicais livres
RO⁻- alcoxila
ROO⁻- peroxila
RS-Se-Sr- selenotrisulfetos
SAH- S-adenosilhomocisteína
SCID- Síndrome Hereditária de Imunodeficiência Combinada Severa
Se- Selênio
Se⁻²- seleneto
Se⁰- selênio elementar
Se⁺⁴- selenito
Se⁺⁶- selenato
SeCis- selenocisteína
SeMet- selenometionina
Se-TZ- 4-phenyl-1-(fenilselanilmetil)-1,2,3-triazol
SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SH- grupamentos sulfídricos
SOD- superóxido dismutase
TBARS- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Permissão para reprodução do artigo científico	67
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Selênio	17
2.1.1 Características	17
2.1.2 Selenato de sódio (Na ₂ SeO ₄)	17
2.1.3 Importância Biológica	18
2.2 Organocalcogênios	19
2.2.1 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno)oct-2-en-1-um (C ₁₂ H ₂ HOSe, Se orgânico)	21
2.2.2 Compostos de Se e o cérebro	22
2.3 Radicais livres	23
2.4 Estresse oxidativo	25
2.4.1 Estresse oxidativo, compostos de selênio e o cérebro	26
2.5 Sistema purinérgico	28
2.5.1 Adenosina	28
2.5.2 Adenosina deaminase (ADA, adenosina aminohidrolase, E.C. 3.5.4.4)	30
2.5.3 Importância biológica	32
2.6 Ensaios para avaliar a viabilidade celular	33
2.6.1 Lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27)	33
2.6.2 Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltertrazolim (MTT)	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 ARTIGO	38
5 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	66

APRESENTAÇÃO

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.

As seções **MATERIAIS E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** estão apresentados sob a forma de artigo, os quais se encontram no item **ARTIGO CIENTÍFICO** e representam a íntegra deste estudo.

A seção **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, disposta no final desta dissertação, refere-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.

1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um oligoelemento com funções biológicas essenciais, sendo componente de várias selenoproteínas e algumas selenoenzimas as quais representam sistemas antioxidantes fundamentais que auxiliam na manutenção da homeostase redox celular (BEHNE et al., 1997; VALDIGLESIAS et al., 2010). No entanto, a regulação dos níveis de Se é importante para determinar o limite entre a toxicidade ou deficiência (CAITO et al., 2011). Vários estudos já demonstraram que o Se é essencial para a função normal do cérebro (BOU-RESLI et al., 2002; KUHBAKER et al., 2009; ZHANG, 2010), uma vez que este é um órgão resistente a flutuações nos níveis de Se (CHEN; BERRY, 2003; NAKAYAMA, 2007).

Nas últimas décadas o interesse pelo desenvolvimento de compostos organocalcogênicos tem aumentado consideravelmente devido às suas interessantes propriedades biológicas (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004). Seus mecanismos, tanto tóxicos como protetores, ainda não estão bem esclarecidos, mas já se sabe que eles podem interagir diretamente com tióis oxidando-os a dissulfetos (MACIEL et al., 2000). Compostos orgânicos de Se são usados devido a sua seletividade reacional e a sua grande atividade biológica, podendo apresentar importantes propriedades farmacológicas ou toxicológicas. O organoselênio 3-metil-1-fenil-2-(fenilselênio) oct-2-en-1-um ($C_{21}H_{20}HSe$, Se orgânico) é uma cetona α , β - insaturada que funciona como um vinil calcogênio (LENARDÃO et al., 2007). O selenato de sódio (Na_2SeO_4 , Se inorgânico) é o principal Se inorgânico encontrado em plantas e animais, que quando em excesso, tem sua toxicidade relacionada a oxidação de tióis endógenos. Atualmente, vem sendo estudado para o tratamento de diversas doenças como câncer, diabetes e estudos que envolvem Sistema Nervoso Central (SNC).

A oxidação é uma parte fundamental da via aeróbica do metabolismo e, assim, os radicais livres (RL) são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de RL e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (MATES; SANCHEZ-JIMENEZ, 1999). Esse desequilíbrio pode levar à destruição de células neuronais e vasculares no SNC (CHUNG, et al. 2005).

A adenosina é uma molécula sinalizadora endógena, que desempenha um importante papel neuromodulador, com ações excitatórias e inibitórias no SNC. Uma das enzimas responsáveis pelo seu metabolismo é a adenosina deaminase (E.C. 3.5.4.4, ADA) que promove a desaminação irreversível da adenosina em inosina e amônia, ou 2'- deoxiadenosina em 2'-desoxinosina. A atividade da ADA pode ser encontrada de forma variada em todos os tipos de células presentes no SNC (FRANCO et al., 1997; ZAVIALOV E ENGSTROM, 2005). Diversos estudos têm sido reportados sobre o metabolismo dessa enzima em tecidos e células sob as mais diferentes condições (BELLÉ et al., 2009; DA SILVA et al., 2010; ABDALLA et al., 2011; DE BONA et al., 2011; BELLÉ et al., 2012; DE BONA et al., 2013).

Existem diversos relatos na literatura sobre os compostos orgânicos de Se, onde foram demonstrados importantes efeitos farmacológicos e toxicológicos (GHISLENI et al., 2003; MORETTO et al., 2004; NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004; MORETTO et al., 2005a,b,c; FACHINETTO et al., 2007; INEU et al., 2008; PENZ et al., 2009; GEMELLI et al., 2011; PRESTES et al., 2012; PINTON et al., 2013a). Estudos utilizando o $C_{21}H_2HOSe$ demonstraram efeitos interessantes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BELLÉ et al., 2011a; GEMELLI et al., 2011; MEDEIROS et al., 2012, LACERDA et al., 2012; MELLO et al., 2012). Deste modo, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos dos compostos de Se orgânico e inorgânico na atividade da ADA, na lipoperoxidação e viabilidade celular em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Selênio

2.1.1 Características

O Se é um elemento do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}). O Se elementar é insolúvel em água (WHANGER, 2002). O selenato e o selenito são considerados formas inorgânicas de Se.

O Se foi descoberto em 1818, por Jons Jacob Berzelius, na Suécia. No entanto, relatos sobre sua toxicidade remontam do século XIII, por Marco Polo na China, quando cavalos se intoxicaram, provavelmente, devido à ingestão de plantas seleníferas, como as do gênero *Astragalus*, *Xylorrhiza*, *Oonopsis* e *Stanleya* (FLOHÉ, 2009). Na década de 40, Painter (1941) demonstrou que parte da toxicidade do Se inorgânico poderia estar relacionada à oxidação de tióis endógenos com a concomitante formação de dissulfetos e intermediários instáveis chamados de selenotrisulfetos (RS-Se-SR). Vários pesquisadores confirmaram a interação entre o selênio inorgânico e tióis (STEKOL, 1942; TSEN; TAPPEL, 1958; GANTHER, 1971; SEKO et al., 1989; KITAHARA et al., 1993), sendo que, apenas em 1957 sua essencialidade nutricional foi demonstrada em ratos (SCHWARTZ; FOLTZ, 1957).

2.1.2 Selenato de sódio (Na_2SeO_4)

O selenato de sódio (Na_2SeO_4), o principal Se inorgânico encontrado em animais e plantas, e o selenito de sódio são altamente solúveis em água. Alguns autores citam que as formas inorgânicas são a melhor fonte de suplementação em alimentos para todas as espécies, por apresentar alta biodisponibilidade de Se e

baixa reatividade (MCDOWELL et al., 2002). Formas inorgânicas como o selenato são convertidos em selenito e este é reduzido por proteínas tiol intracelulares, como a glutationa, e redutases dependentes de nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH). O produto final destas reações é o seleneto de hidrogênio, que é o intermediário comum para síntese de selenoproteínas e para síntese de produtos metilados para excreção (GANTHER; LAWRENCE, 1997).

O selenato de sódio foi usado pela primeira vez na indústria de vidro, também sendo utilizado em inseticidas e fungicidas. Atualmente, o selenato tem sido estudado por apresentar um importante papel no tratamento de doenças como o câncer, diabetes, epilepsia, em estudos neurológicos e em estudos que envolvem a contaminação por Se no meio ambiente (CORCORAN et al., 2010; VAN EERSEL et al., 2010; ALTURKMANI et al., 2012; JONES et al., 2012; MARESOVÁ et al., 2013; SALAMA et al., 2013; TSUKAMOTO et al., 2013).

2.1.3 Importância biológica do Se

O primeiro relato sobre o Se foi a respeito da sua toxicidade, que ocorre quando organismos são expostos de forma crônica a esse metaloide. Seu mecanismo de toxicidade está ligado à geração de estresse oxidativo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, podendo provocar aumento da lipoperoxidação, neurotoxicidade e influenciar no sistema imune (RAYMAN, 2000; COMBS et al., 2009). Ainda, dados disponíveis na literatura sugerem que baixos níveis de Se podem levar à predisposição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, cirrose, diabetes dentre outras patologias (FROST, 1962; SHAMBERGER; FROST, 1969; FLOÉ, 2009).

O Se é importante em diversas funções biológicas dentre elas: no sistema antioxidante, atua como componente do sítio ativo da enzima glutationa peroxidase (GPx), que auxilia na manutenção da integridade das membranas e protege as biomoléculas contra o estresse oxidativo, e de outras, como a tioredoxina redutase, que auxilia na regulação do estado redox (STADTMAN, 1980; RAYMAN, 2000; FLOÉ; HARRIS, 2007). Esse oligoelemento desempenha função no

desenvolvimento do cérebro, através da selenoproteína P, que está envolvida no transporte e homeostase cerebral de Se, bem como sobre o sistema imune, tireoide (iodotironina deiodase) e sistema reprodutor (ALLAN et al., 1999; BEHNE et al., 2000; RAYMAN, 2000; HILL et al., 2003; SCHOMBURG et al. 2003; COMBS et al., 2009).

O Se é componente de várias selenoproteínas (VALDIGLESIAS et al., 2010). Cada uma dessas é caracterizada pela incorporação de Se na sequência do aminoácido selenocisteína (SeCis) (FOSTER, 2006), sendo que as principais formas de selenoproteínas são: SeCis, selenometionina (SeMet) e metilselenocisteína (MeSeCis) (LETAVAYOVÁ, 2006). SeMet é a forma predominante de Se encontrada em grãos de cereais. MeSeCis é a forma predominante de Se presente em plantas que acumulam esse metaloide, como alho, brócolis, cebola e alho poró (WHANGER, 1989). Quando o Se inorgânico é dado aos animais, o principal selenocomposto formado é a SeCis mas ainda são restritas as informações sobre outros selenocompostos formados (SCHRAUZER, 2000; IP; LISK, 1994).

A fonte mais importante de Se é a dieta, sendo que sua concentração e a quantidade de alimentos consumidos é muito importante para a bioavaliação desse metaloide no organismo (NAVARRO-ALARCON; CABRERA-VIQUE, 2008). A suplementação de Se na dieta é bem aceita, tanto que a Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos recomenda, para indivíduos adultos, uma ingestão diária de Se entre 55 e 400ug, com exceção de gestantes e lactantes, cujos valores são diferentes (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2000).

2.2 Organocalcogênios

O interesse pelos organocalcogênios teve início a partir de 1930, depois de descobertas de aplicações sintéticas e propriedades biológicas interessantes desses compostos (PETRAGNANI et al., 1976; COMASSETO, 1983; PARNHAM e GRAF, 1991; KANDA et al., 1999; NOGUEIRA et al., 2004; PRIGOL et al., 2012). Os organocalcogênios são importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (PAULMIER, 1986), e, conseqüentemente, o risco de contaminação

ocupacional também tem motivado estudos toxicológicos. Outro aspecto relevante é o aumento do entendimento do papel fisiológico do Se na regulação do dano oxidativo (CADENAS; SIES, 1985; URSINI; BINDOLI, 1987), juntamente com a tentativa crescente de desenvolvimento de compostos que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas (PARNHAM; GRAF, 1991). No entanto, seus mecanismos, tanto dos efeitos tóxicos como dos protetores, ainda não estão totalmente esclarecidos. Mas já existe uma teoria de que alguns organocalcogênios podem reagir diretamente com grupamentos tióis de várias enzimas sulfidrílicas como: δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALAD), 5-lipoxigenase, sódio-potássio adenosina trifosfato (Na^+ , K^+ ATPase) e creatina quinase (BJORNSTEDT et al., 1996; MACIEL et al., 2000; EMANUELLI et al., 2001; BORGES et al., 2005; ANDRADE et al., 2010).

Existem diversos compostos orgânicos de selênio relatados na literatura que possuem atividades biológicas interessantes. Dentre eles podemos citar: o (E)-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol (BPD), que demonstrou atividade hepatoprotetora; o 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno)oct-2-em-1-ona ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{HSe}$), atividade oxidante; o difenil disseleneto ((PhSe)₂), atividades anti-hiperglicêmicas, anti-hipercolesterolemias, antiinflamatórias, antioxidantes, hipoglicêmica e neuroprotetoras; o Ebselen (2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3-(2H)-one), que apresentou atividades antiinflamatórias e antioxidantes; o binafitil diseleneto (NapSe), com atividade hepatoprotetora e antioxidante; o 3-alquilil selenofeno (3-ASP), ação anticonvulsivante e hepatoprotetora; o p,p'-metoxidifenil diseleneto [(MeOPhSe)₂], atividade neuroprotetora; o (Z)-2,3-bis(4-clorofenilselanil) prop-2-en-1-ol (bis seleneto), efeito antinociceptivo e antiinflamatório; o 2,2'-ditienil diseleneto (DTDS), atividades oxidantes; o bis (fenilimidazoselenazolil) disseleneto (BPIS), que apresentou propriedades antinociceptivas (MACIEL et al., 2000; GHISLENI et al., 2003; MEOTTI et al., 2003; MORETTO et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2003a,b; MORETTO et al., 2004; BORGES et al., 2005; ZASSO et al., 2005; MORETTO et al., 2005b; FACHINETTO et al., 2007; INEU et al., 2008; CARVALHO et al. 2009; DA ROCHA et al., 2009; PENZ et al., 2009; SOUZA et al., 2010; GEMELLI, et al., 2011; WILHELM et al. 2011; COSTA et al., 2012; WILHELM et al. 2012; IBRAHIM, et al., 2012; BORTOLLATO et al., 2013a; CHAGAS et al., 2013a; CHAGAS et al., 2013b; PESARICO et al., 2013; PINTON et al., 2013b). No entanto, trabalhos que reúnem a

comparação de compostos orgânicos e inorgânicos de Se sob diferentes condições e parâmetros ainda são escassos na literatura.

