



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**EFEITOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO  
DA PROLE DE RATAS WISTAR**

---

**Simone Nardin Weis**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**EFEITOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO  
DA PROLE DE RATAS WISTAR**

---

**por**

**Simone Nardin Weis**

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

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

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

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

**EFEITOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO DA PROLE  
DE RATAS WISTAR**

Elaborada por **Simone Nardin Weis** como requisito parcial para a  
obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Gilson Zeni (Orientador)

---

Profa. Dra. Katia Padilha Barreto

---

Prof. Dr. Luis Fernando Freire Royes

**Santa Maria, dezembro de 2007.**

”Se amanhã sentires saudades,  
lembra-te da fantasia e  
sonha com tua próxima vitória.  
Vitória que todas as armas do mundo  
jamais conseguirão obter,  
porque é uma vitória que surge da paz  
e não do ressentimento.

...

Não faças do amanhã  
o sinónimo de nunca,  
nem o ontem te seja o mesmo  
que nunca mais.  
Teus passos ficaram.  
Olhes para trás...  
mas vá em frente  
pois há muitos que precisam  
que chegues para poderem seguir-te.”

*Charles Chaplin*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marise e Marcus, que me ensinaram a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Obrigada pelo amor, pela compreensão e confiança em mim depositada; e por me ensinarem o valor do estudo, o único bem precioso que não se vende, se compra ou se empresta.

Às minhas “manas”, Luiza e Laura, pela amizade e por estarem sempre prontas para ouvir as minhas lamentações e vibrar pelas minhas conquistas.

Aos meus orientadores, Cristina e Gilson, pelos ensinamentos e exemplos de dedicação.

Aos colegas do laboratório, pelo carinho, pelas conversas descontraídas, pelas palavras de apoio em certos momentos e pela amizade. Com certeza sempre serão lembrados com carinho! Meu muito obrigado àqueles que contribuíram, de uma forma ou de outra, para a realização desta dissertação!

Em especial, aos colegas e grandes amigos, Vanessa e Lysandro. Agradeço de coração o apoio, companheirismo e ensinamentos ao longo deste período. À Vanessa, a quem serei eternamente grata por todo conhecimento compartilhado e por sempre ter guiado a mim e a todos os colegas em momentos de “apuros”... tu és e sempre será a “mãezona” do laboratório!! Adoooooro vocês!!

Às colegas e amigas Gabi, Larissa, Liomara, Nutri e Silvane, agradeço pela amizade e por todos os bons momentos que compartilhamos.

À Carina, minha “pequena” IC, agradeço muito pela colaboração nos trabalhos, e mais do que isso, por me permitir a experiência da orientação, sempre com muita paciência, respeito e dedicação (mesmo nos domingos e feriados!). Valeu guria!

Aos colegas do laboratório do Prof. Gilson e do Prof. João, pela amizade e companheirismo.

Aos professores, colegas e funcionários do PPGBTOX pela contribuição durante a realização deste estudo, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

A UFSM, que há tantos anos forma e aperfeiçoa profissionais.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

E, finalmente, um agradecimento muito especial. Alexandre, quero agradecer por TUDO o que fizestes por mim nestes anos todos. É um TUDO tão extenso que não há como expressar em palavras. Obrigada por estar sempre comigo, tanto nos momentos bons quanto nos ruins, por ser tão otimista e me ensinar a sê-lo também, por ter paciência comigo (mulher na TPM não é fácil!), por ser esta pessoa de caráter inabalável em quem eu tanto me espelho. Te amo muito!!!

## RESUMO

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

### EFEITOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO SOBRE O DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO DA PROLE DE RATAS WISTAR

AUTORA: Simone Nardin Weis

ORIENTADOR: Gilson Zeni

CO-ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, dezembro de 2007.

O selênio (Se) é um elemento traço essencial para humanos e desempenha importante função no crescimento e desenvolvimento de fetos e recém-nascidos. Sabe-se que a deficiência desse elemento pode ocasionar abortos e nascimentos prematuros. Entretanto, os compostos de Se, dependendo da dose, podem ser tóxicos para diversas espécies de animais. Os compostos orgânicos de selênio, disseleneto de difenila  $[(\text{OSe})_2]$  e disseleneto de 3'3-ditrifluormetildifenila  $[(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2]$ , foram os alvos deste estudo, visto que possuem importantes propriedades farmacológicas. Com isso, faz-se necessário o estudo dos efeitos destes compostos sobre o desenvolvimento embrionário. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração de  $(\text{OSe})_2$  e  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$  durante o período da organogênese do desenvolvimento intra-uterino de ratas Wistar. No primeiro trabalho, as ratas prenhas foram expostas ao  $(\text{OSe})_2$  (1,5; 3,0 ou 6,0 mg/kg) ou ao seu veículo (óleo de canola) via injeção subcutânea, do 6º ao 15º dia de gestação (**Artigo**). No 20º dia de gestação foi realizada uma laparotomia para a retirada dos fetos e a observação do aparecimento de malformações morfológicas externas e esqueléticas. Não foram observadas mortes maternas e fetais nos grupos expostos ao  $(\text{OSe})_2$ . A exposição causou uma diminuição do ganho de peso corporal materno (corrigido) nas duas maiores doses testadas, além de um aumento no peso relativo do fígado destas ratas, indicando que o composto causou toxicidade materna. A exposição ao  $(\text{OSe})_2$  alterou significativamente os parâmetros de desenvolvimento avaliados (peso e medidas corporais fetais). Além disso, verificou-se um aumento de incidência de alterações na ossificação do esqueleto desses fetos, em todas as doses avaliadas, porém, estas alterações são consideradas variações que são geralmente reversíveis e parecem não apresentar riscos à vida. Observou-se também que as placentas das ratas que foram expostas ao  $(\text{OSe})_2$  apresentavam alterações na morfologia, tais como, congestão vascular, aumento da infiltração leucocitária e uma intensa atividade fagocítica. Estes efeitos parecem ter contribuído para os efeitos adversos encontrados nas proles analisadas. No segundo trabalho apresentado nesta dissertação, as ratas prenhas foram expostas ao  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$  (1; 5 ou 10 mg/kg) ou ao seu veículo (óleo de canola) através de entubação gástrica, do 6º ao 15º dia de gestação (**Manuscrito**). Foram avaliados os mesmos parâmetros do primeiro trabalho. A administração das doses de 5 e 10 mg/kg de  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$  causou uma diminuição de ganho de peso corporal materno, acompanhada de uma diminuição de consumo de alimento na maior dose administrada. Além disso, as ratas que receberam a maior dose do composto tiveram um aumento do peso do fígado (absoluto e relativo). Estes dados confirmam que o fígado é o órgão alvo da exposição a compostos de Se. Diferentemente da exposição ao  $(\text{OSe})_2$ , a administração de

$(F_3C\emptyset Se)_2$  não alterou o peso e as medidas corporais fetais. Entretanto, o composto causou embriofetalidade na maior dose testada. Este efeito parece ser do tipo tudo-ou-nada, uma vez que levou à reabsorção total de metade das ninhadas estudadas, sendo que a outra metade não foi afetada pelo composto. Nesta dose também foram observadas variações esqueléticas, que igualmente ao estudo com  $(\emptyset Se)_2$  parecem não apresentar riscos à vida. A análise morfológica das placentas também revelou que a exposição ao  $(F_3C\emptyset Se)_2$  foi capaz de alterar de forma significativa a morfologia da placenta. Portanto, com base nos resultados encontrados, concluímos que a exposição materna ao  $(\emptyset Se)_2$  e ao  $(F_3C\emptyset Se)_2$  não provocou o aparecimento de malformações externas visíveis, porém, aumentou a incidência de alterações esqueléticas nos fetos, alterações essas que não afetam a sobrevivência dos mesmos. A exposição aos organocalcogênios também modificou a morfologia das placentas o que pode ter contribuído para o atraso no desenvolvimento intra-uterino observado nas proles.

**Palavras-chave:** Selênio, Toxicidade, Exposição Intra-Uterina, Placenta e Ratos.



## ABSTRACT

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

### EFFECTS OF ORGANOSELENIUM COMPOUNDS ON THE INTRAUTERINE DEVELOPMENT OF WISTAR RATS PROGENY

AUTHOR: Simone Nardin Weis

ADVISOR: Gilson Zeni

CO-ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, December, 2007

Selenium (Se) is an essential trace element for man and is known for its role in regulating growth and development of the fetus and newborn. It is well known that Se deficiency is related to miscarriages and pre-term deliveries. However, it is established that Se compounds, depending of dose, can be highly toxic to several species of animals. The organoselenium compounds, diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>] and 3'3'-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide [(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] were the target of this study since they present important pharmacological properties. Therefore, it is necessary to study the effects of these compounds on the embryofetal development. The purpose of the present study was to evaluate the effects of (PhSe)<sub>2</sub> and (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> administration during the organogenesis period of intrauterine development of Wistar rats. Dams were subcutaneously exposed to (PhSe)<sub>2</sub> (1.5, 3.0 or 6.0 mg/kg) or only vehicle (canola oil), from days 6 to 15 of gestation (**Article**). External and internal fetal examination was performed at gestational day 20. No mortality was observed in fetuses or dams at any (PhSe)<sub>2</sub> treatment. A decrease in maternal body weight gain (corrected) was found in all (PhSe)<sub>2</sub> groups and also an increase in the liver relative weight were observed in these dams, indicating maternal toxicity. Exposure to (PhSe)<sub>2</sub> produced significant changes in fetal body weight and biometry. Furthermore, we verify an increase in the incidence of skeletal alterations of fetuses of all (PhSe)<sub>2</sub> doses tested, however, these alterations were considered variations that are generally reversible and is unlikely to adversely affect survival or health. (PhSe)<sub>2</sub> was capable to cause some morphological modifications on placentas such as vascular congestion, an increase in leucocyte infiltration and phagocytosis. These effects might have contributed with adverse reproductive outcomes observed in the progeny. In the second work presented in this dissertation (**Manuscript**), pregnant rats were given, via intragastric intubation, 1, 5 or 10 mg/kg of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> or vehicle (canola oil), from days 6 to 15 of gestation. The parameters evaluated were the same of the first study. Administration of 5 and 10 mg/kg of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> decreased maternal weight gain during pregnancy and this was accompanied by a reduced food consumption in the higher dose. Furthermore, there was an increase in liver absolute and relative weight of dams given the higher dose. These data confirm the liver as the primary target organ for Se compounds exposition. Differently from (PhSe)<sub>2</sub> exposure, (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> administration did not alter fetal body weight and biometry. However, the compound caused embryoletality in the higher dose tested. This effect seems to be "all or none" since it led to totally resorption of some litters and the others were not affected by the compound. In this dose level, it was also observed a number of skeletal variations that, equally to (PhSe)<sub>2</sub> study, seems

unlikely represent survival risks. The placental morphological analysis revealed that exposure to  $(F_3CPhSe)_2$  was able to alter placental morphology. On the basis of results mentioned above, we conclude that maternal exposure to  $(PhSe)_2$  and  $(F_3CPhSe)_2$  did not cause externally visible malformations but they were able to increase fetuses skeletal alterations incidence, without affecting fetuses survival. Organoselenium compounds also alter placental morphology that could contribute with adverse reproductive outcomes observed on the progeny.