2.2.1 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno)oct-2-en-1-um (C₁₂H₂HOSe, Se orgânico)

O 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno)oct-2-en-1-um (Figura 1) é um organocalcogênio que possui uma cetona α , β -insaturada que funciona como um vinil calcogênio sendo uma ferramenta em potencial na síntese orgânica (LENARDÃO et al., 2007).

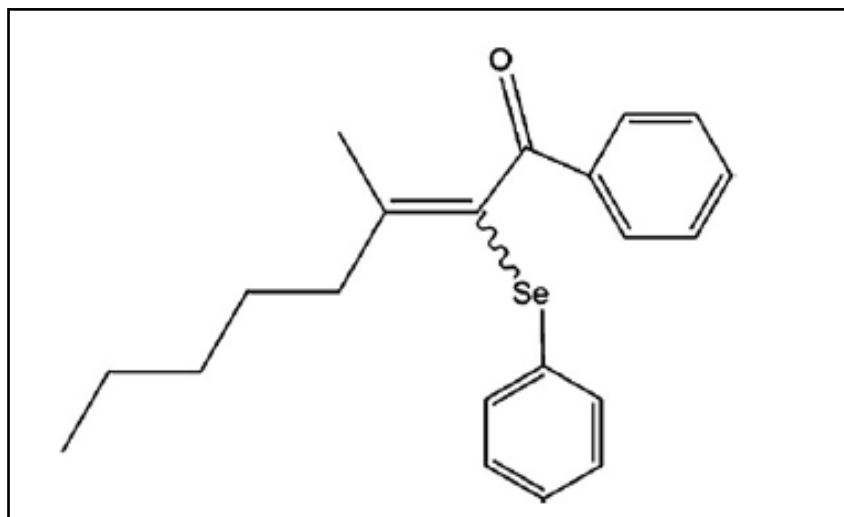


Figura 1 – Estrutura química do 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno)oct-2-en-1-um.

Fonte: adaptado de GEMELLI et al., 2011.

Como é um composto relativamente novo, ainda existem poucos dados disponíveis na literatura, tanto sobre sua farmacologia quanto sua toxicologia. No entanto, em estudos *in vitro*, Gemelli e colaboradores (2011) demonstraram que esse composto foi capaz de induzir estresse oxidativo em estruturas como fígado, rim e coração de ratos.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram efeitos diferentes com $C_{21}H_2HOSe$ e selenato de sódio quando uma suspensão de leucócitos humanos é exposta a esses compostos (BELLÉ et al., 2011a). Não houve alteração nos níveis de lipoperoxidação e na enzima lactato desidrogenase (LDH), apesar de haver uma diminuição da atividade da enzima ADA e um aumento no teste de viabilidade celular MTT nessas células.

Esse composto também foi utilizado em tratamento crônico em ratos, onde foi observado uma indução de estresse oxidativo em diferentes regiões do cérebro, alterações no comportamento e em algumas determinações bioquímicas em diferentes tecidos como cerebral, hepático, renal e também no soro, bem como distúrbios hematológicos nesses animais (LACERDA et al., 2012; MEDEIROS et al., 2012; MELLO et al., 2012).

2.2.2 Compostos de Se e o cérebro

Vários estudos já demonstraram que o Se é essencial para a função normal do cérebro (BOU-RESLI et al., 2002; KUHbacher et al., 2009; ZHANG, 2010). De fato, Bou-Resli e colaboradores (2002) demonstraram um aumento na concentração de Se no cerebelo, córtex, hipotálamo e hipocampo de ratos nascidos de mães que tiveram suplementação de Se. Esse aumento pode indicar uma melhora no sistema de defesa antioxidante, que pode influenciar positivamente no desenvolvimento normal do cérebro.

Existem diversos estudos sobre os diferentes compostos orgânicos de Se e já é bem estabelecida a atividade neuroprotetora e anti-inflamatória do Ebselen e do $(PhSe)_2$, respectivamente (DAVALOS, 1999; NOGUEIRA et al., 2003 MORETTO et al., 2005a,b,c; ZASSO et al., 2005). De acordo com Moretto et al. (2005a,c), esses organoselênios previniram a hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto de córtex de ratos jovens, induzida por agente neurotóxico, o metilmercúrio (MeHg). O $(PhSe)_2$ demonstrou ser um potente candidato para o tratamento de disfunções neuronais que, muitas vezes, acompanha complicações associadas à hiperglicemia diabética (KADE et al., 2009a). Esse mesmo composto teve um efeito protetor em

fatias de hipocampo de ratos submetidos a um modelo clássico de isquemia *in vitro* (GHISLENI et al., 2003). O (PhSe)₂ também apresentou efeito protetor contra o estresse oxidativo e em citocinas pró-inflamatórias em modelo de isquemia cerebral (BRÜNING, et al., 2012). Outro estudo, demonstrou que o (PhSe)₂ causou alterações na homeostase do glutamato a nível pré-sináptico, sendo dependente da idade dos animais e da concentração do composto (Souza et al., 2010)

O composto (PhSe)₂ associado ao estradiol e o 4-phenyl-1-(fenilselanilmetil)-1,2,3-triazol (Se-TZ) apresentaram um efeito farmacológico em potencial contra o prejuízo cognitivo e depressão, respectivamente (DA ROCHA et al., 2013; DONATO et al., 2013).

O composto [(MeOPhSe)₂] demonstrou efeito terapêutico em modelo de doença de Alzheimer desenvolvido com estreptozotocina em ratos (PINTON et al., 2013a), demonstrando uma atividade neuroprotetora tanto *in vivo* quanto *in vitro*, reafirmando, assim, sua potencial utilização em doenças neuronais (PINTON et al., 2013b). Outro composto com potencial efeito farmacológico é o bis seleneto, já que atenuou o déficit de memória induzida por reserpina em ratos e também demonstrou efeitos protetores contra a doença de Huntington (BORTOLATTO et al., 2013a; BORTOLATTO et al., 2013b).

Em relação ao C₂₁H₂HOSe, Mello e colaboradores (2012) demonstraram que este composto diminuiu a atividade da creatina quinase (CK) no córtex cerebral e cerebelo. Já Medeiros e colaboradores (2012) demonstraram que esse composto foi capaz de induzir estresse oxidativo em diferentes regiões do cérebro

Como pôde ser observado, vários modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* são utilizados para o estudo de compostos de Se no SNC. Deste modo, o modelo de fatias de córtex cerebral foi utilizado nesse trabalho, uma vez que é um modelo bem estabelecido e que preserva a interação entre os neurônios e células da glia, permitindo assim determinações enzimáticas mais precisas (MORETTO et al., 2007). Além disso, o córtex cerebral é responsável por diversas funções complexas como: memória, atenção, linguagem e consciência, sendo rico em neurônios.

2.3 Radicais Livres

Os RL são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos, apresentando em sua órbita mais externa um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Esses podem atuar como mediadores para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas, desempenhando funções bastante relevantes no metabolismo. Entretanto, também podem reagir com as estruturas celulares biológicas e possuir efeitos deletérios. As principais fontes de RL são organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro, podendo gerar uma grande quantidade de metabólitos (MENDEZ FILHO; RODRIGUEZ, 1997).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem pelo menos um elétron desemparelhado que se encontra centrado no átomo de oxigênio (VISIOLI; KEANEY-JÚNIOR; HALLIWELL, 2000). Os principais EROs são: hidroxila (OH^\cdot), superóxido (O_2^\cdot), peróxila (ROO^\cdot) e alcóxila (RO^\cdot) (VISIOLI; KEANEY-JÚNIOR; HALLIWELL, 2000). Já as espécies reativas ao nitrogênio (ERNs) possuem elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio (PIETTA, 2000). Dentre as ERNs incluem-se óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO).

O NO é considerado um mensageiro neuronal universal na fisiopatologia de doenças como Alzheimer, Parkinson e no acidente vascular cerebral (IKONOMIDOU; TURSKI, 1995). Apesar do seu mecanismo de neurotoxicidade ainda não estar totalmente compreendido, o NO tem sido utilizado *in vitro* para promover a indução da lipoperoxidação em estudos envolvendo o SNC (BATES et al., 1990; HUGHES et al., 2014). O NO em altas concentrações pode interagir com ânion superóxido e formar um potente oxidante, o peroxinitrito, que pode mediar a transferência de elétrons que produzem RL, iniciando assim o processo de lipoperoxidação (BECKMAN et al., 1993; CROW; BECKMAN, 1996). O peroxinitrito pode reagir com moléculas e proteínas de baixo peso molecular com tióis vinculados, resultando na oxidação desses tióis (KAROUI et al., 1996; QUIJANO et al., 1997).

O nitroprussiato de sódio (NPS) é uma fonte da geração de NO, já que forma esse metabólito ativo através da degradação espontânea no organismo e em

condições fisiológicas normais (BARRY, 1989; ZIAI; MIRSKI, 2004). O NPS é um nitrovasodilatador descoberto em 1850, capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica, cujos efeitos hipotensores em seres humanos foram descritos pela primeira vez em 1929. O nível aumentado de quaisquer espécies de RL, associado a alterações nos níveis de antioxidantes, desenvolve o processo denominado estresse oxidativo (MATES; SANCHES- JIMENEZ, 1999).

2.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio nas defesas antioxidantes do organismo ou um favorecimento das pró-oxidantes, sendo potencialmente nocivo (SIES, 1986; THOMAS, 1994). A escolha do alvo celular dos RL, que podem ser as proteínas, os lipídeos, os carboidratos ou o DNA, está relacionada com seu sítio de formação (YU; ANDERSON, 1997) (Figura 2). O estresse oxidativo tem sido implicado em várias doenças, como nas cardiovasculares e neurodegenerativas, no câncer e no processo de envelhecimento (KOVACIC; JACINTHO, 2001; VALKO et al., 2007).

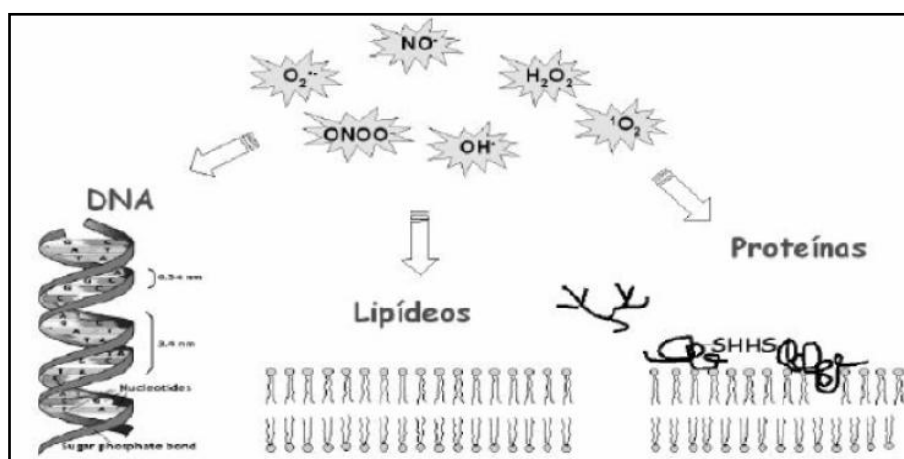


Figura 2 – Dano oxidativo em macromoléculas.

Fonte: adaptado de TORRES, 2006.

Existem mecanismos de defesa frente ao estresse oxidativo que podem ser enzimáticos e não-enzimáticos. Os mecanismos enzimáticos compreendem enzimas como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), GPx e glutathione redutase (GR). Já como mecanismos não-enzimáticos, provenientes da dieta, compreende-se o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (provitamina A), compostos fenólicos e flavonoides. Também existem as proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e grupo de tióis não-proteicos (NP-SH), sendo que esse último apresenta capacidade antioxidante devido à presença de grupamento tiol (SH) reativo, tendo como principal representante a glutathione.

Quando os RL reagem com ácidos graxos insaturados, ocorre o processo de lipoperoxidação, modificando os lipídeos de tal forma que a membrana perde suas características arquitetônicas, tornando-se menos firme e menos flexível. Esse processo cria verdadeiras fendas iônicas que alteram a semipermeabilidade da membrana, favorecendo a entrada e saída indiscriminada de metabólitos e detritos da célula, provocando sua ruptura e lise com posterior necrose (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000; ALMROTH et al., 2005). O processo de lipoperoxidação gera produtos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). A literatura evidencia a relação entre os níveis de MDA, ou da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como um dos métodos de avaliação da intensidade do processo de lipoperoxidação (RICE- EVANS et al., 1991; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

2.4.1 Estresse oxidativo, compostos de selênio e o cérebro

O cérebro é o alvo preferencial do processo oxidativo, pois contém uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; LIANG et al., 2000). Além disso, o cérebro apresenta alto consumo de oxigênio, alto fluxo sanguíneo e alta concentração de neurotransmissores, que podem sofrer oxidação, e tem no metabolismo oxidativo da glicose sua principal fonte de energia (CLEMENS; PENETTA, 1995). Também possui neurônios com grandes prolongamentos, sob os quais altos gradientes iônicos devem ser mantidos para as

funções normais. Todas essas características aumentam ainda mais a predisposição do cérebro ao ataque dos RL (CLEMENS; PENETTA, 1995).

Os estudos sobre o Se merecem considerável atenção, principalmente pela capacidade antioxidativa desse metaloide. Dentre eles, o composto inorgânico de Se, o selenito de sódio, protegeu parcialmente contra a toxicidade do ácido quinolínico em modelo de doença de Huntington (SANTAMARIA et al., 2003). Também, em ratos tratados com selenito de sódio, houve diminuição da lipoperoxidação, aumento da atividade da GPx e impedimento parcial das alterações morfológicas neuronais. (SANTAMARÍA et al., 2003). O composto (NapSe)₂ em um modelo de lesão cerebral através da indução por álcool, restaurou as defesas antioxidantes no cérebro desses ratos e atenuou os efeitos tóxicos do álcool (IBRAIN et al., 2012).

O composto (E)-1-(1-(metiltio)-1-(selenofenil) hept-1-en-2-il) pirrolidina-2-um apresentou uma promissora atividade antioxidante, além de baixa toxicidade, sugerindo uma potencial atividade benéfica desse composto (INEU et al., 2012). Estudo recente demonstrou a influência de grupos substituintes na atividade antioxidante de β-selenoaminas e verificou que esses grupos podem apresentar diferentes atividades antioxidantes (PRESTES et al., 2012).

Por outro lado, o composto 2,2'- ditienil diseleneto demonstrou ser um potencial oxidante. *In vitro*, em homogenato de cérebro de ratos, ele foi capaz de inibir enzimas sulfidrílicas, provavelmente por oxidar grupamentos tióis. Já *in vivo*, causou uma toxicidade sistêmica resultando na morte dos animais (CHAGAS et al., 2013a).

Medeiros e colaboradores (2012) testaram a atividade do composto C₂₁H₂HOSe nas concentrações de 125, 250 e 500µg/kg, durante 30 dias, em diferentes áreas do cérebro de ratos (córtex, cerebelo e hipocampo). Os autores observaram que o composto não foi capaz de alterar os níveis de grupos carbonil no córtex cerebral, embora tenha aumentado os níveis de TBARS nessa estrutura. Esse composto reduziu o conteúdo de sulfidril e a atividade da enzima GPx em todas as estruturas testadas. A enzima CAT aumentou sua atividade no córtex cerebral e cerebelo, enquanto que no hipocampo a atividade da SOD diminuiu.

Além disso, é importante destacar que o composto C₂₁H₂HOSe apresenta um átomo de Se ligado a dois átomos de carbono, com hibridização sp² e com número

de oxidação zero, sendo assim, menos suscetível à oxidação (GEMELLI et al., 2011). Em outros compostos com propriedade antioxidante, como o Ebselen, o átomo de Se está ligado a um único carbono, com a mesma hibridização, mas sua outra ligação é feita com o átomo de nitrogênio, gerando uma maior eletronegatividade e formando uma grande atração dos elétrons para ligações sigma, deixando os átomos de Se mais oxidados, perdendo elétrons com maior facilidade (NOGUEIRA et al., 2004). Quando comparado com o $C_{21}H_2HOSe$, o Ebselen é um melhor antioxidante.

Estudos anteriores demonstram que alguns compostos orgânicos de Se têm a capacidade de oxidar proteínas sulfidrílas e assim produzir espécies reativas (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004). De fato, recentemente estudos revelaram que um grupamento imina próximo ao átomo de Se pode aumentar a atividade catalítica de sistemas com o tiól aromático. A oxidação dos tióis reflete a toxicidade dos compostos, no entanto o composto formado por uma imina no composto organoselênio não foi capaz de aumentar os níveis de TBARS, transaminases, ureia, creatinina e ácido ascórbico, demonstrando a versatilidade desses compostos (HASSAN et al., 2011).

2.5 Sistema purinérgico

2.5.1 Adenosina

O sistema purinérgico é caracterizado por ser uma via de sinalização importante, estando envolvido em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta/longa duração, incluindo resposta imune, inflamação, proliferação e morte celular. Os nucleotídeos extracelulares de adenina adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e o nucleosídeo adenosina são considerados importantes moléculas sinalizadoras (ILLES; RIBEIRO, 2004).

A adenosina, um importante componente do sistema purinérgico, é um ribonucleosídeo constituído por uma base púrica (adenina) ligada a uma pentose (D-

ribose), estando envolvida em funções cruciais no SNC, como neuromodulação da transmissão sináptica e neuroproteção (FREDHOLM et al., 2005). De modo geral, a adenosina atua como um mensageiro intercelular, embora não seja considerada um neurotransmissor clássico (BRUNDEGEE; DUNWIDDIE, 1996). Sob condições normais, ela é continuamente formada tanto intracelularmente quanto extracelularmente (FREDHOLM, 2002). Entretanto, em locais de dano tecidual é produzida em altas concentrações, desempenhando importante papel na regulação da homeostase de muitos sistemas fisiológicos, incluindo cardiovascular (vasodilatação e diminuição da pressão sanguínea), nervoso (regulação da liberação de neurotransmissores), renal e imune (BLACKBURN, 2003). Além disso, produz inibição da lipólise, broncoconstrição e citoproteção em episódios de isquemia e hipóxia ou de estresse oxidativo (VAN DER GRAAF et al., 1999; FAN et al., 2003).

As ações que a adenosina desenvolve no SNC são mediadas através de receptores específicos, pertencentes a uma classe específica de receptores denominada receptores purinérgicos P1, os quais são acoplados a adenilato ciclase via proteína G (KLINGER; FREISSMUTH; NANOFF, 2002). Esses receptores são classificados como receptores A1, A2 (A2a, A2b) e A3 (BURNSTOCK, 2007). De forma geral, os receptores A1 e A2a são receptores de alta afinidade pelo ligante, enquanto o A2b apresenta baixa afinidade e o A3, embora de alta afinidade não é muito expresso nos tecidos cerebrais (DUNWIDDIE; MASINO, 2001).

A principal via de produção de adenosina (Figura 3) no meio extracelular vem da atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase (5' NT), que converte 5'-monofosfato de adenosina (5'-AMP) em adenosina. Por sua vez, o 5'-AMP pode ser proveniente de duas fontes, isto é, da conversão de nucleotídeos ou pela liberação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). O AMPC é liberado pelas células por um transportador e convertido no meio extracelular em 5'-AMP por uma ecto-fosfodiesterase, a 5' NT (BRUNTON; MAYER, 1979; HENDERSON; STRAUSS, 1991). Outra via já descrita para a produção de adenosina ocorre por hidrólise de S-adenosilhomocisteína (SAH) pela S-adenosilhomocisteína hidrolase (LLOYD et al., 1988). Entretanto, essa via não possui uma grande importância na produção deste nucleosídeo (PAK et al, 1994). A regulação dos níveis de adenosina ocorre através do seu transporte bi-direcional. A remoção de adenosina extracelular é dada em parte pela recaptação através do transportador bidirecional, seguida por sua

fosforilação à AMP pela enzima adenosina quinase, e em parte por sua degradação à inosina pela ADA. Já no meio extracelular ela é metabolizada pela ecto-ADA (LATINI; PEDATA, 2001).

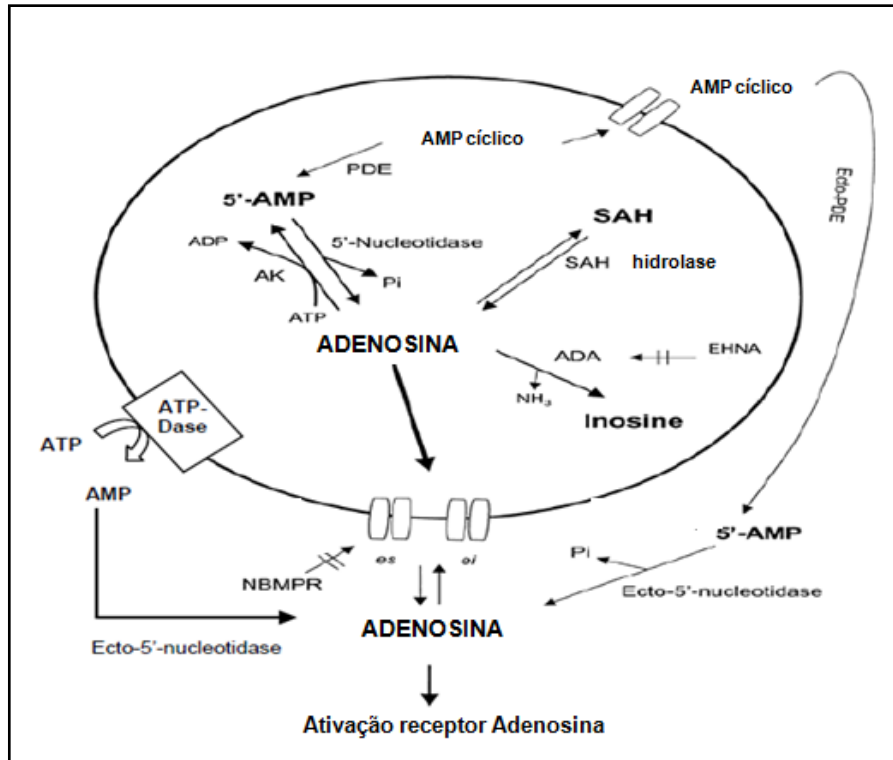


Figura 3 – Vias de síntese, degradação e recaptção da adenosina

Fonte: adaptado de LATINI; PEDATA, 2001.

Os metabólitos da adenosina são: inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico, esse último excretado através da urina (TRAMS; LAUTER, 1974; LOGUERCIO et al., 1996; BOROWIEC et al, 2006).

2.5.2 Adenosina deaminase (ADA, adenosina aminohidrolase, E.C. 3.5.4.4)

A ADA é uma enzima envolvida no metabolismo de nucleotídeos de purina (Figura 4). Ela catalisa a desaminação hidrolítica irreversível da adenosina em inosina e 2'-desoxiadenosina em 2'-desoxinosina (IWAKI- EGAWA et al., 2004; ÍBIS et al., 2007).



Figura 4 – Estrutura da enzima adenosina deaminase.

Fonte: adaptado de KINOSHITA et al., 2005.

Essa enzima está presente em plantas, bactérias, invertebrados, vertebrados e mamíferos (AIKAWA et al., 1977; DADDONA, 1981; LUPIDI et al., 1992), sendo que sua quantidade difere entre os tecidos humanos.

Altos níveis de ADA são encontrados no sistema linfoide (linfonodos, baço, timo), sendo demonstrada importante atividade dessa enzima em linfócitos e macrófagos (GORGUNER et al., 2000), além de possuir importante papel na regulação do sistema imune. Cerca de 90% da ADA é intracelular, podendo também ser encontrada na superfície de linfócitos T, como uma ecto-enzima (Ecto-ADA) complexada com a dipeptidil peptidase IV (DPP IV, CD26, E.C 3.4.14.5) (MORRISON et al., 1993; BLANCO et al., 1998; FRANCO et al., 1998).

No SNC, a ADA ocorre principalmente no citosol, podendo ser encontrada em neurônios e sinaptossomas, mas também na superfície externa de células (FRANCO

et al., 1998). Sua atividade é mais proeminente na glia, podendo ser encontrada em vesículas sinápticas (RATHBONE et al., 1999). Considerando a importância da adenosina no SNC, a ADA tem sido objeto de interesse devido ao seu papel na manutenção dos níveis intra e extracelular desse nucleosídeo de adenina.

Duas isoenzimas distintas da ADA, ADA1 e ADA2, têm sido bem caracterizadas. Em tecidos como fígado, rins e intestino encontram-se ambas as formas (IWAKI- EGAWA et al., 2004). A ADA1 existe em duas formas moleculares principais, um monômero, de peso molecular 35KDa (forma pequena) e um dímero, complexado com proteínas, tendo um alto peso molecular (280KDa). Essa é encontrada em todas as células, especialmente em linfócitos e monócitos (VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1979), enquanto que a forma de menor peso molecular encontra-se somente nos eritrócitos (IWAKI- EGAWA et al., 2004).

Já a ADA2 existe somente como um monômero com peso molecular de 100KDa estando presente em monócitos, macrófagos, soro e plasma em menor quantidade (VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1979; CRISTALLI et al, 2001; IWAKI- EGAWA et al., 2004). Devido a sua habilidade em regular a proliferação celular, a ADA2 foi considerada como parte de uma nova família de fatores de crescimento, denominada fatores de crescimento relacionados à ADA (ADGFs) (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005; ZHANG; TAKEDA, 2007).

2.5.3 Importância biológica

Em seres humanos, um defeito congênito da ADA1 acarreta a Síndrome de Imunodeficiência Combinada Severa (SCID), que se caracteriza pela perda de função de células T e B (PACHECO et al., 2005), provocando uma grave linfopenia. Além disso, a dosagem da atividade da ADA no líquido pleural e cefalorraquidiano é um método sensível e específico para o diagnóstico da tuberculose, mononucleose infecciosa e meningite (GORGUNER; CERCI; GORGUNET, 2000; CRISTALLI et al., 2001; TITARENKO et al., 2006; CARGNELUTTI et al., 2013). Essa enzima se relaciona com o fato de sua atividade estar elevada em doenças caracterizadas pela proliferação de linfócitos T, sendo também um marcador inespecífico de ativação

dessas células (IBIS et al., 2007). Está também aumentada no diabetes, tuberculose, meningite bacteriana, na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) entre outras (CRISTALLI et al., 2001; PRAKASH et al., 2006).

Em nosso laboratório, diversos estudos têm reportado sobre a alteração da atividade dessa enzima em diferentes condições, tecidos e células. Em intoxicações por diferentes concentrações de MeHg, ocorre um aumento na atividade da ADA não somente no hipocampo, como também no fígado e nos rins de ratos recém nascidos (ABDALLA et al., 2011; ABDALLA et al., 2012). Bellé e colaboradores (2009), demonstraram que a atividade da ADA no córtex total é maior em ratos mais jovens (7 dias) quando comparada com ratos de 60 dias. Um estudo com ratos infectados com o parasita *Trypanosoma evansi*, demonstrou que a atividade ADA encontra-se alterada no tecido cerebral, plaquetas, linfócitos e soro desses animais (DA SILVA et al., 2011a; DA SILVA et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011).

A ADA também foi investigada na Síndrome Metabólica (MetS), onde os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo de pacientes com MetS na atividade da ADA no soro (DE BONA et al., 2012). No entanto, em linfócitos foi encontrado um aumento na atividade da ADA (DE BONA et al., 2013). Em pacientes diabéticos, a atividade dessa enzima encontra-se aumentada nos eritrócitos, linfócitos e soro quando comparada com o grupo controle (BELLÉ et al., 2011b; DE BONA et al., 2011; BELLÉ et al., 2012). Em modelo de hipóxia-isquemia neonatal, a atividade da ADA encontrou-se aumentada no córtex cerebral e no hipocampo de ratos em desenvolvimento (PIMENTEL et al., 2009. PIMENTEL et al., 2011).