**Keywords:** Selenium, Toxicity, Intrauterine Exposure, Placenta and Rats.

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

**Figura 1.** Estrutura Química do Disselento de Difenila 8

**Figura 2.** Estrutura Química do Disseleneto de 3'3-Ditrifluormetildifenila 9

### Artigo

**Figura 1.** Photomicrographs from placentas of control dams (A) and dams exposed to 1.5 (B), 3.0 (C) and 6.0 (D) mg/Kg (PhSe)<sub>2</sub> during organogenesis. Note the vascular congestion (\*) and cells degeneration (▲) in the spongiotrophoblast. Trophoblast giant cells with marked phagocytic activity (→). Spongiotrophoblast (S), labyrinth (L) and decidua (D) (HE. X400). 17

### Manuscrito

**Figura 1.** Photomicrographs from placentas of control dams (A) and dams given 1 (B), 5 (C) and 10 (D) mg/Kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> during the organogenesis period. Note the vascular congestion (\*) in the decidua and spongiotrophoblast. Trophoblast giant cells (CTG), spongiotrophoblast (S), labyrinth (L) and decidua (D) (HE. X400). 42

## LISTA DE TABELAS

### Introdução

<b>Tabela 1.</b> Classificação das substâncias químicas de acordo com o seu potencial teratogênico segundo o FDA	5
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

### Artigo 1

<b>Tabela 1.</b> Maternal findings of dams exposed to diphenyl diselenide during organogenesis	14
------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabela 2.</b> Reproductive findings of dams exposed to diphenyl diselenide during organogenesis	15
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabela 3.</b> Skeletal examination in fetuses of dams exposed to diphenyl diselenide during organogenesis	16
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Manuscrito

<b>Tabela 1.</b> Maternal findings of dams given 3'3-ditri fluoromethyldiphenyl diselenide during organogenesis	33
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabela 2.</b> Reproductive and fetal data of dams given 3'3-ditri fluoromethyldiphenyl diselenide during organogenesis	34
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabela 3.</b> Skeletal alterations in fetuses from dams given 3'3-ditri fluoromethyldiphenyl diselenide during organogenesis	35
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Antes de Cristo

$\delta$ -ALA-D –  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( *$\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase*)

ANOVA – Análise de variância (*analysis of variance*)

*e.g.* – por exemplo (*exempli gratia*)

*et al.* – e colaboradores (*et ali*)

FDA – Agência de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration*)

GPx – Glutathiona peroxidase

*i.e.* – isto é (*id est*)

Se – Selênio

( $\emptyset$ Se)<sub>2</sub> ou (PhSe)<sub>2</sub> – Disseleneto de difenila (*diphenyl diselenide*)

(F<sub>3</sub>C $\emptyset$ Se)<sub>2</sub> ou (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> – Disseleneto de 3'3'-ditrifuormetildifenila (*3'3'-ditrifuormethylidiphenyl diselenide*)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>APRESENTAÇÃO</b>	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1. Toxicologia do Desenvolvimento</b>	1
1.1.1. História da Teratologia	1
1.1.2. Bases da Toxicologia do Desenvolvimento Moderna	2
1.1.3. Considerações sobre os Defeitos Congênitos	4
<b>1.2. Selênio</b>	6
1.2.1. Selênio e Gestação	6
1.2.2. Organocalcogênios	7
1.2.2.1. Disseleneto de Difenila	8
1.2.2.2. Disseleneto de 3,3'-Ditrifluormetildifenila	9
<b>2. OBJETIVOS</b>	10
<b>3. TRABALHOS CIENTÍFICOS</b>	11
<b>3.1. Efeitos da administração de disseleneto de difenila durante o período da organogênese sobre a prole de ratas Wistar</b>	12
3.1.1. – Artigo: Weis SN, Favero AM, Stangherlin EC, Manarin FG, Rocha JBT, Nogueira CW, Zeni G. Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development. <i>Reproductive Toxicology</i> 23, 175-81, 2007.	13
<b>3.2– Efeitos do disseleneto de 3'3-ditrifluormetildifenila sobre o desenvolvimento intra-uterino da prole de ratas wistar expostas a esse composto durante a organogênese</b>	20
3.2.1. – Manuscrito: Weis SN, Souza CM, Roman SS, Nogueira CW, Zeni G. Toxicity of 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide administered during intra-uterine development of rats. Submetido à <i>Food and Chemical Toxicology</i> , está em fase de revisão.	21

<b>4. DISCUSSÃO</b>	44
<b>4.1. Toxicidade Materna</b>	44
<b>4.2. Toxicidade Intra-Uterina</b>	45
<b>4.3. Análise Morfológica das Placentas</b>	47
<b>5. CONCLUSÕES</b>	48
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	49
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	50

## APRESENTAÇÃO

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

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo e manuscrito, que se encontram no item **TRABALHOS CIENTÍFICOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

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

Nas **PERSPECTIVAS**, estão expostos alguns estudos para continuação deste trabalho.

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



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

#### 1.1.1. HISTÓRIA DA TERATOLOGIA

Teratologia (do grego ‘*teras*’ = monstro) é a ciência que se dedica ao estudo das malformações ligadas a uma perturbação do desenvolvimento embrionário ou fetal (Persaud, 1979). Este termo é empregado para denominar alterações morfológicas ocorridas em um determinado período do desenvolvimento embrionário. A história da Teratologia, uma ciência essencialmente descritiva, nos remete a reflexões sobre as diversas religiões, crenças, visões e o grau de desenvolvimento tecnológico em diferentes civilizações ao longo dos tempos.

Os “monstros” e as malformações congênitas fascinaram a humanidade por séculos. O mais antigo registro associado a malformações humanas foi encontrado na Turquia, era uma estatueta de mármore de 6500 AC, que retrata uma divindade dicefálica e foi citada por Josef Warkany em suas obras literárias dedicadas ao estudo da Teratologia Experimental (Warkany, 1977). Na antiga Babilônia, acreditava-se que o nascimento de crianças anormais era um evento premonitório de assuntos econômicos e políticos do país (Persaud, 1979).

A busca por explicações que pudessem esclarecer o nascimento de crianças malformadas foi fato marcante ao longo dos tempos e gerou o aparecimento de crenças. Uma das crenças que persistiu por muito tempo foi a de que as impressões maternas teriam um efeito sobre a formação e desenvolvimento da criança. Por exemplo, quando uma mulher olhasse firmemente para um homem forte e belo, seu filho nasceria com tais características. Na Grécia antiga, recomendava-se que as mães grávidas passassem parte da gestação a contemplar estátuas de poderosos deuses para que seus descendentes viessem ao mundo com características de beleza, força e inteligência. Acreditava-se que o nascimento de crianças sem estes atrativos se devia à inobservância destes conselhos por parte dos pais (Fonseca, 1987).

A hibridização, crença que parece ter surgido na Índia e no Egito, atribuía o nascimento de crianças com peculiaridades aberrantes e formas monstruosas a características semelhantes às observadas em diferentes espécies animais. O surgimento da teoria da hibridização pode ser explicado pela ocorrência de algumas malformações,

tais como sindactilia, focomelia, ciclopia, ictiose, proboscitose etc, que conferem ao neonato aparência que causa estranheza aos olhos dos homens e que nos remete a comparações com as formas anatômicas de alguns animais (*e.g.* focomelia = foca, ictiose = peixes, proboscitose = mamíferos proboscídeos como a anta e o elefante etc). No antigo Egito, o nascimento de “híbridos” era visto como intervenção divina enquanto que na Europa, durante a Idade Média, tal fato era associado à bruxaria e ao pecado e, em geral, mãe e filho eram condenados à morte (Silva, 1987).

No início do século XIX, o crescente estudo na área da embriologia experimental permitiu uma melhor compreensão e um grande interesse sobre a origem dos defeitos congênitos. Naquela época, a teratologia era considerada parte da anatomia e da embriologia, sendo de caráter descritivo, uma vez que não era possível prevenir nem tratar tais anomalias. O redescobrimto das Leis de Mendel e a idéia de que alguns defeitos congênitos eram transmitidos de pais para filhos, instigou os cientistas a procurar as explicações genéticas para as anomalias congênitas (Dunn, 1965).

#### *1.1.2. BASES DA TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO MODERNA*

As investigações científicas sobre a origem de malformações congênitas em mamíferos, assim como os ensaios preditivos relacionados à Toxicologia do Desenvolvimento, são relativamente recentes (Lemônica, 2001). Vários fatores contribuíram para este atraso, um deles está relacionado à idéia preconcebida de que o embrião e o feto estavam protegidos das agressões pelas membranas extra-embriônicas/fetais e pelas paredes abdominais e do útero da mãe. Acreditava-se que as conseqüências da exposição materna aos agentes ambientais poderiam ser, unicamente, do tipo “tudo-ou-nada”, ou seja, ou o agravo seria severo o suficiente para causar a morte do embrião e a interrupção da gravidez, ou então não causaria mal algum ao concepto (Manson, 1986). Somente a partir da década de 1930, começaram a surgir as primeiras constatações experimentais de que a proteção materna não era tão eficiente quanto se julgava e que fatores externos poderiam causar anomalias em embriões de mamíferos (Persaud, 1979).

As primeiras evidências que derrubaram essa hipótese de proteção da barreira materna e mostraram a importância do ambiente no desenvolvimento morfológico do feto foram apresentadas por Hale, em 1935. Ele constatou o aparecimento de malformações (*e.g.* anoftalmia e fenda palatina) em porcos nascidos de mães com uma

dieta deficiente de vitamina A. Alguns anos depois, foi constatado que tanto a hipovitaminose A quanto a hipervitaminose A estavam associados ao aparecimento de malformações congênitas. Gregg em 1941, identificou o vírus da rubéola como primeiro agente ambiental a causar malformações congênitas. Ele observou que a infecção de mulheres grávidas pelo vírus da rubéola no primeiro trimestre de gestação levava ao aparecimento de malformações oculares, cardiovasculares, surdez e retardo mental. Neste contexto, demonstrou-se experimentalmente que exposições *in utero* a xenobióticos e agentes físicos, tais como a radiação ionizante (raios X), os anti-neoplásicos e uma variedade de outros agentes eram capazes de induzir malformações em embriões de mamíferos (Manson, 1986).

Apesar dos acontecimentos descritos acima e outros ocorridos até meados da década de 1960, não haviam sido estabelecidas medidas suficientemente rigorosas para proteger o embrião e o organismo materno dos agentes ambientais. Foi, entretanto, o estudo de Lenz (1962) sobre as alterações congênitas causadas pelo uso da talidomida por gestantes, que chamou a atenção para o papel das drogas na etiologia das anomalias congênitas. A talidomida (Contergan®) foi desenvolvida pela indústria alemã *Grüenthal Chemie*, em 1954, quando os primeiros ensaios clínicos foram realizados. Em 1956, a talidomida foi introduzida primeiramente no mercado alemão como antigripal e, após, em 1957, como sedativo/hipnótico, tendo como público alvo para seu consumo as pacientes gestantes. Foram realizados estudos em animais, utilizando apenas camundongos e ratos, e a talidomida não demonstrou qualquer efeito teratogênico (Lenz, 1988). Porém, foi no final da década de 1950, através de levantamentos epidemiológicos que se notou o nascimento freqüente de crianças com um tipo até então raro de malformação caracterizada por encurtamento pré-axial (focomelia) e ausência total dos membros (amelia) (Saldanha, 1994). Este episódio ficou conhecido como “Tragédia da Talidomida”. Após ter sido caracterizada como teratogênica, a talidomida foi retirada do mercado em 1961, deixando cerca de 10.000 vítimas em diferentes países. Sendo assim, a tragédia da talidomida iniciou uma nova era para os estudos da teratologia experimental, introduzindo, nas pesquisas, novos modelos de investigação, como a ampliação do número de espécies animais testadas, além de ter dado o alerta de que, pelo fato do fenômeno de teratogênese ser espécie-específico, uma extrapolação exata dos resultados encontrados em animais para seres humanos é quase impossível de ser realizada (Saldanha, 1994).

### 1.1.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS DEFEITOS CONGÊNITOS

Atualmente, sabe-se que determinados xenobióticos, além de afetarem diretamente o desenvolvimento pré-natal, podem causar seqüelas que só serão detectadas na vida adulta. Assim, enquanto muitas anomalias congênitas são diagnosticadas já ao nascimento ou até antes desse (*e.g.* por ultra-sonografia ou por amniocentese e exame do cariótipo), outras só são detectadas anos ou até mesmo décadas depois, como é o caso da carcinogênese transplacentária (*e.g.* adenocarcinoma de vagina que resulta da exposição *in utero* ao dietilestilbestrol e se manifesta em mulheres adultas) (Herbst *et al.*, 1971).

Para avaliar o efeito tóxico de um determinado xenobiótico durante a gestação é preciso levar em consideração que sua toxicocinética pode ser modificada por essa condição fisiológica que envolve não somente o organismo materno, mas sim, uma nova unidade denominada unidade “materno-placentária-fetal” (Lemônica, 2003). Vários estudos mostram que a manutenção da homeostasia é essencial ao desenvolvimento embriofetal normal. Assim sendo, o aparecimento do efeito embriofetotóxico induzido por uma determinada substância química pode resultar da interação desta substância com outros fatores que incidem sobre o organismo materno, como *e.g.* o estado nutricional, idade materna, estresse e outros fatores ambientais (Chahoud *et al.*, 2002; Kuriyama *et al.*, 2000; Noda *et al.*, 2001; Chernoff *et al.*, 1988; 1989). Algumas doenças maternas, tais como o diabetes melito (Brydon *et al.*, 2000) e estados como a hipertermia (Edwards *et al.*, 1995) podem igualmente comprometer os processos normais de embriogênese.

Assim como nos distúrbios descritos acima, a ação de agentes químicos sobre o organismo materno pode alterar o desenvolvimento normal da prole. Dentre os fatores externos, as drogas representam aproximadamente 1% de todos os defeitos congênitos de etiologia conhecida. Sabe-se que a maioria dos agentes químicos atravessa facilmente a placenta através de simples gradiente de concentração, desde que possuam as propriedades físico-químicas necessárias para transpor as membranas. Além disso, pode-se dizer que existe, para cada agente químico, uma dose limite a partir da qual começam a ser observados os efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento embriofetal (Wilson, 1973; Nishimura & Tanimura, 1976).