2.6 Ensaios para avaliar a viabilidade celular

Existem vários métodos que são utilizados para avaliar a viabilidade celular nas mais diversas condições. Dentre esses métodos, podemos destacar a determinação da lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27) e o método do MTT.

2.6.1 Lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27)

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima sulfidrílica citosólica, que em situações de lise celular é extravasada, apresentando máxima atividade no período de 1 h após isquemia-reperusão tecidual, e tende a se estabilizar nos períodos subsequentes (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al. 2005). A LDH converte, de forma reversível, piruvato a lactato, fazendo parte da via anaeróbia da última etapa da glicólise (PAPOTI et al., 2008).

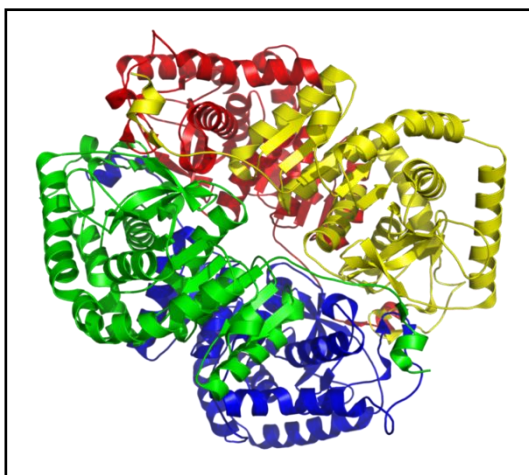


Figura 5 – Estrutura da enzima lactato desidrogenase.

Fonte: adaptado de READ et al., 2001.

Essa enzima é encontrada em vários órgãos como coração, fígado, músculo esquelético, rim, cérebro e pulmões, bem como em células vermelhas e tecido linfóide. Valores elevados de LDH total são observados em uma variedade de condições clínicas, como por exemplo: infarto do miocárdio, infarto pulmonar, hepatite, cirrose, icterícias obstrutivas, distrofia muscular, anemias, doenças do parênquima renal, tumores, acidente vascular cerebral, entre outras (MOTTA, 2000).

Devido a sua distribuição diversificada pelos tecidos, a dosagem da LDH total não é um indicador específico de doenças. Porém, quando determinada conjuntamente com outras enzimas, ou quando fracionada em isoenzimas, torna-se bastante útil para o diagnóstico dessas patologias (MOTTA, 2000), tanto que a

proporção das isoformas tem sido proposta como alternativa para indicar o estado metabólico das células (KADE et al., 2009b). Ainda, existem diversos relatos na literatura nos quais a dosagem de LDH total é bastante utilizada para avaliar a injúria celular (AMARA et al., 2009; KADE et al., 2009b; KADE et al., 2009c; PENZ et al., 2011).

A LDH possui cinco isoenzimas, sendo que todas as isoformas contêm zinco como componente funcional do local ativo (VALLEE E WACKER, 1956), e pode ser inibida por reagentes que interagem com suas porções sulfídrilas (NEILANDS, 1954). A LDH1 é encontrada mais predominantemente no coração, hemácias e rins; a LDH2 no coração e sistema retículo endotelial; a LDH3 nos pulmões e outros tecidos; a LDH4 na placenta e no pâncreas; e a LDH5 no fígado e nos músculos esqueléticos (MOTTA, 2000). Em doenças do SNC, como meningites e tumores malignos há aumento nas frações LDH2 e LDH3. (MOTTA, 2000).

2.6.2 Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol- 2- il)- 2,5-difeniltertrazolim (MTT)

Os sais de tetrazólio são um grande grupo de compostos heterocíclicos orgânicos que após a redução, muitas vezes, formam produtos coloridos e insolúveis (LIU et al., 1997). O teste de viabilidade de MTT é um ensaio quantitativo *in vitro* que avalia a função das mitocôndrias baseando-se na redução enzimática de um sal de tetrazólio (LIU et al., 1997). Baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5 difeniltetrazolio, que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, de cor púrpura.

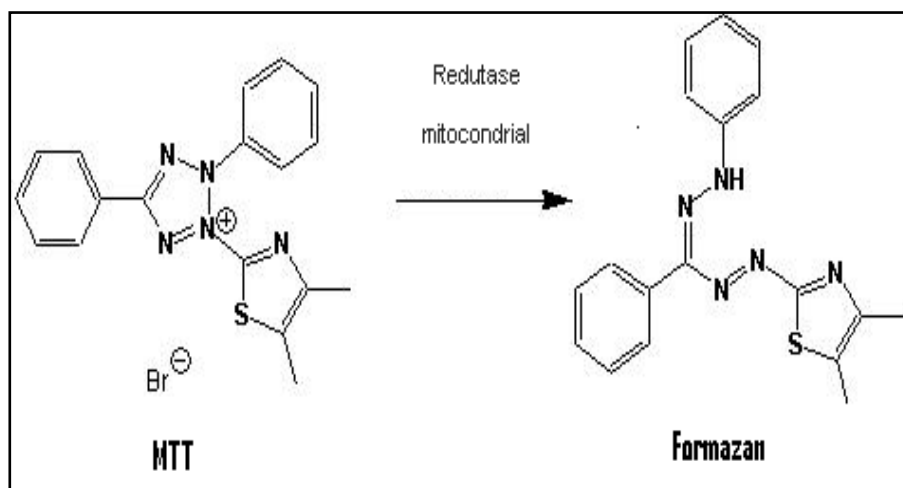


Figura 6 – Redução do MTT.

Fonte: adaptado de BRESCIA; BANKS, 2009.

A redução do sal de tetrazólio é capaz de verificar a viabilidade e o estado metabólico da célula, por isso, sendo bastante útil para avaliar citotoxicidade (LIU et al., 1997, GHISLENI et al., 2003; BEZERRA et al., 2005; MORETTO et al., 2007; BEZERRA et al., 2008).

Assim, tendo em vista o crescente interesse por compostos organocalcogênicos, principalmente por aqueles que apresentam em sua estrutura uma molécula de Se, e as importantes atividades farmacológicas que esses compostos têm apresentado, este trabalho visa realizar um estudo comparativo sobre os efeitos de um novo composto orgânico de Se, o 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno)oct-2-en-1-um e um composto inorgânico de Se, o selenato de sódio, sobre parâmetros enzimáticos, de viabilidade celular e de estresse oxidativo em fatias de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo geral verificar os efeitos da exposição de diferentes concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos de selênio sobre parâmetros bioquímicos e de viabilidade celular em fatias de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Em fatias, expostas a diferentes concentrações de Se orgânico e inorgânico, de córtex de ratos jovens:

- Determinar a atividade da enzima ADA;
- Determinar parâmetros de estresse oxidativo como: níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de tióis não-proteicos (NP-SH);
- Determinar a viabilidade celular através da determinação da atividade da enzima LDH e pelo método do MTT.
- Avaliar a capacidade dos compostos de Se orgânico e inorgânico em sequestrar radicais NO em sistema livre de células, *in vitro*.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Differential effects of organic and inorganic selenium compounds on adenosine deaminase activity and scavenger capacity in cerebral cortex slices of young rats.

Publicado na revista *Human and Experimental Toxicology*¹
(Online ISSN: 1477-0903, Qualis B1-Farmácia).

¹ A licença para inclusão do artigo nessa dissertação encontra-se no anexo A

Differential effects of organic and inorganic selenium compounds on adenosine deaminase activity and scavenger capacity in cerebral cortex slices of young rats

PER Bitencourt¹, LP Bellé², G Bonfanti², LO Cargnelutti¹,
KS de Bona², PS Silva², FH Abdalla¹, RA Zanette², RB Guerra³,
C Funchal⁴ and MB Moretto^{1,2}

Abstract

Selenium (Se) has anti-inflammatory and antioxidant properties and is necessary for the development and normal function of the central nervous system. This study was aimed to compare the *in vitro* effects of 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one (C₂₁H₂HOSe; organoselenium) and sodium selenate (inorganic Se) on adenosine deaminase (ADA) activity, cell viability, lipid peroxidation, scavenger of nitric oxide (NO) and non-protein thiols (NP-SH) content in the cerebral cortex slices of the young rats. A decrease in ADA activity was observed when the slices were exposed to organoselenium at the concentrations of 1, 10 and 30 μ M. The same compound showed higher scavenger capacity of NO than the inorganic compound. Inorganic Se was able to protect against sodium nitroprusside-induced oxidative damage and increased the NP-SH content. Both the compounds displayed distinctive antioxidant capacities and were not cytotoxic for the cerebral cortex slices in the conditions tested. These findings are likely to be related to immunomodulatory and antioxidant properties of this compound.

Keywords

Selenium, adenosine, cerebral cortex slices, lipid damage, scavenger

Introduction

In the last decade, there has been increasing interest in several nutritional selenium (Se) compounds because of their environmental, biological and toxicological properties, and particularly for their cancer- and disease-preventing activities. Regulation of Se levels is important in balancing the detrimental effects of both Se toxicity and deficiency.^{1,2} Se is an essential trace element with a number of biological roles, for humans, animals and some bacteria.^{3,4} As a constituent of selenoproteins, it plays a role in the protection of body tissues against oxidative stress, immune function, reproduction, growth and development modulation.⁴ The brain is resistant to fluctuations in Se levels, including during conditions of dietary depletion of Se. Therefore, brain Se levels are maintained, whereas levels elsewhere in the body are reduced,

suggesting that this trace mineral is essential for normal brain function.^{5,6} However, the central nervous

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Postgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul, Sertão, RS, Brazil

⁴Postgraduate Program in Biosciences and Rehabilitation, Methodist University Center, IPA, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Maria Beatriz Moretto, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center for Health Sciences, Federal University of Santa Maria – UFSM, Roraima Avenue 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

Email: beatriz.moretto@yahoo.com.br

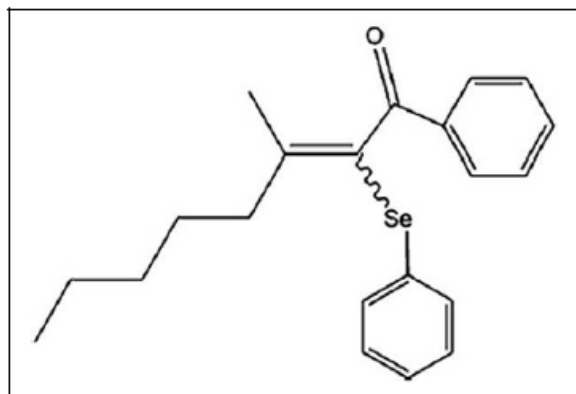


Figure 1. Chemical structure of 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one (organoselenium).

system (CNS) is sensitive to Se poisoning, and differences in neurotoxicity between inorganic and organic Se have been demonstrated.⁷

Se-containing organic molecules are generally more potent antioxidants than 'classical' antioxidants, which is an impetus for the increased interest in the rational design of synthetic 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one ($C_{21}H_{24}HOSe$; organoselenium) compounds.^{8,9} Previous reports have been published on the glutathione peroxidase mimetic activity of chalcogen compounds, which, such as the native enzyme, relies on the redox cycling of the Se moiety of the compounds.^{10,11} Organochalcogens are important intermediates and useful reagents in organic synthesis, which can increase human exposure risk to these chemicals in the workplace.^{12,13}

The organoselenium (Figure 1) is an α,β -unsaturated ketone-functionalized vinyl chalcogenide that has been found as a potential tool in organic synthesis. Vinylic compounds are important synthetic intermediates because of their easy transformation into other organic compounds with retention of configuration.^{14,15}

Several lines of investigations on the cellular metabolism of purines in peripheral tissues have generated considerable interest in adenosine deaminase (ADA; E.C. 3.5.4.4), an enzyme involved in purine metabolism that catalyzes the hydrolytic deamination of adenosine or 2'-deoxyadenosine to inosine or 2'-deoxyinosine.¹⁶ ADA is one ubiquitous, soluble and globular enzyme that can be found at variable amounts in all cell types present in the CNS.¹⁷ Therefore, ADA has been a subject of interest due to its role in the maintenance of intra- and extracellular levels of adenosine. Congenital deficiency of ADA causes severe

combined immunodeficiency, which is characterized by the absence of functional T and B lymphocytes.¹⁸ Conversely, increased ADA activities have been observed in diseases such as brucellosis, tuberculosis, rickettsiosis, human immunodeficiency virus and infectious mononucleosis as well as in a variety of malignant conditions.¹⁹

Reactive oxygen species are currently produced during cellular metabolism. Among these, nitric oxide (NO) is regarded as a universal neuronal messenger in the pathophysiology of Alzheimer's and Parkinson's diseases and disorders such as stroke, trauma and seizure.^{20,21} NO has been used *in vitro* to promote NO-induced lipid peroxidation.²² It can mediate biological actions ranging from vasodilatation, neurotransmission, inhibition of platelet adherence and aggregation and killing of pathogens mediated by macrophages and neutrophils.²³ However, high concentrations of NO are toxic and interact with superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) to form peroxynitrite ($ONOO^-$), a strong oxidant that forms another potent oxidant with the reactivity of a hydroxyl-like radical, which could initiate lipid peroxidation.^{24,25}

The rationale for the study of organic and inorganic Se compounds resides in the fact that this element is essential for normal brain function and displays specific roles for developing brain. As organoselenium and inorganic Se compounds might have different neurotoxic behavior, the purpose of the present study was to investigate the *in vitro* effects of an organic and an inorganic form of Se on ADA activity and cell viability in cerebral cortex slices of young rats, which preserve the interaction between neurons and glia. Considering that oxidative stress is involved in neurochemical changes in the developing cerebral cortex, the total antioxidant capacity and lipid peroxidation of both the compounds were also examined.