A avaliação dos resultados dos testes em animais fornece uma idéia clara dos efeitos tóxicos das substâncias químicas sobre o organismo em desenvolvimento pré-

natal e sobre todo o ciclo reprodutivo em mamíferos. Assim, para utilizar estas informações para avaliação da exposição humana, a Agência de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), com base nos dados obtidos em animais e dados epidemiológicos, classificou os agentes químicos segundo sua ação tóxica pré-natal e sobre a reprodução (Tabela 1).

Dessa forma, na avaliação da periculosidade de uma substância química deve-se levar em consideração os efeitos da exposição pré-natal em ambos os organismos, materno e fetal, respeitando-se a complexidade farmacológica existente interespecies (Nau, 1986; Mont & Faustamn-Wats, 1983). No intuito de extrapolar os dados obtidos nos diferentes estudos para o homem, devem ser feitas várias considerações, não somente referentes às diferenças mas também às similaridades dos processos reprodutivos do homem e das espécies testadas.

**Tabela 1.** Classificação das substâncias químicas de acordo com o seu potencial teratogênico, segundo o FDA

Categoria	Descrição
A	Estudos controlados demonstram não haver risco. Estudos adequados, bem controlados, em mulheres grávidas não mostraram risco para o feto.
B	Sem evidência de risco humano. Estudos em animais mostram risco, mas estudos em humanos não o mostram, ou, se não há estudos adequados em humanos, os estudos animais são negativos.
C	O risco não pode ser afastado. Faltam estudos em humanos, e os estudos em animais ou são positivos para o risco fetal ou igualmente faltam. Entretanto, os benefícios potenciais podem justificar o possível risco.
D	Evidência positiva de risco. Dados de investigação preliminar ou pós-comercialização mostram risco para o feto. Entretanto, os benefícios potenciais podem ser maiores que o risco potencial.
X	Contra-indicada na gravidez. Estudos em animais ou humanos, ou relatos de investigação preliminar ou pós-comercialização, mostram risco fetal que claramente se sobrepõe a qualquer possível benefício para a paciente.

## 1.2. SELÊNIO

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

O Se é um elemento traço essencial para os mamíferos, importante para muitos processos celulares. Na primeira metade do século XX, descobriu-se que o Se apresentava toxicidade, e por isso foi considerado um elemento indesejável para os organismos. A toxicidade do Se foi comprovada em 1933, quando descobriu-se que animais de fazenda consumiam plantas que têm a capacidade de acumular grandes quantidades de Se do solo, como as dos gêneros *Astragalus*, *Xylorrhiza*, *Oonopsis* e *Stanleya*, encontradas na região oeste dos Estados Unidos (Oldfield, 1987).

Já na segunda metade do século XX, Schwarz & Foltz (1957) demonstraram que o Se, em baixas concentrações na dieta, era um nutriente essencial. O elemento Se está presente no sítio ativo, na forma de resíduo de selenocisteína, das enzimas glutathione peroxidase, tioredoxina redutase e 5'-deiodinase. Nos últimos anos, os dados na literatura demonstram que baixos níveis de Se podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose, doença cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000). Neste contexto, a suplementação de dietas com Se têm sido aceita pela comunidade científica, sendo que a Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50 - 200  $\mu\text{g}$  (Food and Nutrition Board, 1989).

### 1.2.1. SELÊNIO E GESTAÇÃO

O Se é um elemento importante para a regulação e desenvolvimento do feto e do recém-nascido (Ewan, 1976), sendo que a deficiência desse elemento pode ocasionar abortos (Barrington *et al.*, 1996; Al-Kunani *et al.*, 2001) e nascimentos prematuros (Dobrzynski *et al.*, 1998). Os níveis de Se no sangue são menores em mulheres grávidas do que em mulheres não-grávidas (Mihailovic *et al.*, 2000) e estes níveis diminuem com a idade gestacional (Zachara *et al.*, 1993). Em 1990, Lu demonstrou que havia uma grande incidência de hipertensão em mulheres grávidas em uma região da China que era

deficiente de Se, e que a suplementação com Se foi eficaz de diminuir a incidência desta doença.

Os estudos sobre os níveis de Se maternos durante a gestação apresentam resultados variados, porém, a maioria demonstra que há uma diminuição destes níveis pelo fato da demanda metabólica por Se estar aumentada e também pelo fato do organismo fetal estocar Se, necessário como componente de enzimas antioxidantes (Wasowicz *et al.*, 1993; Makhoul *et al.*, 2004). Além disso, sabe-se que baixos níveis de Se maternos estão positivamente correlacionados com um baixo peso ao nascer (Bogden *et al.*, 2006).

Por outro lado, dados na literatura demonstram que o Se, em altas doses, pode apresentar efeitos tóxicos para o desenvolvimento intra-uterino. A exposição a formas inorgânicas de Se causa o aparecimento de malformações embrionárias em patos (Hoffman & Heinz, 1988) e galinhas (Palmer *et al.*, 1973). Sabe-se que a administração de selenito ou selenato aumenta a incidência de malformações embrionárias em cultura de embriões de ratos (Usami *et al.*, 1999). Outros estudos também demonstraram que a exposição ao selenito de sódio causou edema no pericárdio e malformações no esqueleto de peixes (Teh *et al.*, 2002). Em camundongos, o Se causa aborto e retardo no crescimento dos fetos expostos a doses materno-tóxicas, mas não mostrou efeitos teratogênicos (Yonemoto *et al.*, 1983). Não foram observadas malformações fetais em macacas prenhas que receberam selenometionina durante a gestação (Tarantal *et al.*, 1991). Por outro lado, esse mesmo composto foi teratogênico em hamsters (Ferm *et al.*, 1990). Quando administrado durante a gestação, foi observado que este elemento atravessa a barreira placentária e é distribuído aos tecidos fetais (Shariff *et al.*, 1984; Bedwal & Bahuguna, 1994).

### 1.2.2. ORGANOCALCOGÊNIOS

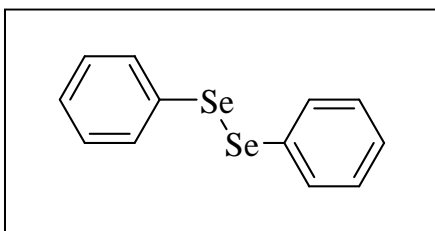
Desde a década de 30, os organocalcogênios, importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (Paulmier, 1986; Braga *et al.*, 1996; 1997), passaram a ser alvo de interesse dos químicos em virtude da descoberta de aplicações sintéticas (Petraghani *et al.*, 1976; Comasseto, 1983) e de propriedades biológicas desses compostos (Parnham & Graf, 1991; Kanda *et al.*, 1999). Com isso, o risco de contaminação ocupacional por organocalcogênios motiva os estudos toxicológicos. Outro aspecto relevante é a tentativa crescente de desenvolvimento de

compostos organocalcogênios que possuam atividade biológica e aplicações farmacológicas (Nogueira *et al.*, 2003c).

#### 1.2.2.1. DISSELENETO DE DIFENILA

O disseleneto de difenila (Figura 1),  $(\text{OSe})_2$ , um composto orgânico de selênio, demonstrou ser mais ativo como mimético da glutathiona peroxidase (Meotti *et al.*, 2004) e menos tóxico em roedores do que o ebselen (Nogueira *et al.*, 2003a; Meotti *et al.*, 2003), outro organocalcogênio que exibe atividade catalítica e propriedades antioxidantes similares à glutathiona peroxidase (Parnhan, 1990). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o  $(\text{OSe})_2$  possui diversas propriedades farmacológicas, tais como efeitos anti-úlceras (Savegnago *et al.*, 2006), antiinflamatório e antinociceptivo (Nogueira *et al.*, 2003a; Zasso *et al.*, 2005), hepatoprotetor (Borges *et al.*, 2005), entre outros.

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



**Figura 1.** Estrutura química do Disseleneto de Difenila

Dados recentes mostram que a administração única de  $(\text{OSe})_2$ , em altas doses (50 e 100 mg/kg), não causa o aparecimento de malformações externas nos fetos, porém aumenta a incidência de anomalias no esqueleto, um sinal de retardo no desenvolvimento intra-uterino (Favero *et al.*, 2005). Apesar deste estudo ter sido

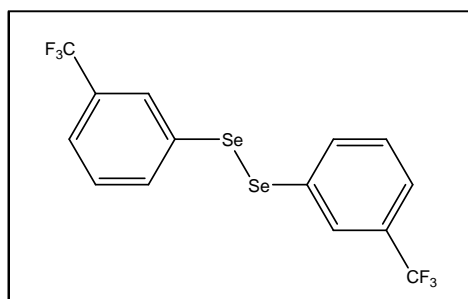


realizado, não há dados na literatura sobre os possíveis efeitos do  $(\text{OSe})_2$  em baixas doses, durante todo o período da organogênese (*i.e.* formação dos órgãos e demais partes do corpo do feto), em roedores.

#### 1.2.2.2. DISSELENETO DE 3'3-DITRIFLUORMETILDIFENILA

O disseleneto de 3'3-ditrifluormetildifenila (Figura 2),  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$ , é um composto que apresenta um substituinte “retirador” de elétrons na posição *meta* do anel aromático do  $(\text{OSe})_2$ . Os dados do nosso grupo de pesquisa para este composto são mais escassos, quando comparado aos do  $(\text{OSe})_2$ . Nogueira *et al.* (2003c) demonstrou que a introdução do substituinte  $\text{CF}_3$  na molécula do  $(\text{OSe})_2$  aboliu completamente o aparecimento de episódios convulsivos em camundongos, quando injetado na dose de  $200 \mu\text{mol/kg}$ . Nesta mesma dose, o  $(\text{OSe})_2$  causou 100% de convulsão em camundongos. Entretanto, esta substituição causou uma diminuição da capacidade antioxidante e da propriedade tiol peroxidase-like do  $(\text{OSe})_2$ . Outro estudo demonstrou que a administração sistêmica de  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$  atenuou o comportamento de psicose induzido em camundongos, em uma dose que não afetou outros parâmetros comportamentais (Machado *et al.*, 2006).

Diferentemente do  $(\text{OSe})_2$ , não há dados na literatura demonstrando os efeitos da administração do  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$  durante o desenvolvimento intra-uterino de roedores.



**Figura 2.** Estrutura química do Disseleneto de 3'3-Ditrifluormetildifenila

## 2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivos:

- Investigar os possíveis efeitos do  $(\text{OSe})_2$  e do  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$ , em baixas doses, durante o período da organogênese da gestação de ratas Wistar;
- Identificar as possíveis anomalias esqueléticas fetais, após a administração de ambos os compostos durante o desenvolvimento intra-uterino das ratas;
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas das placentas, após a administração dos compostos durante o período da organogênese da gestação das ratas.

### 3. TRABALHOS CIENTÍFICOS

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

3.1 – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DISSELENETO DE DIFENILA  
DURANTE O PERÍODO DA ORGANOGÊNESE SOBRE A PROLE DE RATAS  
WISTAR

Artigo

**REPEATED ADMINISTRATION OF DIPHENYL DISLENIDE TO  
PREGNANT RATS INDUCES ADVERSE EFFECTS ON  
EMBRYONIC/FETAL DEVELOPMENT**

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

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

Reproductive Toxicology, 23 (2007) 175-181.



## Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development

Simone N. Weis, Alexandre M. Favero, Eluza C. Stangerlin, Flavia G. Manarin,  
Joao B.T. Rocha, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni \*

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

Received 30 September 2005; received in revised form 8 September 2006; accepted 19 September 2006  
Available online 6 October 2006

### Abstract

The present study was carried out to investigate the effects of diphenyl diselenide, (PhSe)<sub>2</sub>, on embryo-fetal development. Dams were treated subcutaneously with 1.5, 3.0 and 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> from days 6 to 15 of pregnancy. After cesarean section at gestation day (GD) 20, external and skeletal abnormalities were evaluated. A decrease in maternal body weight gain was found in (PhSe)<sub>2</sub> groups, indicating maternal toxicity. There was a reduction in the fetal weight and in crown-rump (CR) length of fetuses at three doses tested. The occipito-nasal length decreased in fetuses from dams exposed to 3.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>. Signs of delayed ossification in the skull, sternbrae and limbs were observed in all (PhSe)<sub>2</sub> groups, revealing a relation between morphological alterations and growth retardation in fetuses, but none of the changes appeared to be dose-dependent. Exposure of dams to (PhSe)<sub>2</sub> resulted in altered placental morphology that may have contributed to adverse reproductive outcomes. We concluded that (PhSe)<sub>2</sub> is toxic to dams and induces developmental delay of the fetal skeleton, but does not cause externally visible malformations in rat fetuses, in this experimental procedure.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Selenium; Diphenyl diselenide; Toxicity; Fetal development; Growth retardation; Pregnancy

### 1. Introduction

In recent years, selenium (Se) has become an important trace element studied. Selenium is an essential trace element for man and is known for its role in regulating growth and development of the fetus and newborn [1]. Selenium is required for the intracellular antioxidant system as a structural component of the active center of glutathione peroxidase and other antioxidant selenoproteins [2]. Some studies have suggested that selenium deficiency is related to adverse outcomes of pregnancy and decreased maternal selenium levels have been related to miscarriages [3,4] and pre-term deliveries [5].

Several selenium compounds such as selenate, selenite and selenomethionine may be powerful toxicants, both in humans and animals [6] and teratogens in vivo [7]. It was shown that rat embryos had susceptibility to Se teratogenicity. Usami et al. have reported that selenite or selenate alone increased the incidence

of embryonic malformation in rat embryo culture [8]. Furthermore, previous studies evaluating the role of teratogenic effects of sodium selenite showed pericardial edema and deformities of skeletal tissues from fishes exposed to it [9].

Organochalcogens are important intermediates and useful reagents in organic synthesis [18,10], which can increase human exposure risk to these chemicals in the workplace. Our group has exhaustively studied the toxicology and pharmacology of organoselenium compounds [10]. Therefore, (PhSe)<sub>2</sub> has been reported as an antiulcer, antisecretory [11], antiinflammatory and antinociceptive compound [12]. In vitro and ex vivo studies have also demonstrated that organoselenium compounds are potential antioxidant compounds [13,14] and this activity could be related to the protective effect of 100 μmol/kg (30 mg/kg) (PhSe)<sub>2</sub> against 2-nitropropane induced hepatic damage [15]. Regarding the toxicity of organoselenium compounds, we have recently reported that a single high dose of (PhSe)<sub>2</sub>, given acutely to dams at (a particular) different day of gestation, increased the incidence of fetuses skeletal anomalies and caused delay on growth and intrauterine development [16]. Besides, a low dose of diphenyl ditelluride, a structural

\* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8140; fax: +55 55 3220 8978.  
E-mail address: [gzeni@quimica.ufsm.br](mailto:gzeni@quimica.ufsm.br) (G. Zeni).

analogous of (PhSe)<sub>2</sub>, showed a potential teratogenicity in rats [17].

Taking this in consideration, we delineated the present study in an attempt to investigate the effects of (PhSe)<sub>2</sub>, when administered at repeated doses during the period of organogenesis (GD 6–15) to dams, on rat offspring. Thus, the current study design differs from the previous one [16] as in the timing of administration as in the dosing scheme.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Test chemical

Diphenyl diselenide was synthesized according to literature methods [18]. Analysis of the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra showed that (PhSe)<sub>2</sub> obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of (PhSe)<sub>2</sub> (99.9%) was determined by GC/HPLC.

### 2.2. Animals

Sexually naive female Wistar rats (180–250 g) from our own breeding colony were used. The animals were maintained on a 12-h light:12-h dark cycle, in an air-conditioned room (22–24 °C), with free access to water and food (GUABI, RS, Brazil). The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil.

### 2.3. Experimental procedure

Virgin female rats in the proestrous and estrous phases of the cycle were mated overnight with young male rats previously determined to be fertile (three females were cohabited with one male). The day when sperm was detected in the vaginal smears was considered to be day 0 of pregnancy. Pregnant rats were removed, distributed on a random basis into groups of 12–13 pregnant dams each and housed individually in standard polypropylene plastic cages (41 cm × 34 cm × 18 cm) with wood shavings as bedding. The dams received 1.5, 3.0 and 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> by subcutaneous (s.c.) injection on gestation days (GD) 6–15. The volume of each dose was adjusted to 1 ml/kg total body weight. Control groups received only canola oil (vehicle, 1 ml/kg) (BUNGE Alimentos SA, Brazil). Dams were daily examined for obvious signs of illness. Maternal weight was recorded daily to GD 20. Food intake was performed during the pregnancy study to exclude that the effects of (PhSe)<sub>2</sub> were a result of a reduction in food intake.

The doses used in this study were determined based on the data previously reported by us, in which an acute administration of different doses of (PhSe)<sub>2</sub>, 50 and 100 mg/kg, at a particular day of gestation, did not affect any parameter and increased the incidence of skeletal anomalies, respectively [16]. Since the doses of (PhSe)<sub>2</sub> used in this study are cumulative, an animal receiving 3.0 mg/kg/day for 10 days would be exposed to 30 mg/kg total. Thus, the maximal dose of (PhSe)<sub>2</sub> attained in 10 days was 60 mg/kg.

On gestational day 20, dams were submitted to euthanasia by chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) and their uterine horns were removed. The maternal uterus, liver, brain, kidneys and spleen were removed and weighed. The number of implantation sites, resorptions, dead and live fetuses were also

Table 1  
Maternal findings of dams exposed to diphenyl diselenide during organogenesis

Parameters	Control	(PhSe) <sub>2</sub> (mg/kg per day)		
		1.5	3.0	6.0
No. Of dams	12	13	13	12
Body weight on GD 0	204.33 ± 15.56	205.31 ± 16.11	208.38 ± 13.95	201.92 ± 11.76
Body weight gain (g)				
Days 0–20 (gestational period)	86.50 ± 10.89	74.15 ± 18.23*	66.08 ± 14.48**	64.08 ± 14.34**
Days 6–15 (treatment period)	28.67 ± 7.01	20.62 ± 7.63**	17.54 ± 6.59**	11.58 ± 5.90**
Corrected body weight gain (g) <sup>a</sup>	31.15 ± 6.20	25.55 ± 12.79	18.90 ± 9.34*	19.90 ± 14.28*
Corrected body weight <sup>b</sup>	235.48 ± 18.03	230.86 ± 25.01	227.70 ± 11.16	221.83 ± 17.89
Gravid uterus weight (g)	55.35 ± 12.57	48.61 ± 9.15	50.14 ± 12.12	44.18 ± 10.32*
Organ weight on GD 20				
Brain (g)	1.77 ± 0.06	1.77 ± 0.07	1.75 ± 0.06	1.76 ± 0.08
Per body weight (%) <sup>c</sup>	0.76 ± 0.06	0.78 ± 0.10	0.77 ± 0.04	0.80 ± 0.08
Liver (g)	11.68 ± 1.09	12.10 ± 1.65	12.05 ± 0.76	11.87 ± 1.66
Per body weight (%)	4.97 ± 0.40	5.23 ± 0.31	5.29 ± 0.22*	5.33 ± 0.37*
Kidney (g)	0.76 ± 0.07	0.82 ± 0.09	0.76 ± 0.07	0.78 ± 0.08
Per body weight (%)	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.06*	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03
Spleen (g)	0.66 ± 0.12	0.65 ± 0.19	0.64 ± 0.14	0.61 ± 0.18
Per body weight (%)	0.28 ± 0.05	0.28 ± 0.07	0.28 ± 0.06	0.27 ± 0.07
Organ/brain ratios (%)				
Liver	661.0 ± 65.0	681.0 ± 91.0	689.0 ± 41.0	676.0 ± 108.0
Kidney	43.0 ± 5.0	46.0 ± 6.0	43.0 ± 4.0	45.0 ± 6.0
Spleen	37.0 ± 6.0	37.0 ± 10.0	37.0 ± 8.0	35.0 ± 10.0

Data are expressed as mean ± S.D.

<sup>a</sup> Corrected body weight gain = maternal body weight gain on GD 0–20 minus gravid uterus weight.

<sup>b</sup> Corrected body weight = final body weight minus gravid uterus weight.

<sup>c</sup> Relative weight calculated using corrected body weight.

\* Significantly different from the control group at  $P < 0.05$ .

\*\* Significantly different from the control group at  $P < 0.01$ .

recorded. The fetuses and their respective brains, livers and placentas were weighed. These fetuses were examined under magnification for gross external malformation. The viability of the fetuses was determined by the presence of spontaneous breathing or responses to tactile stimulation. Findings were classified according to currently used nomenclature [19]. Fetal biometry was performed [20]: crown-rump (CR) length; occipito-nasal length; trans-cervical diameter; trans-umbilical diameter. To identify internal skeletal alterations, one-third of the live fetuses from each litter were preserved in 70% ethanol and later in acetone, glycerol (Merck) and alcohol benzylic (Sigma, St. Louis, MO). After that, they were stained with Alizarin Red S (VETEC, Rio de Janeiro, Brazil) by the technique described by Staples and Schnell [21].

#### 2.4. Histopathology study

Six placentas from each group were randomly selected for a microscopic morphology analysis. The placentas were cut in two equal parts, placed in a solution of 10% formalin, pH 7.4 phosphate-saline and embedded in paraffin. Sections 4  $\mu$ m thick were obtained and stained with haematoxylin-eosin or Schiff periodic acid to further analysis in a light microscope. Scores were attributed for each alteration according to the predominance of alterations on the slides evaluated as absent (0), reduced (1), moderate (2) or intense (3).

#### 2.5. Statistical analysis

The litter was used as the experimental unit. Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test for paired comparisons between groups, when appropriate. For histopathological analysis, groups were examined using Kruskal-Wallis test to determine the differences among groups. Whenever a significant trend was noted, pairwise comparisons

were made using the Mann-Whitney *U*-test. A value of  $P < 0.05$  was considered to be significant.

### 3. Results

#### 3.1. Maternal observation

The maternal findings for pregnant rats treated subcutaneously with (PhSe)<sub>2</sub> on days 6–15 of pregnancy are presented in Table 1. Neither maternal death nor behavioral changes were observed. Accordingly, no treatment-related gross findings were observed at necropsy of the dams in any group. (PhSe)<sub>2</sub>, at all doses, induced a significant decrease in the body weight gain (GD 0–20) and in the interval GD 6–15 (treatment period). Treatment with 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> caused a significant decrease in gravid uterus weight. A statistically significant reduction in corrected weight gain (whole pregnancy weight gain minus gravid uterus weight) was observed at 3.0 and 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>-exposed dams. However, corrected body weight (final body weight minus gravid uterus weight) was not affected by (PhSe)<sub>2</sub>. An increase in relative weight (relative organ-to-body weight ratio) of liver was observed at 3.0 and 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>. There was also an increase in the relative weight of kidneys in pregnant rats exposed to 1.5 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> during organogenesis. The relative organ-to-brain-weight ratio remained unaltered (Table 1). Food consumption during gestation was similar in all groups (data not shown).

Table 2  
Reproductive findings of dams exposed to diphenyl diselenide during organogenesis

Parameters	Control	(PhSe) <sub>2</sub> (mg/kg per day)		
		1.5	3.0	6.0
Litters	12	13	13	12
Implantations sites/litter	10.50 ± 2.35	10.15 ± 1.86	10.15 ± 2.61	9.08 ± 1.88
Resorptions/litter	0.25 ± 0.62	0.77 ± 1.01	0.23 ± 0.83	0.58 ± 0.99
Live fetuses/litter	10.08 ± 2.35	9.31 ± 1.84	9.92 ± 2.56	8.50 ± 2.20
Dead fetuses/litter	0.08 ± 0.29	0.08 ± 0.28	0	0
Prenatal loss (per implantation sites/litter) <sup>a</sup>	3.12 ± 6.29	8.14 ± 9.40	1.92 ± 6.93	6.85 ± 13.02
Fetal body weight (g) <sup>b</sup>	3.27 ± 0.17	3.02 ± 0.14**	3.00 ± 0.17**	3.01 ± 0.27**
Placental weight (g) <sup>b</sup>	0.47 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.50 ± 0.04
Fetal biometry (cm) <sup>b</sup>				
CR length	3.57 ± 0.08	3.47 ± 0.07*	3.43 ± 0.11**	3.43 ± 0.12**
Occipito-nasal length	1.52 ± 0.03	1.49 ± 0.02	1.48 ± 0.04*	1.49 ± 0.04
Trans-cervical diameter	0.90 ± 0.05	0.89 ± 0.04	0.88 ± 0.04	0.87 ± 0.07
Trans-umbilical diameter	1.17 ± 0.02	1.18 ± 0.06	1.17 ± 0.04	1.18 ± 0.07
Fetal organ weights (g) <sup>b</sup>				
Brain	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01*
Per body weight (%)	4.81 ± 0.20	5.07 ± 0.20*	5.10 ± 0.22*	4.97 ± 0.44
Liver	0.27 ± 0.02	0.24 ± 0.04**	0.24 ± 0.02*	0.24 ± 0.03*
Per body weight (%)	8.35 ± 0.50	7.95 ± 0.97	8.09 ± 0.57	8.09 ± 0.60
Fetal organ/brain ratio (%) <sup>b</sup>				
Liver	174.0 ± 14.0	157.0 ± 20.0*	159.0 ± 15.0	164.0 ± 20.0

Data are expressed as means ± S.D.

<sup>a</sup> Prenatal loss (per implantation sites/litter) is presented as % of non-live implantation sites per litter.

<sup>b</sup> Fetal endpoints were calculated as the group mean of the averages for each litter (*n* = number of litters).

\* Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

\*\* Significantly different from the control at  $P < 0.01$ .