Materials and methods

Chemicals

Adenosine was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium selenate (Na_2SeO_4 ; inorganic Se), malonaldehyde bis (dimethyl acetal), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), sodium nitroprusside (SNP), sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and thiobarbituric acid were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, Missouri, USA). Organoselenium was synthesized according to Silveira et al.²⁶ All other chemicals were

of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

Preparation of cerebral cortex slices

The study was in accordance with the guidelines of the Ethics Committee for Animal Research of this institution, which approved the experimental protocol (number 23081.007418/2007-75). Newly born male Wistar rats were maintained on a 12:12 h light/dark cycle at 24°C. The rats ($n = 8$) were euthanized at day 7 (P7) and their brains were promptly removed and the cerebral cortices were carefully separated. The slices were cut to have a weight of approximately 5 mg and washed twice with phosphate buffer (50 mmol/L, pH 7.0) before using in the experimental analyses, according to Oyama et al.²⁷ with modifications. The organoselenium (1, 10 and 30 μM) or inorganic Se (1, 10 and 30 μM) was added in the phosphate buffer and the reactions were carried out for 1 h at 37°C, according to Bellé et al.²⁸

Experimental assays

Enzymatic assays. ADA activity was estimated spectrophotometrically by the method of Giusti,²⁹ which is based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when ADA acts in excess of adenosine. Ammonium sulfate solution (75 μM ammonia) was used as the standard. The values were expressed as unit per liter per milligram of tissue.

The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was immediately measured using a commercial kit (Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil). The results were expressed as unit per liter per milligram of tissue.

Parameters of oxidative stress

Measurement of lipid peroxidation. Lipid peroxidation in the cerebral cortex slices was estimated by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, as described by Niehaus and Samuelsson.³⁰ First, the slices were incubated with organoselenium (1, 10 and 30 μM) or inorganic Se (1, 10 and 30 μM) in phosphate buffer (50 mmol/L, pH 7.0) for 1 h at 37°C. Thereafter, the slices were homogenized in Tris-hydrochloric acid buffer, centrifuged at 4000 g and 0.1 mL of the obtained supernatant (S1) was used in the assay.³¹ In a second step, SNP (50 μM) was added to the reaction mixture for 1 h at room temperature.³² The above concentrations of the Se compounds were added to the mixture that was incubated for 1 h more before the TBARS levels were

measured. At the end of the incubation time, the lipid peroxidation assay was carried out as mentioned above. Calculations were made based on standard curves and presented as nanomoles of malondialdehyde per milligram of protein.

Determination of NP-SH level. Nonprotein thiol (NP-SH) levels in the rat cerebral cortex slices were determined according to the method proposed by Ellman and Boyne,³³ with some modifications by Jacques-Silva et al.³⁴ A sample of S1 (300 μL) was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid and subsequently centrifuged at 4000 g for 10 min. After centrifugation, the supernatant fraction was added to a reaction medium containing potassium phosphate (0.5 M and pH 7.4) and DTNB (0.5 mM). NP-SH levels were measured spectrophotometrically at 412 nm. The results were calculated in relation to a standard curve constructed with reduced glutathione and also corrected by the protein content.

Assay of NO-scavenging activity. The procedure is based on the principle that SNP in aqueous solution at physiological pH spontaneously generates NO. For the experiment, SNP (10 mM) was mixed with the different concentrations of the Se compounds and incubated at room temperature for 150 min. The same reaction mixture, without the compounds but with an equivalent amount of water, served as the control. After the incubation period, 0.5 mL of Griess reagent (1% sulfanilamide, 2% phosphoric acid and 0.1% *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride) was added. The NO generated interacts with oxygen to produce nitrite ions that can be estimated using this reagent.³⁵ NO scavengers compete with oxygen, leading to reduced production of nitrite ions. The absorbance of the chromophore formed was read at 546 nm.³⁶ The NO-scavenging activity was given by the following equation

$$\text{NO - scavenging activity(\%)} \\ = (1 - \text{absorbance}_{\text{sample}} / \text{absorbance}_{\text{control}}) \times 100$$

Cell viability

Tetrazolium salt method (MTT assay). The viability assay was performed by the colorimetric MTT method. This assay for cell survival is an indirect method, where MTT is reduced by active mitochondria in living cells. The tetrazolium salt is metabolically reduced to a colored formazan type of final product.³⁷ The cerebral cortex slices were incubated

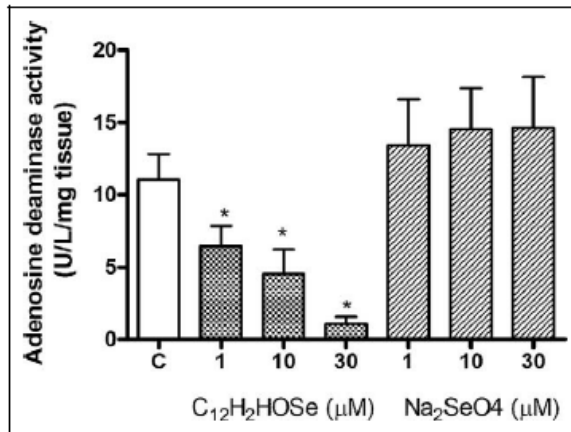


Figure 2. ADA activity after exposure of cerebral cortex slices of young rats ($n = 8$) to organoselenium and inorganic Se compounds. Data are expressed as unit per liter per milligram of tissue (mean \pm SEM). Asterisk indicates significant differences from control ($p < 0.001$, one-way ANOVA followed by Tukey's test). ADA: adenosine deaminase; ANOVA: analysis of variance; Se: selenium.

in the presence or absence of the above concentrations of organoselenium or inorganic Se for 1 h at 37°C. Immediately after preincubation, 1.2 mM of MTT was added to the medium containing the slices followed by 1 h incubation at 25°C. The formazan product generated during incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide and quantified spectrophotometrically at 560 nm.³⁸ Only viable slices are able to reduce MTT; thus, each value obtained is proportional to the percentage of viable cells. The value of the control was considered as 100%.

Protein quantification. Protein concentration was measured by the method of Lowry *et al.*,³⁹ using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

The results were analyzed by one-way analysis of variance for multiple group comparison. Post hoc analysis was carried out using Tukey's multiple range test. Data are shown as mean \pm SEM. Values of $p < 0.05$ were regarded as statistically significant.

Results

The present study demonstrated that ADA activity (Figure 2) was reduced in the cerebral cortex slices exposed to the organoselenium compound. However, this effect was not observed when the slices were

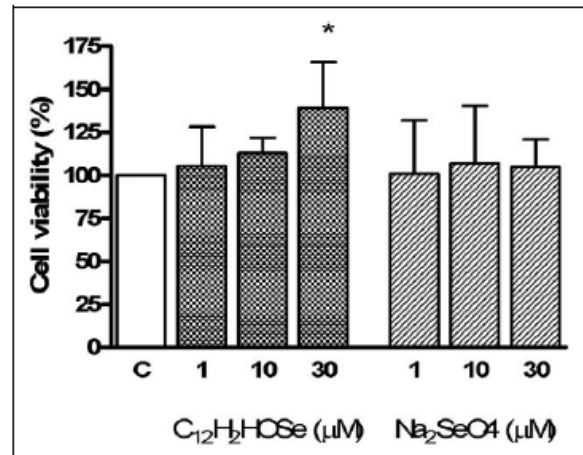


Figure 3. MTT assay in cerebral cortex slices of young rats ($n = 8$) after exposure to organoselenium and inorganic Se compounds. Results are expressed as percentage of viable cells (mean \pm SEM). Asterisk indicates significant differences from control ($p < 0.01$, one-way ANOVA followed by Tukey's test). ANOVA: analysis of variance; Se: selenium; MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.

exposed to the inorganic Se in the same experimental conditions. The MTT assay showed that the organoselenium compound at the concentration of 30 µM caused a significant increase in cell viability in the cerebral cortex slices ($p < 0.05$; Figure 3). Notwithstanding, this parameter was not altered in the presence of the inorganic Se. Moreover, no difference in LDH activity was observed after the exposure of the cerebral structure to both Se compounds (Table 1).

When the rat cerebral cortex slices were exposed to both compounds alone, lipid peroxidation was maintained at a background level similar to that observed in the control samples, which demonstrates that the compounds did not promote cell damage (data not shown).

SNP (50 µM) significantly increased the lipid peroxidation in the cerebral cortex slices ($p < 0.05$). However, distinctive effects were observed when the slices were co-incubated with the different Se forms. Decreased TBARS levels were observed for the inorganic compound at all concentrations tested ($p < 0.001$), whereas the organoselenium compound did not show this protective effect (Figure 4). Furthermore, as depicted in Figure 5, NO-scavenging capacity of the organoselenium was higher than that of the inorganic Se compound.

We also investigated the status of nonenzymatic antioxidant defenses in the cerebral cortex slices after

Table 1. Effects of organic and inorganic Se compounds on LDH activity ($n = 8$).^a

	LDH activity (U/L)	
	C ₂₁ H ₂ HOSe	Na ₂ SeO ₄
C	22.8 ± 1.2	24.8 ± 3
1 μM	22.9 ± 1.4	29.6 ± 3.8
10 μM	19.2 ± 1.4	31.1 ± 2.5
30 μM	23.4 ± 1.7	30.7 ± 3.5

Se: selenium; LDH: lactate dehydrogenase; Na₂SeO₄: sodium selenate; C₂₁H₂HOSe: 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one.

^aData are expressed as mean ± SEM.

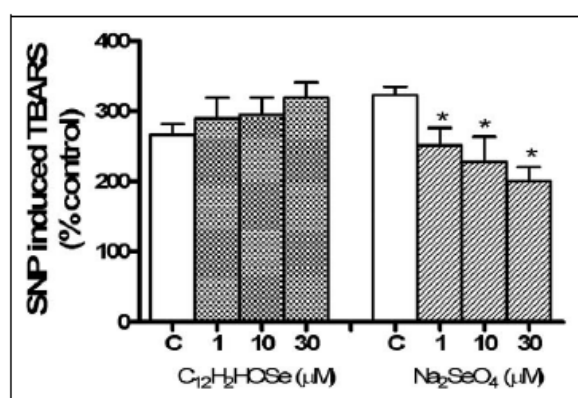


Figure 4. Effect of organoselenium and inorganic Se compounds on SNP-induced lipid peroxidation (50 μM) in cerebral cortex slices of young rats ($n = 8$). Results are expressed as percentage of control (mean ± SEM). Asterisk indicates significant differences from control ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's test). ANOVA: analysis of variance; Se: selenium; SNP: sodium nitroprusside.

incubation with the tested compounds, through the measurement of NP-SH levels (Table 2). Our experimental data showed that the exposure of the samples to the organoselenium did not change NP-SH levels. Conversely, inorganic Se was able to increase the NP-SH levels in the cerebral slices at the concentration of 30 μM ($p < 0.05$).

Discussion and conclusion

As far as we know, this is the first study to show distinctive effects of Se compounds on the ADA activity in the cerebral cortex slices of young rats. Since ADA is a sulfhydryl-containing enzyme, one could hypothesize that the decreased enzymatic activity observed is due to the chemical reaction of the organochalcogen

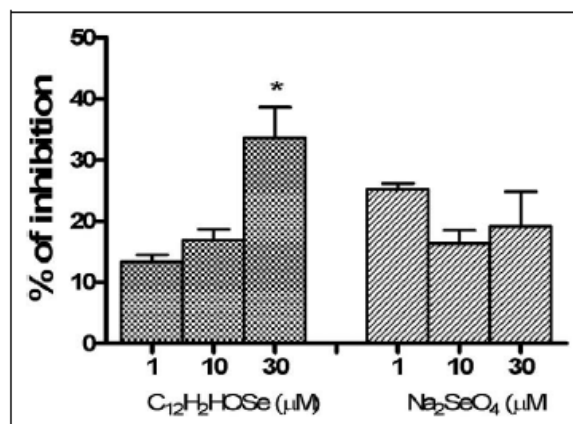


Figure 5. Nitric oxide radical-scavenging activity of Se compounds. Values are presented as mean ± SEM ($n = 3$). * indicates significant differences from control ($p < 0.01$, one-way ANOVA followed by Tukey's test). Se: selenium.

Table 2. Effects of organic and inorganic Se compounds on NP-SH ($n = 8$).^a

	NP-SH (nmol NP-SH/mg of protein)	
	C ₂₁ H ₂ HOSe	Na ₂ SeO ₄
C	30.7 ± 1.9	37.8 ± 2.2
1 μM	26.5 ± 1.5	35.9 ± 3.9
10 μM	38.9 ± 5.8	43.4 ± 4.9
30 μM	25.6 ± 2	57.1 ± 3.1*

Se: selenium; NP-SH: nonprotein thiols; Na₂SeO₄: sodium selenate; C₂₁H₂HOSe: 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one.

^aData are expressed as mean ± SEM. * indicates significant differences from control ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's test).

with the enzyme thiol groups.⁴⁰⁻⁴² However, the compound tested in this investigation did not present this property since NP-SH levels were not altered in the cerebral cortex slices. Reinforcing this idea, the activity of LDH, another thiol-containing enzyme, was also not altered by the organoselenium. Another view is that the presence of an adjacent heteroatom in close proximity to the central atom of organic compounds may possibly generate small nonbonding interactions, enhancing the reactions of thiols.^{43,44} The absence of such condition in the tested organoselenium also explains its nonreactivity with thiol groups. However, the Se atom in the Na₂SeO₄ exists in its highest oxidation state (+VI) and is hardly reactive with thiols,⁴⁵ which is likely to explain, at

least to some extent, the reason for the lack of change in the ADA activity.

The purine adenosine is an important neuromodulator, with both excitatory and inhibitory actions within the CNS.⁴⁶ This nucleoside is involved in diverse processes including locomotion, sleep and respiration and provides neuroprotection during hypoxia/ischaemia.⁴⁷ The control of adenosinergic signaling can be exerted by adenosine uptake via bidirectional transporters followed by intracellular phosphorylation of adenosine to adenosine monophosphate kinase or deamination of inosine by ADA.⁴⁸ In brain, ADA occurs in the cytosol and on the outer surface of neurons and synaptosomes, although its activity is more prominent in glia.^{49,50} Our findings are strengthened by the use of slices, thereby preserving the interaction between neurons and glia in developing rats, allowing for a more accurate determination of the ADA activity.³⁸

Furthermore, it is possible to suggest that the inhibition of ADA activity caused by the organoselenium might act in the maintenance of appropriate cellular adenine nucleoside and nucleotide concentrations in the slices assayed. These results support the previous findings from our laboratory.²⁸ In fact, these organoselenium may have immunomodulatory action since the decrease in ADA activity could favor the anti-inflammatory action of adenosine.