Table 3  
Skeletal examination in fetuses of dams exposed to diphenyl diselenide during organogenesis

Parameters	Control	(PhSe) <sub>2</sub> (mg/kg per day)		
		1.5	3.0	6.0
Total fetuses (litter) examined	37 (12)	36 (12)	38 (13)	35 (12)
Skeletal alterations <sup>a</sup>				
Skull				
Frontal				
Incomplete ossification	2.78 ± 2.78	24.99 ± 11.71 <sup>*</sup>	10.25 ± 5.81	8.33 ± 4.35
Parietal				
Incomplete ossification	8.33 ± 5.98	33.32 ± 10.87 <sup>*</sup>	26.90 ± 6.93	20.82 ± 6.85
Interparietal				
Incomplete ossification	8.33 ± 5.98	43.03 ± 9.29 <sup>*</sup>	41.01 ± 11.40 <sup>*</sup>	20.82 ± 7.98
Supraoccipital				
Incomplete ossification	16.65 ± 8.71	30.53 ± 9.59	42.28 ± 9.35	36.08 ± 7.63
Bipartite	0	15.96 ± 6.36 <sup>*</sup>	10.25 ± 4.43	8.33 ± 4.35
Asymmetric	2.78 ± 2.78	2.78 ± 2.78	7.68 ± 3.89	8.33 ± 5.98
Squamosal				
Incomplete ossification	0	8.33 ± 8.34	5.12 ± 3.47	5.78 ± 2.78
Zygomaticum				
Incomplete ossification	2.78 ± 2.78	2.78 ± 2.78	0	2.78 ± 2.78
Slight fused with Pj. os maxilla	0	0	2.56 ± 2.56	0
Maxilla				
Incomplete ossification	0	8.33 ± 8.34	0	0
Cervical vertebrae				
Incomplete ossification	0	5.55 ± 5.56	10.25 ± 6.93	19.43 ± 8.67 <sup>*</sup>
Thoracic vertebrae				
Incomplete ossification	0	5.55 ± 5.56	7.68 ± 5.53	0
Sternebrae				
Incomplete ossification	37.48 ± 8.74	79.15 ± 8.99 <sup>*</sup>	79.46 ± 8.03 <sup>*</sup>	69.40 ± 6.44 <sup>*</sup>
Misshapened	34.69 ± 7.24	54.84 ± 10.40	60.23 ± 9.15	51.36 ± 9.51
Bipartite	2.78 ± 2.78	2.78 ± 2.78	7.68 ± 4.04	0
Fused	0	0	2.56 ± 2.56	0
Ribs				
Incomplete ossification	0	5.55 ± 5.56	0	0
Short supernumerary <sup>b</sup>				
Bilateral	8.33 ± 4.35	11.10 ± 4.74	10.25 ± 5.81	15.27 ± 6.95
Unilateral	13.18 ± 6.28	5.55 ± 3.75	12.82 ± 8.03	8.33 ± 5.98
Wavy	0	5.55 ± 5.56	0	11.10 ± 4.74 <sup>*</sup>
Pubis				
Incomplete ossification	0	5.55 ± 5.56	0	0
Ischium				
Incomplete ossification	0	11.11 ± 8.55	0	0
Forepaw				
Incompl. oss. of metacarpal bones	0	10.42 ± 8.41	2.56 ± 2.56	2.78 ± 2.78
Digits incompletely ossified	0	32.63 ± 12.34 <sup>*</sup>	23.06 ± 8.74	11.10 ± 6.27
Hindpaw				
Incompl. oss. of metatarsal bones	2.78 ± 2.78	10.41 ± 6.08	5.12 ± 3.47	2.78 ± 2.78
Digits incompletely ossified	13.88 ± 9.60	52.07 ± 12.07 <sup>*</sup>	57.67 ± 10.08 <sup>*</sup>	44.42 ± 10.34 <sup>*</sup>
Lumbar vertebrae				
Incomplete ossification	0	8.33 ± 8.34	0	2.78 ± 2.78
Sacral vertebrae				
Incomplete ossification	41.65 ± 12.41	65.24 ± 7.25	78.17 ± 5.13 <sup>*</sup>	58.31 ± 11.71
Caudal bones				
Incomplete ossification	9.72 ± 5.22	32.62 ± 10.08	46.13 ± 11.01 <sup>*</sup>	33.32 ± 10.06

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

<sup>a</sup> Data are presented as mean percentage of fetuses affected per litter (mean ± S.E.M.).

<sup>b</sup> Lumbar ribs, they measured one half and more than one half the length of the last thoracic ribs.

<sup>\*</sup>  $P < 0.05$  compared to the control group by one-way ANOVA.



### 3.2. Reproductive findings

No litters totally resorbed were found in any group. No significant differences were observed in the number of implantation sites, resorptions as well as dead and live fetuses in treated groups when compared to those of the control group (Table 2). The body weight of fetuses obtained from dams treated with 1.5, 3.0 and 6.0 mg/kg of (PhSe)<sub>2</sub> was significantly lower than in the control group.

There were no changes in the placental weight among groups. Exposure of 1.5, 3.0 and 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> caused a reduction in the crown-rump length of fetuses when compared to the control group. The occipito-nasal length was found decreased in fetuses which dams received 3.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> during organogenesis. In contrast, (PhSe)<sub>2</sub> did not induce significant changes in trans-cervical and trans-umbilical diameters. The absolute fetal brain weight was significantly decreased when the higher dose of (PhSe)<sub>2</sub> was administered to dams. Conversely, fetal brain weight relative to body weight was significantly increased in the 1.5 and 3.0 mg/kg groups (Table 2).

(PhSe)<sub>2</sub> exposure, at all doses, induced a reduction in absolute fetal liver weight, but relative weight remained unaltered. Besides, a reduction in the liver-to-brain-weight ratio from fetuses whose mothers received 1.5 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> was observed (Table 2).

### 3.3. Skeletal examination

There was an increase in the incidence of litters with skeletal alterations in all (PhSe)<sub>2</sub> treated groups (Table 3). Statistically significant skeletal alterations such as incomplete ossification of frontal, parietal and interparietal bones, of sternebrae, of forepaw and hindpaw digits and supraoccipital bipartite were seen in fetuses of pregnant rats treated with 1.5 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>.

In 3.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> group, skeletal alterations statistically significant were: incomplete ossification of interparietal, sternebrae and hindpaw digits, and an increase in the incomplete ossification of sacral vertebrae and caudal bones.

In 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> group, there was a statistically significant increase in the incomplete ossification of cervical vertebrae, sternebrae and hindpaw digits as well as the appearance of wavy ribs.

### 3.4. Histopathology evaluation

In general, placentas from the dams treated with (PhSe)<sub>2</sub> showed alterations when compared to the control group, but these alterations were not dose-related. At maternal–fetal interface, degeneration of trophoblast giant cells and vascular congestion were observed. Moreover, a statistically significant increase in leukocyte infiltration was found in groups treated with 1.5 and 3.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> ( $H=8.89$ ,  $P=0.015$ ). In the

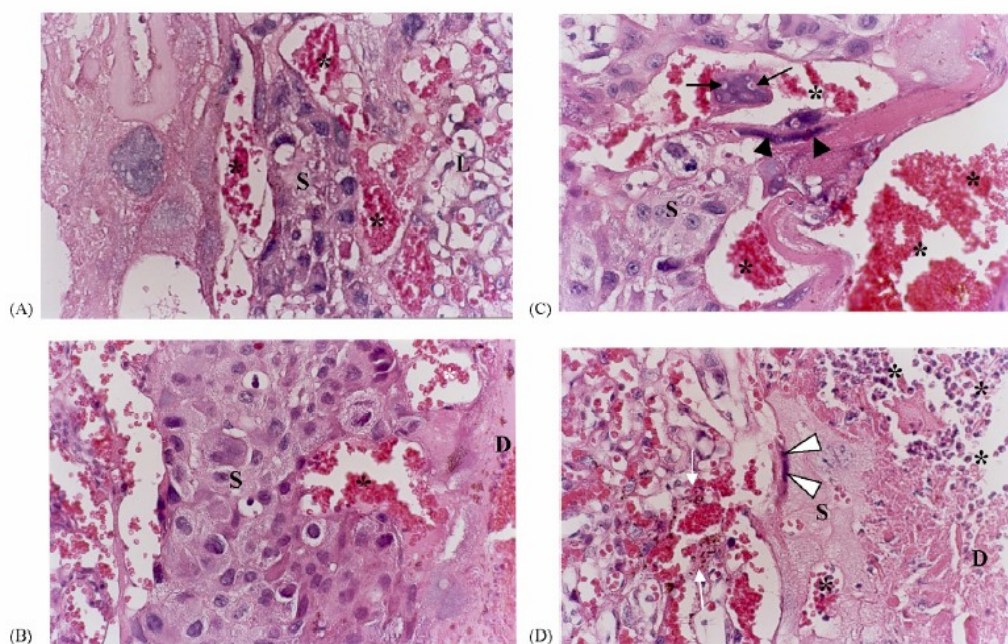


Fig. 1. Photomicrographs from placentas of control dams (A) and dams exposed to 1.5 (B), 3.0 (C) and 6.0 (D) mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> during organogenesis. Note the vascular congestion (\*) and cells degeneration (▲) in the spongiosotrophoblast. Trophoblast giant cells with a marked phagocytic activity (→). Spongiosotrophoblast (S), labyrinth (L) and decidua (D) (HE,  $\times 400$ ).

spongiotrophoblast area, cells exhibited large number of phagosomes, undifferentiated cells predominated and a significant increase in the number of glycogen cells was observed at all (PhSe)<sub>2</sub> doses ( $H=10.09$ ,  $P=0.014$ ). In the labyrinth, hemorrhage and an extensive area of cells degeneration, vascular congestion as well as multiple areas containing hemosiderin deposits in all doses tested were observed, but these alterations were not statistically significant (Fig. 1).

#### 4. Discussion

Selenium, as an integral component of the enzyme glutathione peroxidase, plays an important role during pregnancy [22]. It is believed that deficiency of selenium in humans and animals may be the cause of some health complications [22–24]. Selenium, at low concentrations, is an essential biological trace element necessary for growth of animals and men, but it has toxic effects at high concentrations [25].

The maternal body weight gain can be influenced by developmental effects (reduced litter size and reduced fetal weight), thus, when the developmental toxicity is absent alterations in this parameter can be interpreted as an indicator of maternal toxicity. The results of this study demonstrated that (PhSe)<sub>2</sub> exposure reduced the body weight gain during treatment at all (PhSe)<sub>2</sub> doses, while corrected body weight gain was reduced only at 3.0 and 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>.

Relative weights of liver (at 3.0 and 6.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>) were increased, without affecting absolute weights. Since corrected body weight did not differ among groups, these results were interpreted as an indicative of primary target organs toxicity. In fact, the liver is vulnerable to chemical injuries due to its anatomical proximity to the blood supply and digestive tract as to its ability to bio-transform and concentrate xenobiotics [26]. Accordingly, there are evidences that (PhSe)<sub>2</sub> increases liver-to-body weight ratio when given to mice [27].

The placenta and the extraembryonic membranes are essential interfaces between the mother and the embryo/fetus. These membranes participate in the nutrition process, nutrient transport and hormonal control. Selenium efficiently crosses the placenta and is distributed in fetal tissues [28,29]. Placental transfer is significantly moderated by free drug characteristics (such as lipid solubility, degree of ionization and molecular weight) and placental properties (maternal and fetal blood flow, drug metabolism and placental age). It is evident that chemicals with a molecular weight <600 may readily cross the placenta [30]. We have suggested that (PhSe)<sub>2</sub>, due to its lipid solubility and molecular weight could cross the placenta. However, direct transfer of (PhSe)<sub>2</sub> to embryonic tissues has not yet been determined. In agreement, the exposure of dams to (PhSe)<sub>2</sub> led to some alterations in placental morphology, such as vascular congestion, which may be interpreted as a compensatory mechanism, improving the exit of liquids from the vascular system, diluting the toxic molecules at the cellular level and increasing the total amount of cells in order to replace cells [31] exposed to (PhSe)<sub>2</sub>. Cell degeneration and an increase in phagocytosis were also observed, suggesting that (PhSe)<sub>2</sub> could cause damage and death of cells, which stimulate the trophoblast cells to

phagocytose and remove damaged cells. Furthermore, exposure to (PhSe)<sub>2</sub> led to an increase in the number of glycogen cells, which are derived from the spongiotrophoblast layer. It has been proposed that glycogen cells have a protective role, allowing maternally and fetally derived cells to co-exist in the placenta [32]. The role of the decidual leukocyte cells in pregnancy maintenance has not yet been elucidated. During early pregnancy, an increase in the leukocyte populations relative to normal mid-secretory phase endometrium occurs [33]. In this study, there was an increase in leucocyte infiltration, which may suggest a suppression of a maternal immune response to a semiallogenic fetus, limiting trophoblast invasiveness and preventing the transmission of pathogens to the fetus [34]. These results allow us to infer that in the presence of (PhSe)<sub>2</sub> relevant alterations associated with a possible compensatory adjustment to maintain an adequate metabolic exchange took place in the structure of the placenta. Taken together, these alterations may decrease the functional role of the placenta and contribute with adverse reproductive outcomes.

In the present study, no significant increase in the number of implantation sites, resorptions as well as dead and live fetuses were found, indicating that (PhSe)<sub>2</sub> did not affect embryonic/fetal survival when administered through days 6–15 of pregnancy. Prenatal exposure to (PhSe)<sub>2</sub> caused intrauterine growth retardation, represented by a decrease in the fetuses body weight and crown-rump length, and a significant reduction in occipito-nasal length at 3.0 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>. In fetal brain, absolute weight was reduced in the higher dose, probably indicating a brain-sparing phenomenon. This phenomenon may suggest that (PhSe)<sub>2</sub> may be preferentially neurotoxic, and warrant further study of developmental neurotoxicity.

Of the findings observed herein, parameters of skeletal ossification appeared to be more sensitive than fetal body weight to the growth retardation effects of (PhSe)<sub>2</sub>. In a recent study, Favero et al. [16] reported that acute administration of 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> during GD 7–12 caused a reduced ossification of skeleton, a sign of developmental delay, but did not induce external malformations. In addition, the same dose, when injected at GD 9 reduced the fetal body weight and CR length implying that exposure to (PhSe)<sub>2</sub> impaired intrauterine growth. In this study, signs of delayed ossification in several body structures such as skull, sternbrae and limbs were significant in (PhSe)<sub>2</sub>-treated groups. In fact, a decrease in the degree of ossification was accompanied by a reduction in the fetal weight in all (PhSe)<sub>2</sub> groups. These findings reveal a relation between morphological alterations and growth retardation in fetuses, but none of the changes appeared to be dose-dependent.

All doses of (PhSe)<sub>2</sub> affected body weight of mothers and a dose–response was observed with maternal toxicity evident at 3.0 and 6.0 mg/kg, but not at 1.5 mg/kg. In fact, developmental toxicity was observed in the absence of maternal toxicity at the lower dose. Furthermore, statistical comparisons revealed a lack of a dose–response specifically for developmental toxicity.

Based on the results mentioned above, it was concluded that repeated administration of (PhSe)<sub>2</sub> to pregnant rats in the period of organogenesis induced adverse effects on maternal rats and on embryonic/fetal growth. To better understand (PhSe)<sub>2</sub> effects,

additional studies should be carried out to determine the kinetics and metabolism of this compound and to investigate the mechanisms involved in the reproductive parameters toxicity.

### Acknowledgements

The financial support by UFSM (FIPE), FAPERGS, CAPES and CNPq are gratefully acknowledged. C.W.N., J.B.T.R. and G.Z. are the recipients of CNPq fellowships.

### References

- [1] Ewan RC. Effect of selenium on rat growth, growth hormones and diet utilization. *J Nutr* 1976;106:102–9.
- [2] Burk RF, Hill KE, Motley AK. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein. *P J Nutr* 2003;133:1517–20.
- [3] Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S, Roberts A. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:130–2.
- [4] Al-Kunani AS, Knight R, Haswell SJ, Thompson JW, Lindow SW. The selenium status of women with a history of recurrent miscarriage. *BOJG* 2001;108:1094–7.
- [5] Dobrzynski W, Trafikowska U, Trafikowska A, Pilecki A, Szymanski W, Zachara BA. Decreased selenium concentration in maternal and cord blood in preterm compared to term deliveries. *Analyst* 1998;123:93–7.
- [6] Environmental Health Criteria. Selenium. Geneva: World Health Organization, 1987.
- [7] Willhite CC. Selenium teratogenesis. Species-dependent response and influence on reproduction. *Ann NY Acad Sci* 1993;678:169–77.
- [8] Usami M, Tabata H, Ohno Y. Effects of ascorbic acid on selenium teratogenicity in cultured rat embryos. *Toxicol Lett* 1999;105:123–8.
- [9] Teh SJ, Deng X, Teh FC, Hung SO. Selenium-induced teratogenicity in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Mar Environ Res* 2002;54:605–8.
- [10] Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004;104:6255–86.
- [11] Savegnago L, Trevisan M, Alves D, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006;21:86–92.
- [12] Nogueira CW, Quinhones EB, Jung EAC, Zeni G, Rocha JBT. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 2003;52:56–63.
- [13] Meotti FC, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 2004;94:276–82.
- [14] Santos FW, Zeni G, Rocha JBT, Weis SN, Fachinetto JM, Favero AM, et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem-Biol Interact* 2005;151:159–65.
- [15] Borges LP, Borges VC, Moro AV, Rocha JBT, Nogueira CW, Zeni G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 2005;210:1–8.
- [16] Favero AM, Weis SN, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 2005;20:561–8.
- [17] Stangherlin EC, Favero AM, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Teratogenic vulnerability of rat fetuses to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 2005;207:231–9.
- [18] Paulmier C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C, editor. Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. 1st ed. Oxford, England: Pergamon Press; 1986. p. 25–51.
- [19] Chahoud I, Buschmann J, Clark R, et al. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. *Reprod Toxicol* 1999;13:77–82.
- [20] Perez-D'Gregorio RE, Miller RK. Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. *Teratology* 1988;37:307–16.
- [21] Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol* 1964;39:61–3.
- [22] Zachara BA, Wardak C, Didkowski W, Maciag A, Marchaluk E. Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 1993;35:12–7.
- [23] Lockitch G. Selenium: clinical significance and analytical concepts. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27:483–541.
- [24] Bedwal RS, Nair N, Sharma MP, Mathur RS. Selenium: its biological perspectives. *Med Hypotheses* 1993;41:150–9.
- [25] Shamberger RJ. Selenium metabolism and function. *Clin Physiol Biochem* 1986;4:42–9.
- [26] Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Bruccoleri A, Blazka ME, Yucsey B. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2001;120:317–21.
- [27] Maciel EN, Flores EMM, Rocha JBT, Folmer V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney and brain of mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003;70:470–6.
- [28] Shariff MA, Krishnamurti CR, Schaefer AL, Heindze AM. Bidirectional transfer of selenium across the sheep placenta in utero. *Can J Anim Sci* 1984;64:252–4.
- [29] Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 1994;50:626–40.
- [30] Mirkin BL. Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther* 1973;14:643–7.
- [31] Fuentes M, Torresgrosa A, Mora R, Götzens V, Corbella J, Domingo JL. Placental effects of lead in mice. *Placenta* 1996;17:371–6.
- [32] Zybyna TG. Glycogen-containing cells in the maternal and embryonic portions of the placenta in the rat and the common vole *Microtus subarvalis*. *Tsitologia* 1988;30:1180–7.
- [33] Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991;6:791–8.
- [34] King A, Løke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 1991;12:432–5.

3.2.- EFEITOS DO DISSELENETO DE 3'3-DITRIFLUORMETILDIFENILA  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO DA PROLE DE RATAS  
WISTAR EXPOSTAS A ESSE COMPOSTO DURANTE A ORGANOGÊNESE

Manuscrito

**TOXICITY OF 3'3-DITRIFLUORMETHYLDIPHENYL  
DISELENIDE ADMINISTERED DURING  
INTRA-UTERINE DEVELOPMENT OF RATS**

WEIS, S.N., SOUZA, C.S., ROMAN, S.S.,  
NOGUEIRA, C.W., ZENI, G.

Submetido à revista Food and Chemical Toxicology, está em fase de revisão

**Toxicity of 3,3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide  
administered during intra-uterine development of rats**

Weis S.N.<sup>a</sup>, Mota C.S.<sup>a</sup>, Roman S.S.<sup>a,b</sup>,  
Nogueira C.W.<sup>a</sup>, Zeni G.<sup>a,\*</sup>

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

<sup>b</sup>Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim, RS, CEP 99700-000 Erechim, Brazil

**Running Title:** Toxicity of an organoselenide on gestation

Correspondence should be sent to:

Gilson Zeni

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

Phone: 55-55 3220-8140

FAX: 55-55-3220-8978

E-mail: [gzeni@quimica.ufsm.br](mailto:gzeni@quimica.ufsm.br) (Zeni G)

**Abstract**

The aim of this study was to assess the effects of the organoselenium compound, 3,3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide [(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>], during the intra-uterine development of Wistar rats. Dams were given repeated doses of 1, 5 or 10 mg/kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> by intragastric route on gestation days 6 to 15, and cesarean sections were performed on day 20 of pregnancy. The numbers of implantation sites, living and dead fetuses and resorptions were recorded. Fetuses were weighed and stained with Alizarin red S for skeletal evaluation. The placental morphology was also evaluated. In 1 mg/kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> group, neither maternal toxicity nor prenatal growth retardation was observed. Conversely, in 5 and 10 mg/kg groups, there was a decrease in maternal weight gain during pregnancy indicating that (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> was maternally toxic, without affecting fetuses weight and length. (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> caused some morphological alterations in placenta of 5 and 10 mg/kg-exposed dams. Results also showed that skeletal variations were produced by (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> only at doses ( $\geq$  10 mg/kg) in which a marked embryoletality was found. We conclude that (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> was toxic to the dams and induced embryofeto-toxicity at doses  $\geq$  10 mg/kg.

**Key words:** selenium, gestation, toxicity, skeletal, placenta, organoselenium.

## 1. Introduction

Selenium (Se) is an essential trace element for man and is known for its role in regulating growth and development of the fetus and newborn (Ewan, 1976). Se, a potent antioxidant, constitutes an essential component of glutathione peroxidase (GPx) (Flohé et al., 1973; Shamberger, 1983), an enzyme that catalyzes the degradation of lipid peroxides and hydrogen peroxide. Biological function of Se in mammals appears to be expressed through biologically active compounds including GPx (Behne et al., 1996) and other selenoproteins in serum and tissues (Hill et al., 1996).

In general, pregnancy places increased nutritional demands upon the mother (Pitkin, 1977). Although maternal serum levels of Se are decreased during pregnancy (Behne et al, 1976, 1978; Hinks et al, 1989; Wilson et al, 1991), Se requirements appear to be increased (Bro et al, 1988). Data on literature show that Se levels in the placenta are higher than those of the maternal serum (Korpela et al, 1984) and supplementation during pregnancy results in higher maternal serum levels which suggests the presence of increased demand on maternal Se stores (Bro et al, 1988; Koller et al., 1984). Additionally, the levels of Se are higher in fetal liver than the placenta (Alexiou et al, 1977) suggesting an active sequestering by the fetal liver during late pregnancy (Willhite et al., 1990).

Organoselenium have been found to be less toxic than inorganic Se compounds, as a result, there has been a growing interest in the synthesis of organoselenium compounds with respect to their use in enzymology and bioorganic chemistry (Sk and Bhattacharya, 2006). In this regard, our research group has reported that diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>], has many pharmacological properties such as antiulcer (Savegnago et al., 2006), anti-inflammatory and anti-nociceptive (Nogueira et al., 2003a), antidepressant-like effect (Savegnago et al., 2007), neuroprotector (Ghisleni et al.,

2003), and antioxidant (Meotti et al., 2004; Borges et al., 2005; Santos et al., 2005). Conversely, during the gestational period, (PhSe)<sub>2</sub> may be harmful to fetal development (Favero et al., 2005; Weis et al., 2007).

In view that a number of novel pharmaceutical agents which are Se-based or which target specific aspects of Se metabolism are under development, the main objective of this study was to investigate the effects of 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide [(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] administration during intra-uterine development of Wistar rats.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Chemicals**

3'3-Ditrifluoromethyldiphenyl diselenide [(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] was prepared according to literature methods (Paulmier, 1986). Analysis of the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra showed that (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of the compound (99.9%) was determined by GC/HPLC. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### **2.2. Animals**

Male and nulliparous female rats of Wistar strain (180-220 g) from our own breeding colony were used in this study. The animals were maintained on a 12-h light/dark cycle, in an air-conditioned room (22-24°C), with free access to water and food (GUABI, RS, Brazil). The animal protocols were approved by the Committee on



Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

### **2.3. Experimental procedure**

Virgin female rats in the proestrous and estrous phases of the cycle were mated overnight with young male rats previously determined to be fertile (three females were cohabited with one male). The day when sperm was detected in the vaginal smears was considered to be day 0 of pregnancy (GD 0). Following positive identification of mating, females were distributed on a random basis into groups and housed individually in standard polypropylene plastic cages (41x34x18cm) with wood shavings as bedding.

Pregnant rats were given repeated doses of 1, 5 or 10 mg/kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> by intragastric route on gestation days (GD) 6 to 15. Control groups received only canola oil (vehicle, 1mL/kg). Dams were daily examined for obvious signs of illness. Maternal weight was recorded daily to GD 20. Food consumption was performed during the pregnancy study. On GD 20, dams were sacrificed and the uterine contents were examined.