The results of the present study showed that only the organic compound tested improved cell viability, whereas the inorganic compound did not change the MTT assay. MTT is reduced by enzymes of the endoplasmic reticulum in reactions involving nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.^{51,52} Thus, it is likely that the organic compound could modulate the antioxidant status of the slices exposed to the compound.

In this study, we showed that the organoselenium did not cause lipid peroxidation per se and, despite the NO-scavenging capacity, the antioxidant property of the organoselenium was not enough to protect the tissue against the damage caused by SNP, which suggests that this compound is ineffective against free radicals involved in the lipid peroxidation process. However, it is important to state that the SNP concentration utilized to induce lipid peroxidation was higher (50 μM) than the organoselenium concentrations (1–30 μM). Thus, the relative lower concentration of organoselenium was likely not enough to overcome the SNP-induced oxidative damage in the brain slices.

The paradoxical effect of these compounds depends on a variety of chemical structure, dose, route and regimen of administration and animal species involved in the studies.⁵³ It has been demonstrated that organoselenium induces oxidative stress in organ homogenates from immature rats and lacks 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity.⁵⁴ Moreover, it was able to enhance lipid peroxidation in the cerebral cortex after chronic administration in rats.^{55,56} In line with this, different inorganic Se concentrations present different effects on the TBARS levels and sulfhydryl groups at distinct brain areas of young rats.^{57,58}

In summary, we demonstrated the effects of the exposure of cerebral cortex slices of young rats to Se compounds. Inorganic Se was able to protect against the SNP-induced oxidative damage, increased the NP-SH levels and was not cytotoxic for the cerebral cortex slices in the conditions tested, confirming its antioxidant capacity. The organoselenium compound improved the cellular integrity and exhibited higher NO scavenger activity than the inorganic Se. The reduction in the ADA activity observed after the exposure to the organoselenium compound could be related to immunomodulatory properties and maintenance of adenosine levels in the CNS, evidencing a particular feature of this compound. The present findings highlight a promising way to be exploited by both the compounds in CNS.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Federal University of Santa Maria for supporting this study.

Conflict of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

References

1. Whanger PD. Selenium and the brain: a review. *Nutr Neurosci* 2001; 4: 81–97.
2. Nakayama A, Hill KE, Austin LM, et al. All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium. *J Nut* 2007; 137(3): 690–693.
3. Stadtman TC. Some selenium dependent biochemical processes. *Adv Enzymol* 1979; 48: 1–28.

4. Valdiglesias V, Pásaro E, Méndez J, et al. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Arch Toxicol* 2010; 84: 337–351.
5. Chen J and Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 2003; 86(1): 1–12.
6. Caito SW, Milatovic D, Hill KE, et al. Progression of neurodegeneration and morphologic changes in the brains of juvenile mice with selenoprotein P deleted. *Brain Res* 2011; 1398: 1–12.
7. Tsunoda M, Johnson VJ and Sharma RP. Increase in dopamine metabolites in murine striatum after oral exposure to inorganic but not organic form of selenium. *Arch Environ Contam Toxicol* 2000; 39: 32–37.
8. Parnham MJ and Graf E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog Drug Res* 1991; 36: 9–47.
9. Wilhlem EA, Jesse CR, Bortolato CF, et al. (E)-2-Benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole has antioxidant and hepatoprotective properties against oxidative damage induced by 2-nitropropane in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25(1): 80–90.
10. Genovese T, Mazzon E, Esposito E, et al. Role of endogenous glutathione in the secondary damage in experimental spinal cord injury in mice. *Neurosci Lett* 2007; 6: 423–441.
11. Moretto MB, Funchal C, Zeni G, et al. Selenium compounds prevent the effects of methylmercury on the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex of young rats. *Toxicol Sci* 2005; 85: 639–646.
12. Marino JP, McClure MS, Holub DP, et al. Stereocontrolled synthesis of macrolactin. *J Am Chem Soc* 2001; 8: 1664–1668.
13. Zeni G, Ludtke D, Panatieri RB, et al. Vinylic tellurides: from preparation to their applicability in organic synthesis. *Chem Rev* 2006; 106: 1032–1076.
14. Comasseto JV, Ling LW, Petraghani N, et al. Vinylic selenides and tellurides-preparation, reactivity and synthetic application. *Synthesis* 1997; 4: 373–403.
15. Lenardão EJ, Silva MS, Mendes SR, et al. Synthesis of β -phenylchalcogeno- α,β -unsaturated esters, ketones and nitriles using microwave and solvent-free conditions. *J Braz Chem Soc* 2007; 18: 943–950.
16. Luo M, Singh V, Taylor EA, et al. Transition state variation in human, bovine and *Plasmodium falciparum* adenosine deaminases. *J Am Chem Soc* 2007; 129(25): 8008–8017.
17. Zavialov AV and Engstrom A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *J Biochem* 2005; 391: 51–57.
18. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(27): 9583–9588.
19. Tarhan G, Gümüşlü F, Yılmaz N, et al. Serum adenosine deaminase enzyme and plasma platelet factor 4 activities in active pulmonary tuberculosis, HIV-seropositive subjects and cancer patients. *J Infect* 2006; 52: 264–268.
20. Snyder SH and Brecht DS. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trend Pharmacol Sci* 1991; 12(4): 125–128.
21. Kade IJ, Paixão MW, Rodrigues OE, et al. Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and D-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. *Neurochem Res* 2008; 33: 167–178.
22. Bates JN, Baker MT, Guerra R, et al. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. *Biochem Pharmacol* 1990; 42: 157–165.
23. Posser T, Moretto MB, Dafre AL, et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: An in vitro evaluation. *Chem-Biol Interact* 2006; 164: 126–135.
24. Moncada S, Palmer RM and Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 109–142.
25. Yang G, Candy TE, Boaro M, et al. Free radical yields from the homolysis of peroxyxynitrous acid. *Free Radic Biol Med* 1992; 12(4): 327–330.
26. Silveira CC, Braga AL and Guerra RB. Stereoselective synthesis of alphaphenylchalcogeno-alpha,beta-unsaturated esters. *Tetrahedron Lett* 2001; 43: 3395–3397.
27. Oyama LM, Coutob RC, Coutoc GEC, et al. Ethanol intake during lactation II. Effects on pups liver and brain metabolism. *Alcohol* 2001; 21: 201–206.
28. Bellé LP, Bitencourt PER, Abdalla FH, et al. An in vitro comparison of a new vinyl chalcogenide and sodium selenate on adenosine deaminase activity of human leukocytes. *Chem-Biol Interact* 2011; 189: 141–145.
29. Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HV (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, NY: Academic Press, 1974, pp. 1092–1099.
30. Niehaus WGJ and Samuelsson B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur J Biochem* 1968; 6(1): 126–130.

31. Numa R, Kohen R, Poltyrev T, et al. Tempol diminishes cocaine-induced oxidative damage and attenuates the development and expression of behavioral sensitization. *Neurosci* 2008; 155: 649–658.
32. Colle D, Arantes LP, Rauber R, et al. Antioxidant properties of *Taraxacum officinale* fruit extract are involved in the protective effect against cellular death induced by sodium nitroprusside in brain of rats. *Pharm Biol* 2012; 50(7): 549–556.
33. Ellman GL and Boyne AF. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem* 1972; 46: 639–653.
34. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88: 119–125.
35. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF and Nabavi SM. Essential oil composition and antioxidant activity of *Pterocarya fraxinifolia*. *Pakistan J Biol Sci* 2009; 12(13): 957–963.
36. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, et al. Free radical scavenging activity and antioxidant capacity of *Eryngium caucasicum trautv* and *Froripia subpinnata*. *Pharmacol online* 2008; 3: 19–25.
37. Medina LO, Veloso CA, Borges EA, et al. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Prac* 2007; 77: 193–197.
38. Moretto MB, Thomazi AP, Godinho G, et al. Ebselen and diorganylchalcogenides decrease in vitro glutamate uptake by RAT brain slices: prevention by DTT and GSH. *Toxicol vitro* 2007; 21: 639–645.
39. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–267.
40. Ronca G, Bauer C and Rossi CA. Role of sulphhydryl groups in adenosine deaminase. *Eur J Biochem* 1967; 1: 434–438.
41. Kumar S, Bjornstedt M and Holmgren A. Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *Eur J Biochem* 1992; 207: 435–439.
42. Nogueira CW, Zeni G and Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104: 6255–6286.
43. Hassan W, Narayanaperumal S, Gul K, et al. Modulation of diorganoyl dichalcogenides reactivity by non-bonded nitrogen interactions. *Chem-Biol Interact* 2012; 199: 96–105.
44. Prestes AS, Stefanello St, Salman SM, et al. Antioxidant activity of β -selenoamines and their capacity to mimic different enzymes. *Cell Biochem* 2012; 365: 85–92.
45. Spyrou G, Bjornstedt M, Skog S, et al. Selenite and selenate inhibit human lymphocyte growth via different mechanisms. *Canc Res* 1996; 56: 407–4412.
46. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 1471–1483.
47. Wall MJ, Atterbury A and Dale N. Control of basal extracellular adenosine concentration in rat cerebellum. *J Phys* 2007; 582: 137–151.
48. Fredholm BB, Chen JF, Masino SA, et al. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 385–412.
49. Franco R, Casado V, Ciruela F, et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme: a review. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 283–294.
50. Rathbone MP, Middlesmiss PJ, Gysbers JW, et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 1999; 59: 147–149.
51. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Met* 1983; 65: 55–63.
52. Berridge MV and Tan AS. Characterization of the cellular reduction of MTT. Subcellular localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303: 474–482.
53. Nogueira CW and Rocha JBT. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. *J Braz Chem Soc* 2010; 21: 2055–2207.
54. Gemelli T, Carvalho CA, de Andrade RB, et al. The organochalcogen 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one induces oxidative stress in heart, liver, and kidney of rats. *Mol Cell Biochem* 2011; 355 (1–2): 167–172.
55. Medeiros MC, Mello A, Gemelli T, et al. Effect of chronic administration of the vinyl chalcogenide 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one on oxidative stress in different brain areas of rats. *Neurochem Res* 2012; 37(5): 928–934.
56. Lacerda DS, de Oliveira VC, Mascarenhas M, et al. Acute administration of the organochalcogen 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one induces biochemical and hematological disorders in male rats. *Cell Biochem Funct* 2012; 30: 315–319.
57. Islam F, Zia S, Sayeed I, et al. Effect of selenium on lipids, lipid peroxidation, and sulfhydryl group in neuroendocrine centers of rats. *Biol Trace Elem Res* 2004; 97: 71–81.
58. Islam F, Zia S, Sayeed I, et al. Effect of selenium on lipids, lipid peroxidation, and sulfhydryl group in neuroendocrine centers of rats. *Biol Trace Elem Res* 2004; 97: 71–81.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, podemos inferir o seguinte:

- O Se orgânico provocou uma redução na atividade da ADA, não sendo devido a oxidação de seus grupamentos tióis, já que esse composto não alterou os níveis de NP-SH, nem os níveis de LDH (outra enzima sulfidrílica), além de o composto em estudo não apresentar um heteroátomo próximo ao Se, o que poderia aumentar a reatividade com os grupamentos tióis;
- O composto orgânico de Se não provocou, *per se*, a lipoperoxidação nas fatias de córtex de ratos, e não protegeu essas estruturas contra o dano induzido por NO, provavelmente devido às concentrações utilizadas;
- O composto orgânico de Se apresentou capacidade de remoção de radicais NO apenas na maior concentração utilizada;
- O composto inorgânico de Se não alterou a atividade da ADA, provavelmente devido ao átomo de Se presente nesse composto encontrar-se em um alto estado de oxidação, tornando-se pouco reativo com grupamentos tióis. No entanto, esse composto aumentou os níveis de grupamento tióis (NP-SH) e protegeu as fatias de córtex cerebral contra o dano induzido por NPS;
- Os métodos utilizados para verificação da viabilidade celular (LDH e MTT) sugerem a manutenção da integridade celular em fatias de córtex de ratos jovens quando expostos aos compostos de Se. Além disso, o composto orgânico de Se pode ter ação imunomoduladora e também na manutenção nos níveis de adenosina no cérebro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F. H., et al. Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. **Biometals**, v. 24, p. 349–356, 2011.

ABDALLA, F. H., et al. Methylmercury-induced changes in target organs of suckling rat pups. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 64, n. 6, p. 605-9, 2012.

AIKAWA, T.; UMEMORI-AIKAWA, Y.; FISHER, J. R. Purification and properties of the adenosine deaminase from the midgut gland of a marine bivalved mollusk. *Atrina* spp. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 58, p. 357-364, 1977.

ALLAN, C. B.; LACOURCIERE, G.M.; STADTMAN, T. C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. **Ann. Rev. Nut.**, v. 19, p. 1, 1999.

ALMOROTH, B.C., ET AL. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aqua. Toxicol.**, v. 73, p. 171-180, 2005.

ALTURKMANI, H. J., et al. Selenate enhances STAT3 transcriptional activity in endothelial cells: differential actions of selenate and selenite on LIF cytokine signaling and cell viability. **J. Inor. Biochem.**, v. 109, p. 9-15. 2012.

AMARA, I. B., et al. Dietary selenium addition improves cerebrum and cerebellum impairments induced by methimazole in suckling rats. *Int. J. Devl. Neurosci.*, v. 27, p. 719–726, 2009.

ANDRADE, R. B., et al. Inhibition of creatine kinase activity by 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one in the cerebral cortex and cerebellum of young rats. **J. Appl. Toxicol.**, v. 30, p. 611–616, 2010.

BATES, J. N., et al., Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. **Biochem. Pharmacol.**, v, 42, p. 157–165, 1990.