The maternal uterus, liver, brain, kidneys and spleen were removed and weighed. The organs data were used to calculate the relative organs weight (relative organ-to-body weight ratio). The maternal body weight gain (gestational and treatment period), corrected body weight (final body weight minus gravid uterus weight) and corrected body weight gain (whole pregnancy weight gain minus uterine weight) were also calculated. Subsequently, the number of implantation sites, resorptions, dead and live fetuses were counted. The fetuses were measured for length from crown to rump (biometry) and their respective brains, livers and placentas were weighed. These fetuses were examined under magnification for gross external malformation. The viability of

the fetuses was determined by the presence of spontaneous breathing or responses to tactile stimulation. A sample of the live fetuses were cleared, stained with Alizarin red S according to the method described by Staples and Schnell (1964), and examined under a stereoscopic microscope for skeletal anomalies and variations, and for the numbers of ossified bones (degree of ossification) of the body.

#### **2.4. Histopathological study**

Four placentas from each group were randomly selected for a microscopic morphology analysis. The placentas were cut in two equal parts, placed in a solution of 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4  $\mu\text{m}$  and then stained with haematoxylin-eosin or Schiff periodic acid to further analysis in a light microscope. Scores were attributed for each alteration according to the predominance of alterations on the slides evaluated as absent (0), reduced (1), moderate (2) or intense (3).

#### **2.5. Statistical analysis**

The litter was used as the experimental unit. Data were evaluated either by one-way analysis of variance (ANOVA) and the Duncan post hoc test, or by the Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney *U*-test (histopathological analysis). Proportions were analyzed by the chi-square test. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

### **3. Results**

#### **3.1. Maternal findings**

No compound-related clinical signs or behavioral anomalies were observed in the dams during or after treatment. On GD 0–20, no decreased mean food consumption

was observed in all treated groups (data not shown), but there was a significant decrease in 10 mg/kg group during the treatment period, GD 6–15 (Table 1). The food consumption of the highest dose group recovered during the post-treatment period, GD 16–20. Associated with the low food consumption, a significant decrease in the body weight gain (gestational and treatment period) was also observed in the 10 mg/kg group. Furthermore, corrected body weight and corrected body weight gain as well as gravid uterus weight were decreased in the 10 mg/kg-exposed dams. The dams treated with 5 mg/kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> presented a significant reduction in the body weight gain during treatment period and in the corrected body weight.

Concerning maternal organ weights, an increase in liver absolute (65%) and relative weights (101%) was observed at 10 mg/kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>-exposed dams. The relative weight of brain and kidney was also increased after the administration of the highest dose of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> (19% and 15%, respectively), but the increase was not as high as in the liver of such animals (Table 1).

### **3.2. Reproductive effects**

The percentage of embryo resorption was substantially increased (55%), while the number of live fetuses per litter was decreased (40%) in dams treated with the highest dose of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> when compared to the control group (Table 2). The number of implantation sites per litter was not affected by (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> administration. No late deaths were observed in any group (Table 2).

### **3.3. Fetal development**

Fetal development was similar in control and treated groups at GD 20, the standard day of observation before parturition. The fetal body weight and crown-rump

length were similar in control and treated groups at all doses. The placenta, liver and brain weights (absolute and relative) were similar among groups. At cesarean section, no external anomalies were observed in any fetuses (Table 2).

Skeletal development showed dose-related effects. In the 1 mg/kg treated group, fetuses presented only an incomplete ossification of interparietal bone (45%) as statistically significant skeletal variation. Incomplete ossification of frontal (14%), parietal (41%) and interparietal (67%) bones were observed among the rat offspring exposed to 5 mg/kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> at GD6 to 15. In 10 mg/kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> group, there was a statistically significant increase in the incomplete ossification of parietal (45%) and interparietal (66%) bones, cervical vertebrae (25%) and fore (33%) and hindpaw digits (62%). Furthermore, 21% of fetuses presented bipartite supraoccipital in the highest dose group (Table 3).

### **3.4. Histopathological evaluation**

Placentas from dams given (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> during intra-uterine development showed some morphological alterations when compared to the control group (Figure 1). At maternal-fetal interface, vascular congestion was found in placentas of 5 and 10 mg/kg-exposed dams ( $H=10.09$ ,  $P=0.034$  and  $P=0.018$ , respectively) as well as a significant increase in leukocyte infiltration at both doses ( $H=10.68$ ,  $P=0.034$  and  $P=0.029$ , respectively). In addition, a significant increase in the number of glycogen cells was observed only at the higher dose of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> ( $H=9.74$ ,  $P=0.029$ ). We also observed a degeneration of trophoblast giant cells in addition to multiple areas containing hemosiderin deposits, in the labyrinth area (Figure 1).

#### 4. Discussion

The present results extend our knowledge about the effects of organoselenium compounds during intra-uterine development.

In the current study, the effects of  $(F_3CPhSe)_2$ , a compound with an electron-withdrawing substituted at the *meta* position on the aromatic ring of  $(PhSe)_2$ , was studied. Data on literature have demonstrated that the substitution on an aromatic moiety of  $(PhSe)_2$  changes their effects (Nogueira et al., 2003b). Our research group showed that alterations in the structure of diselenides, such as the introduction of a functional group, reduced or abolished the appearance of seizure episodes. It was also reported that systemic administration of  $(F_3CPhSe)_2$  specifically attenuated behavioral features associated with a mouse model of psychosis at a dose that did not affect other behavioral parameters (Machado et al., 2006). This dose may be near to the possible pharmacological doses as well as the doses that we test in the present study. These findings, together with previous evidence that  $(F_3CPhSe)_2$  does not display a proconvulsant activity (Nogueira et al., 2003b) suggest that  $(F_3CPhSe)_2$  might be less toxic than other organoselenium compounds proposed as therapeutic agents. Here we verified that the substitution on the aromatic moiety of  $(PhSe)_2$  changes its effects on intra-uterine development of Wistar rats.

Data on literature demonstrated that poor nutrition in the pregnant rat leads to intrauterine growth retardation, postnatal growth failure, changes in the endocrine parameters of the somatotrophic axis, and to increased blood pressure in later life (Woodall et al., 1996; Gluckman and Harding, 1997; Battista et al., 2002). The relationship between maternal and developmental toxicity is important in making regulatory decisions regarding the developmental toxicity of a chemical. Accordingly, a systematic and critical approach is needed to characterize the role of maternal toxicity in

laboratory animal studies with adverse developmental outcome (Iyer et al., 1999). In 1 mg/kg ( $F_3CPhSe)_2$  group, neither maternal toxicity nor prenatal growth retardation was observed. Conversely, in 5 and 10 mg/kg groups, the decrease in maternal weight gain during pregnancy, still apparent after subtraction of uterine weight, clearly indicated that ( $F_3CPhSe)_2$  was maternally toxic, without affecting fetuses body weight and length. We hypothesized that there was an adaptation of the maternal metabolism that hindered any effect on fetal body weight and length, preventing the subsequent possible effects, which develops in the offspring in later life. We observed a significant increase in both maternal absolute and relative weight of liver. Accordingly, these results are in agreement with that observed in the previously study with ( $PhSe)_2$ , confirming that liver is the primary target organ to organoselenium compounds.

A few signs of skeletal variations were observed in rats exposed to 5 mg/kg ( $F_3CPhSe)_2$ , with no effects in fetal body weight or length, however, these changes occur within the normal population under investigation and is unlikely to adversely affect survival or health (Chahoud et al., 1998). On the other hand, at the highest dose, fetuses showed several skeletal variations when compared to controls. An increase, relative to dose, in the percentage of fetuses exhibiting signs of development growth variations indicated that ( $F_3CPhSe)_2$  can cause delay of fetal skeletal development at doses equal to or higher than 10 mg/kg. However, as found with the middle dose, these skeletal deviations were not accompanied by reduced fetal weight and length, suggesting a possible involvement of maternal toxicity in the effects of ( $F_3CPhSe)_2$  in skeletal development.

These relationships indicate that skeletal variations were produced by ( $F_3CPhSe)_2$  only at doses ( $\geq 10$  mg/kg) in which a marked embryoletality also occurred. As pointed out by Manson and Kang (1994), this dose-response pattern

suggests that embryolethality and fetal skeletal deviations are different degrees of manifestations of the same primary insult to the embryo. It is generally accepted that prenatal growth retardation and an increased prenatal loss can be secondary to substance-induced maternal toxicity (Manson and Kang, 1994). Therefore, these embryofeto-toxic effects reported could not be considered as related to the exposure because they were observed in the presence of maternal toxicity which can itself cause embryotoxicity (Khera, 1984).

The placenta is a highly specialized unit supported by several kinds of cells involved in both its structure and function in fetal-maternal exchange, that suggest a role in regulation of fetal growth during pregnancy. Studies relating maternal lifestyle during pregnancy to bone mineral density of the offspring point to the importance of adequate maternal vitamin D status and optimal materno-fetal calcium transport across the placenta (Godfrey et al., 2001; Javaid et al., 2003; 2006). Placental calcium transport is dependent upon a series of transport proteins located in the syncytiotrophoblast, which forms the barrier between mother and fetus. In the present study,  $(F_3CPhSe)_2$  caused some morphological alterations in placenta such as vascular congestion, giant trophoblast cells degeneration and leukocyte infiltration. We could affirm that, as reported in the previously study,  $(F_3CPhSe)_2$  could also decrease the functional role of placenta, contributing in this way with adverse reproductive outcomes. We suggest that  $(F_3CPhSe)_2$  exposure may cause a down-regulation on calcium transfer protein expression in the syncytiotrophoblast, which might thereby decrease placental calcium transfer, resulting in decreased fetal calcium concentration that could lead to diminished mineralisation of the fetal skeleton, as found in dams exposed to the highest dose of organoselenium compound.

In conclusion, the results of the present study indicate that  $(F_3CPhSe)_2$ , given to rats during pregnancy, was embryofetotoxic at doses  $\geq 10$  mg/kg  $(F_3CPhSe)_2$ . Therefore, further studies, including biochemical research, are needed to determine the mechanism by which  $(F_3CPhSe)_2$  influences embryo implantation, produces skeletal anomalies and morphological alterations.

## **5. Acknowledgements**

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq are gratefully acknowledged. G.Z., C.W.N., S.W. and C.S.M. are the recipients of CNPq fellowships.



## Tables

**Table 1** - Maternal findings of dams given 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide during organogenesis

Parameters	Control	(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> (mg /kg per day)		
		1	5	10
No. of dams	14	11	14	12
Body weight gain (g)				
Days 0-20 (gestational period)	74.94±4.68	81.82±7.81	60.00±5.45	9.00±17.32*
Days 6-15 (treatment period)	25.38±2.12	17.91±3.19	9.79±3.79*	-32.00±9.31*
Corrected body weight gain (g) <sup>a</sup>	30.92±3.02	28.36±4.80	14.29±3.22	-17.99±11.36*
Corrected body weight <sup>b</sup>	263.99±5.06	263.00±6.32	237.79±9.29*	217.93±7.85*
Gravid uterus weight (g)	44.01±4.47	53.46±5.26	45.71±3.98	26.99±8.18*
Organ weight on GD 20				
Brain (g)	1.81±0.02	1.78±0.03	1.70±0.04*	1.78±0.02
Per body weight (%) <sup>c</sup>	0.67±0.02	0.67±0.02	0.71±0.02	0.80±0.03*
Liver (g)	11.95±0.37	12.52±0.51	12.31±0.99	19.76±1.43*
Per body weight (%)	4.41±0.11	4.70±0.01	5.08±0.14	8.87±0.69*
Kidney (g)	0.86±0.03	0.86±0.02	0.81±0.05	0.83±0.02
Per body weight (%)	0.32±0.01	0.33±0.01	0.34±0.01	0.37±0.02*
Spleen (g)	0.69±0.03	0.66±0.03	0.63±0.05	0.61±0.07
Per body weight (%)	0.25±0.01	0.24±0.01	0.25±0.01	0.27±0.03
Food consumption (g/kg bw/day)				
Days 0-6	6.32±0.43	7.22±0.66	6.82±0.45	7.13±0.60
Days 6-15	6.22±0.52	6.25±0.75	5.57±0.32	2.43±0.72*
Days 15-20	6.14±1.62	5.78±1.11	6.60±0.79	8.01±1.74

Data are expressed as mean±S.E.M.

<sup>a</sup> Corrected body weight gain = maternal body weight gain on GD0-20 minus gravid uterus weight.

<sup>b</sup> Corrected body weight = final body weight minus gravid uterus weight.

<sup>c</sup> Relative weight calculated using corrected body weight.

\* Significantly different from the control group at  $P < 0.05$ .