BARRY, D. I. Cerebrovascular aspects of antihypertensive treatment. **Am. J. Cardiol.**, v. 63, p. 14C-18C, 1989.

BECKMAN, J. S., et al. ALS, SOD and peroxyxynitrite. **Nature**, v. 364, p. 584, 1993.

BEHNE, D., et al. Two new selenoproteins found in the prostatic glandular epithelium and the spermatid nuclei. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 10, p. 340–45, 1997.

BEHNE, D., et al. Cellular and subcellular distribution of selenium and selenoproteins. *In*: A. M.Roussel, A.Favier, R. A.Anderson. **Trace elements in man and animals 10: proceedings of the tenth international symposium on trace elements in man and animals**. New York: Plenum Press, 2000, p. 29–33.

BELLÉ, L. P., et al. Comparative evaluation of adenosine deaminase activity in cerebral cortex and hippocampus of young and adult rats: effect of garlic extract (*Allium sativum* L.) on their susceptibility to heavy metal exposure. **Basic & Clin. Pharmacol. & Toxicol.**, v. 104, p. 408–413, 2009.

BELLÉ, L. P., et al. An in vitro comparison of a new vinyl chalcogenide and sodium selenate on adenosine deaminase activity of human leukocytes. **Chem. Biol. Interact.**, V. 189, P. 141–145, 2011a.

BELLÉ, L. P., et al. Expression of CD26 and its association with dipeptidyl peptidase iv activity in lymphocytes of type 2 diabetes patients. **Cell. Biochem. Biophys.**, v. 61, p. 297-302, 2011b.

BELLÉ, L. P., et al. Association between HbA1c and dipeptidyl peptidase IV activity in type 2 diabetes mellitus. **Clin. Chim. Acta**, v. 413, p. 1020-1, 2012.

BJORNSTEDT, M., et al. Selenite incubated with NADPH and mammalian thioredoxin reductase yields selenide, which inhibits lipoxygenase and changes the electron spin resonance spectrum of the active site iron. **Biochem.**, v. 35, p. 8511–8516, 1996.

BLACKBURN, M. R. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 66-70, 2003.

BLANCO, J., et al. Biochemical characterization of the SecA protein of *Streptomyces lividans*-interaction with nucleotides, binding to membrane vesicles and in vitro translocation of proAmy protein. **Eur. J. Biochem.**, v. 171, p. 472-8, 1998.

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

BORTOLATTO, C. F., et al. Acute treatment with bis selenide, an organic compound containing the trace element selenium, prevents memory deficits induced by reserpine in rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 151, p. 92–99, 2013a.

BORTOLATTO, C. F., et al. Organoselenium bis selenide attenuates 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. **Neurotox. Res.**, v. 23, p. 214-224, 2013b.

BOU-RESLI, M. N., et al. Brain selenium accumulation in rat pups of selenium supplemented mothers. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, n. 4, p. 228-31, 2002.

BOROWIEC, A., et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochim. Pol.**, v. 53, n. 2, p. 269–278, 2006.

BRESCIA, P.; BANKS, P. Quantifying cytotoxicity of thiostrepton on mesothelioma cells using mtt assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer BioTek **Instruments BioTek Instruments**, Winooski, Vermont, USA, 2009.

BRUNDEGE, J. M.; DUNWIDDIE, T. V. Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 5603-5612, 1996.

BRÜNING, C. A., et al. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. **Neurochem. Res.**, v. 37, p. 2249-2258, 2012.

BRUNTON, L. L.; MAYER, S. E. Extrusion of cyclic AMP from pigeon erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 9714-9720, 1979.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 64, p. 1471–1483, 2007.

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

CAITO, S. W., et al. Research report progression of neurodegeneration and morphologic changes in the brains of juvenile mice with selenoprotein P deleted. **Brain Res.**, v. 139(8), p. 1-12, 2011.

CARGNELUTTI, L. O., et al. Avaliação da atividade da adenosina deaminase no derrame pleural tuberculoso. **Rev. Bras. Pesq. Saúde**, v. 15, n. 1, 2013.

CARVALHO, C. A., et al.. Effect of in vitro exposure of human serum to 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro) oct-en-1-one on oxidative stress. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 332, p. 127–134, 2009.

CHAGAS, P. M., et al. High doses of 2,2'-dithienyl diselenide cause systemic toxicity in rats: an in vitro and in vivo study. **J. Appl. Toxicol.**, v. 33, p. 480–487, 2013a.

CHAGAS, P. M., et al. Bis(phenylimidazoselenazoly) diselenide. **Behav. Pharmacol.**, v. 24, p. 37-44, 2013b.

CHEN, J.; BERRY, M. J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **J. Neurochem.** v. 86, n. 1, p. 1–12, 2003.

CHUNG, M. J., et al. ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, n. 205, p. 225–236, 2005.

CLEMENS, J. A.; PENETTA, J. A. **Free radicals in central nervous systems diseases**. In: Blake D, Winyard PG (eds). Immunopharmacology of free radical species. Academic Press, San Diego 1995; p. 73-83.

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

COMBS, G. F. Jr., et al. Effects of selenomethionine supplementation on selenium status and thyroid hormone concentrations in healthy adults. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 89, p. 1808–1814, 2009.

CORCORAN, N. M., et al. Open-label, phase I dose-escalation study of sodium selenate, a novel activator of PP2A, in patients with castration-resistant prostate cancer. **Br. J. Cancer.**, v. 103, n. 4, p. 462-8, 2010.

COSTA, M. D., et al. Ebselen reduces hyperglycemia temporarily-induced by diazinon: A compound with insulin-mimetic properties. **Chem. Biol. Interac.t.**, v. 197, p. 80-86, 2012.

CROW, J. P.; BECKMAN, J. S. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 387, p. 147-161, 1996.

CRISTALLI, G., et al. Adenosine deaminase: functional implications of inhibitors. **John Wiley Sons, Inc. Med. Res. Rev.**, v. 21, p. 105-128, 2001.

DA ROCHA, J. T., et al. Hypolipidaemic activity of orally administered diphenyl diselenide in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 61, n. 12, p. 1673-9, 2009.

DA ROCHA, J. T. et al. Cognitive effects of diphenyl diselenide and estradiol treatments in ovariectomized mice. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 99, p. 17–24, 2013.

DA SILVA, A. S., et al. Trypanosoma evansi: Adenosine deaminase activity in the brain of infected rats. **Exp. Parasitol.**, v. 127, p. 173-177, 2011a.

DA SILVA, A. S., et al. Activity of the enzyme adenosine deaminase in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitol.**, v. 138, p. 201-8, 2011b.

DADDONA, P. E., Human adenosine deaminase. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 12496-12501, 1981.

DAVALOS, A. New treatments in cerebrovascular diseases. **Neurologia**, v. 14, p. 77–83, 1999.

DE BONA, K. S., et al. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in people with type 2 diabetes: Beneficial effect of Syzygium cumini leaf extract in vitro. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 94, p. 84-90, 2011.

DE BONA, K. S. ; et al. Lymphocytic enzymes and lipid peroxidation in patients with Metabolic Syndrome. **Clin. Biochem.**, v. 45, p. 13-14, 2012.

DE BONA, K. S., et al. Butyrylcholinesterase and γ -glutamyltransferase activities and oxidative stress markers are altered in metabolic syndrome, but are not affected by body mass index. **Inflammation**. v. 36, n. 6, p. 1539-47, 2013a.

DONATO, F., et al. Involvement of the dopaminergic and serotonergic systems in the antidepressant-like effect caused by 4-phenyl-1-(phenylselanylmethyl)-1,2,3-triazole. **Life Sci.**, v. 93, p. 393-400, 2013.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 31-55, 2001.

EMANUELLI, T., et al. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. **Neurochem. Int.**, v. 38, p. 213–218, 2001.

FACHINETTO, R., et al. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. **Psychopharmacol. (Berlin)** v. 194, p. 423–432, 2007.

FAN, M.; QIN, W.; MUSTAFA, S. J. Characterization of adenosine receptor(s) involved in adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic mouse model. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 284, p. 1012-1019, 2003.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, D., et al. Immature rat brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **J. Neurosci. methods**, v. 145, n. 1-2, p. 205-212, 2005

FLOHÉ, L.; HARRIS, J. R. Peroxiredoxin systems. **Struct. and Funct.** New York, 2007.

FLOHÉ, L. The labour pains of biochemical selenology: The history of selenoprotein biosynthesis. **Biochim. et Biophys. Acta**, v. 1790, p. 1389–1403, 2009.

FOOD AND NUTRITION BOARD, Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**. Washington DC: National Academy Press, 2000.

FOSTER, C. B., et al. Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. **BMC genetics**, v. 7, p. 56, 2006.

FRANCO, R., et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Prog. Neurobiol.**, v. 52, p. 283–94, 1997.

FRANCO, R., et al. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunol. Rev.**, v. 161, p. 27-42, 1998.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 1315–1323, 2002.

FREDHOLM, B. B., et al. Adenosine and brain function. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 63, p. 191–270, 2005.

FROST, D. V. The two faces of selenium can selenophobia be cured? **Crit. Rev.Toxicol.**, v. 1, p. 467–514, 1972.

GANTHER, H. E. Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. **Biochem.**, v. 10, p. 4089-4098, 1971.

GANTHER, H.; LAWRENCE, J. Chemical transformations of selenium in living organisms. Improved forms of selenium for cancer prevention. **Tetrahedron**, v. 53, p. 12229- 12310, 1997.

GORGUNER, M.; CERCI, M.; GORGUNER, I. Determination of adenosine deaminase activity and its isoenzymes for diagnosis of pleural effusions. **Respirology**, v. 5, p. 321-324, 2000.

GEMELLI, T., et al. The organochalcogen 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one induces oxidative stress in heart, liver, and kidney of rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 355, n. 1-2, p. 167-72. 2011.

GHISLENI, G., et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Res.**, v. 986, p. 196–199, 2003.

HAGEMAN, S. P., et al. Microbiological selenate to selenite conversion for selenium removal. **Water Res.**, v. 47, n. 7, 2118-28, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. **Lancet**, v. 23, p. 1396–1397, 1984.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Oxidative stress: adaption, damage, repair and death**. In: Free radicals in Biology and Medicine. 3th, Oxford: Oxford University Press, 1999, p. 246-349.

HASSAN, W., et al. Hydroxyl containing selenimine compound exhibits improved antioxidant potential and does not inhibit thiolcontaining enzymes. **Chem. Biol. Interact.**, v. 190, p. 35–44, 2011.

HENDERSON, G. B.; STRAUSS, B. P. Evidence for cAMP and cholate extrusion in C6 rat glioma cells by a common anion efflux pump. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 1641-1645, 1991.

HILL, K. E., et al. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 16, p. 13640–13646, 2003.

HUGHES, R. H., et al. Neuroprotection by genipin against reactive oxygen and reactive nitrogen species-mediated injury in organotypic hippocampal slice cultures. **Brain Res.**, v. 16, n. 1543, p. 308-14, 2014.

IBIS, M., et al. Serum Adenosine deaminase levels in pancreatic diseases. **Pancreatology**, v. 7, p. 526-530, 2007.

IBRAHIM, M., et al. Ethanol-induced oxidative stress: the role of binaphthyl diselenide as a potent antioxidant. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 147, p. 309-314, 2012.

ILLES, P.; RIBEIRO, A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. **Eur. J. Pharmacol.** v. 483, p. 5-17, 2004.

IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 8, p. 487—497, 1995.

INEU, R. P., et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: involvement of oxidative stress. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 3023–3029, 2008.

INEU, R. P., et al. Antioxidant activity and low toxicity of (E)-1-(1-(methylthio)-1-(selenopheny) hept-1-en-2-yl) pyrrolidin-2-one. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 28, p. 213-223, 2012.

IP, C.; LISK, D. J. Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium rich products. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 573–576, 1994.

IWAKI- EGAWA, S. I.; NAMIKI, C.; WATANABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N- terminal amino acids sequence. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 137, p. 247- 254, 2004.

JONES, N. C., et al. Targeting hyperphosphorylated tau with sodium selenate suppresses seizures in rodent models. **Neurobiol. Dis.**, v. 45, n. 3, p. 897-901, 2012.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**, New York: Oxford University Press, 1997.

KADE, I. J.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide and streptozotocin did not alter cerebral glutamatergic and cholinergic systems but modulate antioxidant status and sodium pump in diabetic rats. **Brain Res.**, v. 284, p. 202-211, 2009a.

KADE, I. J., et al. Studies on the antioxidant effect and interaction of diphenyl diselenide and dicholesteroyl diselenide with hepatic d-aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase. **Toxicol. Vitro**, v. 23, p. 14–20, 2009b.

KADE, I. J., et al. Effect of oral administration of diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell. Biol. Toxicol.**, v. 25, p. 415–424, 2009c.

KANDA, T., et al. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **J. Org. Chem.**, v. 64, p. 8161- 8169, 1999.

KAROUI, H., et al. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulte by peroxyxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 6000-6009, 1996.

KLINGER, M.; FREISSMUTH, M.; NANOFF, C. Adenosine receptors: G protein-mediated signaling and the role of accessory proteins. **Cell. Signal.**, v. 14, n. 2, p. 99-108, 2002.

KINOSHITA, T., et al. Structural basis of compound recognition by adenosine deaminase. **Biochem.**, v. 44, p. 10562-10569, 2005.

KITAHARA, J.; SEKO, Y.; IMURA, N. Possible involvement of active oxygen species in selenite toxicity in isolated rat hepatocyte. **Arch. Toxicol.**, 67: 497-501, 1993.

KUHBACHER, M., et al. The brain selenoproteome: priorities in the hierarchy and different levels of selenium homeostasis in the brain of selenium-deficient rats. **J. Neurochem.**, v. 110, n. 1, p. 133–142, 2009.

KOVACIC, P.; JACINTHO, J. D. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. Review. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 773-96, 2001.

LACERDA, D. S., et al. Acute administration of the organochalcogen 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one induces biochemical and hematological disorders in male rats. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 30, n. 4, p. 315-9, 2012.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **J. Neurochem.**, v. 79, n. 3, p. 463-84, 2001.

LENARDAO, E. J., et al. Synthesis of β -phenylchalcogeno- α,β -unsaturated esters, ketones and nitriles using microwave and solvent-free conditions, **J. Braz. Chem. Soc.** v. 18, p. 943–950, 2007.

LETAVAYOVÁ, L.; VLCKOVÁ, V.; BROZMANOVÁ, J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. **Toxicol.**, v. 227, p. 1–14, 2006.

LIANG, L. P.; HO, Y. S.; PANTEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate induced hippocampal damage. **Neurosci.**, v. 101, p. 563-570, 2000.

LIU, D. A. Y., et al. Mechanism of cellular 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.**, v. 69, n. 2, p. 581–593, 1997.

LLOYD, H. G., et al. The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. **Biochem. J.**, v. 252, p. 489-494, 1988.

LOGUERCIO, C., et al. Intravenous load of fructose and fructose 1,6-diphosphate: effects on uricemia in patients with nonalcoholic liver disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 91, n. 3, p. 559-564, 1996.

LUPIDI, G., et al. Adenosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*: interaction with ground and transition state analogs. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1122, p. 311-316, 1992.

MACIEL, E. N., et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 14, p. 310–319, 2000.

MARESOVÁ, D.; TROJAN, S. Effect of selenium pre-treatment on evoked cortical afterdischarges in young rats. **Prague Med. Rep.** v. 105, n. 2, p. 119-30, 2004.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. **Front. Biosci.**, v.15, p. 339-345, 1999.

MCDOWELL, L. R., et al. Mineral supplementation for ruminants in tropical regions emphasizing organic selenium. In: Proceedings of Alltech's Annual Symposium. **Nutritional biotechnology in the feed and food industries**. United Kingdom, 2002. p. 18.

MEDEIROS, M. C., et al. Effect of chronic administration of the vinyl chalcogenide 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one on oxidative stress in different brain areas of rats. **Neurochem. Res.**, v. 37, n. 5, p. 928-34, 2012.

MELLO, A., et al. Toxicological evaluation of chronic exposure to the organochalcogen 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)oct-2-en-1-one in male rats. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 50, p. 2450–2455, 2012.

MENDEZ FILHO J. D.; RODRIGUEZ H. G. R. Sobre los beneficios de los radicales libres. **Rev. Med. IMSS**, v.35, n.4, p.309-13, 1997.

MEOTTI, F. C., et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicol. Lett.**, v. 143, p. 9–16, 2003.

MORETTO, M. B., et al. Voltage-dependent ebselen and diorganochalcogenides inhibition of Ca²⁺ influx into brain synaptosomes. **J. of Biochem. and Mol. Toxicol.**, v. 17, n. 3, p. 154-160, 2003.

MORETTO, M. B., et al. Ebselen protects Ca²⁺⁺ influx blockage but does not protect glutamate uptake inhibition caused by Hg²⁺. **Neurochem. Res.**, v. 29, n. 10, p. 1801-1806, 2004.

MORETTO, M. B., et al. Selenium compounds prevent the effects of methylmercury on the *in vitro* phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex of young rats., **Toxicol. Sci.** v. 85, p. 639–646, 2005a.

MORETTO, M. B., et al. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. **Toxicol.**, v. 210, p. 213–222B, 2005b.

MORETTO, M. B., et al. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg²⁺, **Toxicol. Sci.**, v. 214, n. 1–2, p. 57–66, 2005c.

MORETTO, M. B., et al. Ebselen and diorganylchalcogenides decrease *in vitro* glutamate uptake by rat brain slices: Prevention by DTT and GSH. **Toxicol. in Vitro.** v. 21, p. 639–645, 2007.

MORRISON, M. E., et al. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is cell surface ectopeptidase. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 272-276, 1993.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: Princípios e Interpretação.** 3 Ed., Rio de Janeiro, Editora , 2000, p. 108-109.

NAKAYAMA, A., et al. All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium. **J. Nutr.**, v. 137, n. 3, p. 690–693, 2007.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. **Sci. Total Environ.**, v. 400, p. 115–141, 2008

NEILANDS, J. B. Studies of lactic dehydrogenases of heart. III. Action of inhibitors. **J. Biol. Chem.**, v. 208, p. 225, 1954.

NOGUEIRA, C. W., et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicol.**, v. 183, p. 29, 2003a.

NOGUEIRA, C. W., et al. Evidence for anti-inflammatory and antinociceptive of diphenyl diselenide. **Inflamm. Res.** v. 52, p. 56–63, 2003b.

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

OLIVEIRA, C. B., et al. Activities of adenine nucleotide and nucleoside degradation enzymes in platelets of rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 9–14, 2011.

PACHECO, R., et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 102, p. 9583–9588, 2005.

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

PAK, M. A., et al. Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depress neuronal activity in hippocampal slices. **Neuropharmacol.**, v. 33, p. 1049- 1053, 1994.

PAPOTI, M., et al. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. **Motriz. Revista de Educação Física**, v. 9, n. 2, p. 97, 2008.

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

PAULMIER, C. **Selenium reagents and intermediates in organic synthesis**, Pergamon, Oxford, 1986.

PENZ, J., et al. Effect of 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one on oxidative stress in cerebral cortex of rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, p. 745–751, 2009.

PENZ, J., et al. Effect of 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one on oxidative stress in cerebral cortex of rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 190, p. 35–44, 2011.

PESARICO, A. P., et al. 2,2'-Dithienyl diselenide pro-oxidant activity accounts for antibacterial and antifungal activities. **Microbiol. Res.**, v. 168, n. 9, p. 563-8, 2013.

PETRAGNANI, N.; RODRIGUES, R.; COMASSETO, J. V. The reaction of selenyl halides with Wittig and Horner Emmons reagents. **J. Organomet. Chem.**, v. 114, p. 281, 1976.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIMENTEL, V. C., et al. Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 27, n. 8, p. 857-62, 2009.

PIMENTEL, V. C., et al. Hypoxic-ischemic brain injury stimulates inflammatory response and enzymatic activities in the hippocampus of neonatal rats. **Brain Res.**, v. 1388, p. 134-140, 2011.

PINTON, S., et al. Therapeutic effect of organoselenium dietary supplementation in a sporadic dementia of Alzheimer's type model in rats. **J. Nut. Biochem.**, v. 24, p. 311–317, 2013a.

PINTON, A., et al. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide protects against amyloid- β induced cytotoxicity in vitro and improves memory deficits in vivo. **Behav. Brain Res.**, v. 247, p. 241–247, 2013b.

PRAKASH, M. S., et al. Altered adenosine deaminase activity in type 2 Diabetes mellitus. **JIACM**, v. 7, p. 114-117, 2006.

PRESTES, A. S., et al. Antioxidant activity of β -selenoamines and their capacity to mimic different enzymes. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 365, p. 85-92, 2012.

PRIGOL, M. et al. Comparative excretion and tissue distribution of selenium in mice and rats following treatment with diphenyl diselenide. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 150, p. 272-7, 2012.

QUIJANO, C., et al. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. **Biochem. J.**, v. 322, p. 167-173, 1997.

RATHBONE, M. P., et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Prog. Neurobiol.**, v. 59, p. 147-149, 1999.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

READ, J. A. , et al., Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. **Proteins**, v. 43, n. 2, p. 175-85. 2001.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. Techniques in free radical research. In: Burton, R.H., Knippenberg, P.H. **Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. Elsevier, Amsterdam, p. -149, 1991.

SALAMA, R. M., et al. Potential utility of sodium selenate as an adjunct to metformin in treating type II diabetes mellitus in rats: a perspective on protein tyrosine phosphatase. **Biomed. Res. Int.** 2013; 2013:231378. doi: 10.1155/2013/231378. Epub 2013.

SANTAMARÍA, A., et al. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: *in vitro* and *in vivo* studies. **J. Neurochem.**, v. 86, n. 2, p. 479-88, 2003

SAITO, I., et al. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery**, v. 42, p. 269-278, 1998.

SEKO, Y., et al. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: **Wendel, A., Selenium in biology and medicine**. Westport, CT: AVI Publishing Co, 1989.

SHAMBERGER, R. J.; FROST, D. V. Possible protective effect of selenium against human cancer. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 100, p. 682, 1969.

SCHOMBURG, L., et al. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. **Biochem. J.**, v. 370, n. 2, p. 397–402, 2003.

SCHRAUZER, G. N. Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1653–1656, 2000.

SCHWARTZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as a integral part of fator against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 200-214, 1957.

SIES, H. Biochemie des oxidative stress. **Angew Chem.**, v. 98, p. 1061- 1075, 1986.

SOUZA, A. C. G., et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride: neurotoxic effect in brain of young rats, in vitro. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 340, p. 179–185, 2010.

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

STEKOL, J. A. Selenium tetracysteine. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 64, p. 1742, 1942.

THOMAS, J. A. Oxidative stress, oxidant defense, and dietary constituents. In: **Modern Nutrition in Health and Disease**, 8th, Lea and febiger: Philladelphia, PA, 1994, p. 501-512.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**, 3^a ed, London: Taylor & Francis, 2000.

TITARENKO, O. T., et al. Adenosine deaminase in the complex diagnosis of different forms of extrapulmonary tuberculosis. **Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.**, v. 11, p. 14-18, 2006.

TORRES, B. B., et al. Nutrição e Esporte: Uma abordagem bioquímica. **Biblioteca Digital de Ciências**, v. 1, 2006.

TRAMS, E. G.; LAUTER, C. J. On the sidedness of plasma membrane enzymes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 345, n. 2, p. 180-197, 1974.

TSEN, C. C.; TAPPEL, A. A. Catalytic oxidation of glutathione and other sulphhydryl compounds by selenite. **J. Biol. Chem.**, v. 233, n. 5, p. 1230-1232, 1958.

TSUKAMOTO, T., et al. Selenate induces epithelial-mesenchymal transition in a colorectal carcinoma cell line by AKT activation. **Exp. Cell. Res.**, v. 319, n. 13, p. 1913-21, 2013.

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

VALDIGLESIAS, V., et al. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. **Arch. Toxicol.**, v. 84, p. 337-351, 2010.

VALLEE, B. L.; WACKER, W. E. C. Zinc, a component of rabbit muscle lactic dehydrogenase. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 78, p. 1771, 1956.

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN DER GRAAF, P. H., et al. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antilipolytic effects of adenosine A(1) receptor agonists in rats: precondition of tissue dependent efficacy in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 290, p. 702-709, 1999.

VAN DER WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 5448-5456, 1976.

VAN EERSEL, J., et al. Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 107, n. 31, p. 13888-93, 2010.

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease: panaceas or tonics for tired sheep. **Cardiovasc. Res.**, v. 47, p. 409-418, 2000.

ZASSO, F. B., et al. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 19, p. 283-289, 2005.

ZAVIALOV, A. V.; ENGSTROM, A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **J. Biochem.**, v. 391, p. 51–7, 2005.

ZHANG, S.; ROCOURT, C.; CHENG, W. H. Selenoproteins and the aging brain. **Mech. Ageing Dev.**, v.131, n. 4, p. 253–260, 2010.

ZIAI, C. W.; MIRSKI, M. A. Blood Pressure Management in the Neurocritical Care Patient. In: SUAREZ, JI. Critical care neurology and neurosurgery. **Humana Press Inc**, Totowa, Nova Jersey, 2004, p. 254-256.

WHANGER, P.D. Selenocompounds in plants and their effects on animals. In Cheeke PR (ed): “**Toxicants of Plant Origin. Vol. III. Proteins and Amino Acids.**” Boca Raton, FL: CRC Press, 1989, p. 141–167.

WHANGER, P.D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. **J. of the Am. Col. of Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 223–232, 2002.

WILHELM, E. A., et al. (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole has antioxidant and hepatoprotective properties against oxidative damage induced by 2-nitropropane in rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 25, n. 1, p. 80-90, 2011.

WILHELM, E. A., et al. Involvement of GABAergic and glutamatergic systems in the anticonvulsant activity of 3-alkynyl selenophene in 21 day-old rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 365, p. 175-180, 2012.

YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: chemical investigation. **Mut. Res.**, v. 379, p. 201-210, 1997.

ANEXOS





Anexo A - Permissão para reprodução do artigo.

Journal Authors

The following SAGE's Global Journal Author Reuse Policy, effective as of March 20, 2013:

- You retain copyright in your work.
- You may do whatever you wish with the version of the article you submitted to the journal (version 1).
- Once the article has been accepted for publication, you may post the accepted version (version 2) of the article on your own personal website, your department's website or the repository of your institution without any restrictions.
- You may not post the accepted version (version 2) of the article in any repository other than those listed above (ie you may not deposit in the repository of another institution or a subject repository) until 12 months after publication of the article in the journal.
- You may use the published article (version 3) for your own teaching needs or to supply on an individual basis to research colleagues, provided that such supply is not for commercial purposes.
- You may use the article (version 3) in a book you write or edit any time after publication in the journal.
- You may not post the published article (version 3) on a website or in a repository without permission from SAGE.
- When posting or re-using the article please provide a link to the appropriate DOI for the published version of the article on SAGE Journals (<http://online.sagepub.com>)

All commercial or any other re-use of the published article should be referred to SAGE. More information can be found at: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

 **Copyright Clearance Center**
 **SAGE**

RightsLink®

[Home](#) [Account Info](#) [Help](#)

Title: Differential effects of organic and inorganic selenium compounds on adenosine deaminase activity and scavenger capacity in cerebral cortex slices of young rats:

Author: PER. Bitencourt, LP Bellé, G Bonfanti, LO Cargnelutti, KS de Bona, PS Silva, FH Abdalla, RA Zanette, RB Guerra, C Funchal, MB Moretto

Publication: Human and Experimental Toxicology

Publisher: SAGE Publications

Date: Sep 1, 2013

Copyright © 2013, SAGE Publications

Logged in as:
paula.bitencourt
Account #: 3000725750
[LOGOUT](#)

Redirected Request

If you are an Author inquiring about the re-use of your journal article, please note that after publication of the journal article, Authors may re-use their content in any later work written or edited by the Author or for the Author's classroom use, without seeking permission from SAGE. For any other use of your work, please contact the publisher. For additional information see www.sagepub.com/repository/binaries/journals/permissions/author_use.doc.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)