**Table 2** - Reproductive and fetal data of dams given 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide during organogenesis

Parameters	Control	(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> (mg /kg per day)		
		1	5	10
Litters	14	11	14	12
Implantations sites/litter	10.57±0.72	11.64±0.64	11.00±0.35	11.42±0.97
Live fetuses/litter	9.36±0.67	10.00±1.02	8.79±0.79	5.58±1.80*
Embryo resorptions/litter (%)	11.08±2.20	14.06±7.32	19.50±6.84	55.11±13.72*
No. litters totally resorbed	0	0	1	6*
Fetal body weight (g) <sup>a</sup>	3.13±0.07	3.32±0.20	3.18±0.15	3.04±0.35
Placental weight (g) <sup>a</sup>	0.47±0.01	0.50±0.02	0.50±0.01	0.49±0.05
Fetal biometry (cm) <sup>a</sup>				
CR length	3.56±0.03	3.65±0.06	3.58±0.07	3.55±0.12
Fetal organ weights (g) <sup>a</sup>				
Brain	0.16±0.01	0.16±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01
Per body weight (%)	5.01±0.07	4.91±0.14	4.91±0.17	5.17±0.25
Liver	0.27±0.01	0.27±0.01	0.26±0.01	0.24±0.03
Per body weight (%)	8.63±0.31	8.26±0.21	8.17±0.18	7.88±0.26

Data are expressed as means±S.E.M.

<sup>a</sup>Fetal endpoints were calculated as the group mean of the averages for each litter (n= number of litters).

\* Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

**Table 3** - Skeletal alterations in fetuses from dams given 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide during organogenesis

Parameters	Control	(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> (mg/kg per day)		
		1	5	10
Total fetuses (litter) examined	46 (13)	44 (11)	51 (13)	24 (6)
Skeletal alterations <sup>a</sup> :				
<b>Skull</b>				
Frontal				
Incomplete ossification	0	4.54±3.05	14.10±5.53*	4.17±4.17
Parietal				
Incomplete ossification	7.05±5.32	29.54±11.58	41.02±9.95*	45.83±13.56*
Interparietal				
Incomplete ossification	1.92±1.92	45.45±10.55*	67.31±10.72*	66.67±12.36*
Supraoccipital				
Incomplete ossification	10.26±4.73	29.54±7.39	23.72±6.65	33.33±15.36
Bipartite	0	0	10.26±4.72	20.83±16.35*
Misshapened	1.92±1.92	0	12.18±4.77	8.33±5.27
Squamosal				
Incomplete ossification	0	4.54±3.04	1.92±1.92	4.17±4.17
Zygomaticum				
Incomplete ossification	1.92±1.92	2.27±2.27	1.92±1.92	4.17±4.17
Maxilla				
Incomplete ossification	0	0	8.33±6.11	4.17±4.17
<b>Vertebral Column</b>				
Atlas				
Incomplete ossification	0	0	5.77±4.15	16.67±16.66
Cervical vertebrae				
Incomplete ossification	1.92±1.92	2.27±2.27	1.92±1.92	25.00±15.81*
Thoracic centra				
Incomplete ossification	0	2.27±2.27	0	0
Lumbar Vertebrae				
Archs - Incomplete ossification	0	2.27±2.27	2.56±2.56	0
Centra - Incomplete ossification	0	0	5.13±5.12	0
Sacral Vertebrae				
Archs - Incomplete ossification	16.67±6.25	18.18±7.60	23.08±7.72	25.00±11.18
Centra - Incomplete ossification	0	0	1.92±1.92	0
Caudal bones				
Archs - Incomplete ossification	77.56±6.21	56.82±13.08	60.26±12.68	83.33±12.36
Centra - Incomplete ossification	7.05±3.75	2.27±2.27	1.92±1.92	4.17±4.17
<b>Sternebrae</b>				
Incomplete ossification	53.21±8.97	61.36±11.84	73.08±11.81	83.33±12.36
Misshapened	38.46±8.14	38.64±8.49	50.64±10.08	50.00±11.18
Bipartite	5.77±3.04	0	4.49±3.07	12.50±5.59
<b>Ribs</b>				
Incomplete ossification	0	0	5.77±3.04	4.17±4.17
Lumbar, rudimentary (supern.)				
Bilateral	2.56±2.56	15.91±6.96	18.59±6.61	16.67±8.33
Unilateral	16.03±7.85	20.45±5.65	14.10±3.81	16.67±8.33
<b>Forepaw</b>				
Incl. oss. of metacarpal bones	0	4.54±4.54	0	4.17±4.17
Digits incompletely ossified	1.92±1.92	4.54±4.54	8.33±4.62	33.33±17.87*
<b>Hindpaw</b>				
Incl. oss. of metatarsal bones	10.90±6.35	2.27±2.27	7.69±4.36	16.67±12.36
Digits incompletely ossified	22.44±8.96	25.00±8.25	48.08±11.81	62.50±17.97*

Incl. oss. = bone incompletely ossified (only a part of the bone is ossified). Supern. = supernumerary

<sup>a</sup> Data are presented as mean percentage of fetuses affected per litter (mean±S.E.M.). A single fetus may be represented more than once in listing of the individual variations.

\*  $p < 0.05$  compared to the control group by one-way ANOVA.

**Legend**

Figure 1- Photomicrographs from placentas of control dams (A) and dams given 1 (B), 5 (C) and 10 (D) mg/Kg (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> during the organogenesis period. Note the vascular congestion (\*) in the decidua and spongiotrophoblast. Trophoblast giant cells (CTG), spongiotrophoblast (S), labyrinth (L) and decidua (D) (HE. X400).

## 6. References

- Alexiou, P., Grimanis, A., Grimani, M., Papaevangelou, G., Koumantakis, E., Papadatos, C., 1977. Trace elements (zinc, cobalt, selenium, rubidium, bromine, gold) in human placenta and newborn liver at birth. *Pediatr. Res.* 11, 646-648.
- Battista, M.C., Oligny, L.L., St-Louis J., Brochu M., 2002. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am. J. Physiol-Endoc. M.* 283, 124-131.
- Behne, D., Elger, W., Schmelzer, W., Witte, M., 1976. Effects of sex hormones and of pregnancy on the selenium metabolism. *Bioinorg. Chem.* 5, 199-202.
- Behne, D., Von Berswordt-Wallarabe, R., Elger, W., Hube, G., Wolters, W., 1978. Effects of pregnancy and lactation on the serum selenium content of rats. *Experientia* 34, 270-271.
- Behne, D., Weiler, H., Kyriakopoulos, A., 1996. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J. Reprod. Fertil.* 106, 291-297.
- Borges, L.P., Borges, V.C., Moro, A.V., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2005. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 210, 1-8.
- Bro, S., Berendtsen, H., Norgaard, J., Host, A., Jorgensen, P., 1988. Serum selenium concentration in maternal and umbilical cord blood: relation to course and outcome of pregnancy. *J. Trace Elem. Elect. H.* 2, 165-169.
- Chahoud, I., et al., 1998. Classification terms in developmental toxicology: Need for harmonization. *Reprod. Toxicol.* 13, 77-82.
- Ewan, R.C., 1976. Effect of selenium on rat growth, growth hormones and diet utilization. *J. Nutr.* 106, 702-709.

- Favero, A.M., Weis, S.N., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reprod. Toxicol.* 20, 561–568.
- Flohé, L., Gunzler, W.A., Schock, H.H., 1973. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. *FEBS Lett.* 32, 132–134.
- Ghisleni, G., Porciúncula, L.O., Cimarostia, H., Rocha, J.B.T., Salbego, C.G., Souza, D.O., 2003. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res.* 986, 196-199.
- Gluckman, P.D. and Harding, J.E., 1997. The physiology and pathophysiology of intrauterine growth retardation. *Horm. Res.* 48, 11–16.
- Godfrey, K., Walker-Bone, K., Robinson, S., Taylor, P., Shore, S., Wheeler, T., Cooper, C., 2001. Neonatal bone mass: influence of parental birthweight, maternal smoking, body composition, and activity during pregnancy. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1694–1703.
- Hill, K.E., Xia, Y., Akesson, B., Boeglin, M.E., Burk, R.F., 1996. Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium deficient and selenium supplemented Chinese subjects. *J. Nutr.* 126, 138–145.
- Hinks, L., Ogilvy-Stuart, A., Hambridge, K., Walker, V., 1989. Maternal zinc and selenium status in pregnancies with a neural tube defect or elevated alpha-fetoprotein. *Brit. J. Obstet. Gynaec.* 96, 61-66.
- Iyer, P., Gammon, D., Gee, J., Pfeifer, K., 1999. Characterization of Maternal Influence on Teratogenicity: An Assessment of Developmental Toxicity Studies for the Herbicide Cyanazine. *Regul. Toxicol. Pharm.* 29, 88–95.

- Javaid, M.K., Shore, S.R., Taylor, P., Gale, C.R., O'Callaghan, F., Arden, N.K., Godfrey, K.M., Cooper, C., 2003. Umbilical vein calcium concentration and maternal height predict childhood bone mineral content at nine years. *Rheumatology* 42, S58–S58.
- Javaid, M.K., Crozier, S.R., Harvey, N.C., Gale, C.R., Dennison, E.M., Boucher, B.J., Arden, N.K., Godfrey, K.M., Cooper, C., 2006. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. *Lancet* 367, 36–43.
- Khera, K.S., 1984. Maternal toxicity: a possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology* 29, 411-416.
- Koller, L., Whitbeck, G., South, P., 1984. Transplacental transfer and colostrum concentrations of selenium in beef cattle. *Am. J. Vet. Res.* 45, 2507-2510.
- Korpela, H., Loueniva, R., Yrjanheikki, E., Kauppila, A., 1984. Selenium concentration in maternal and umbilical cord blood, placenta and amniotic membranes. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 54, 257-261.
- Machado, M.S., Rosa, R.M., Dantas, A.S., Reolon, G.K., Appelt, H.R., Braga, A.L., Henriques, J.A., Roesler, R., 2006. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neurosci. Lett.* 410, 198-202.
- Manson, J.M. and Kang, Y.J., 1994. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Wallace Hayes, A. (Eds.), *Principles and Methods of Toxicology*, New York, pp. 989-1037.
- Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.* 94, 276-282.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T. 2003 (a). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52, 56–63.

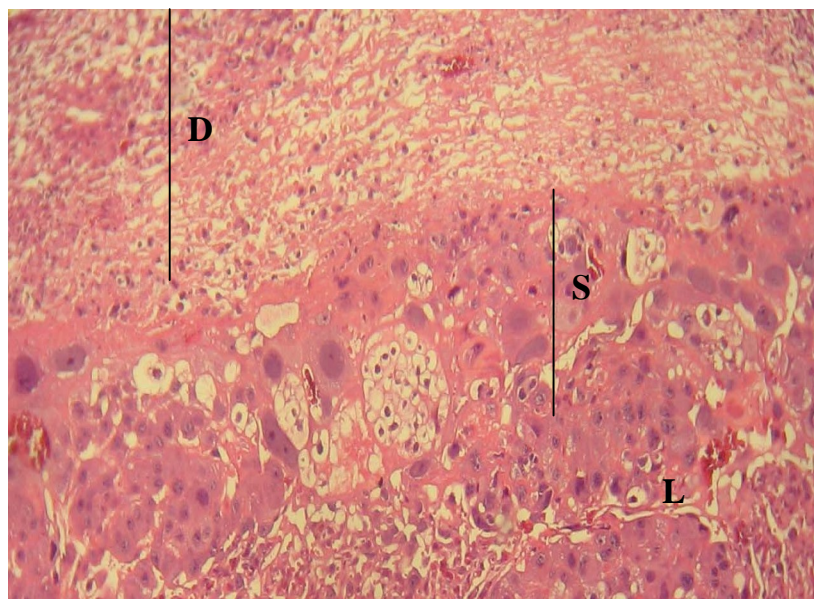
- Nogueira, C.W., Meotti, F.C., Curte, E., Pilissão, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003 (b). Investigations into potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183, 29–37.
- Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Eds.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, England, pp. 25–51.
- Pitkin, R., 1977. Nutritional influences during pregnancy. *Med. Clin. N. Am.* 61, 3-15.
- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Weis, S.N., Fachineto, J.M., Favero, A.M., Nogueira, C.W., 2005. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem. Biol. Interact.* 151, 159–165.
- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2006. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Phar.* 21, 86–92.
- Savegnago, L., Jesse, C.R., Pinto, L.G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2007. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Prog. Neuro-Psychoph.* 31, 1261-1269.
- Shamberger, R.J., 1983. Biological interactions of selenium with other substances. In: Frieden, E. (Eds.), *Biochemistry of selenium*, New York, pp. 125–166.
- Sk, U.H. and Bhattacharya, S., 2006. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by a series of novel organoselenocyanates. *Environ. Toxicol. Phar.* 22, 298-308.
- Staples, R.E. and Schnell, V.L., 1964. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-Alizarin Red S method for fetal bone. *Stain Technol.* 39, 61–63.
- Weis, S.N., Favero, A.M., Stangherlin, E.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2007. Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development. *Reprod. Toxicol.* 23, 175–181.



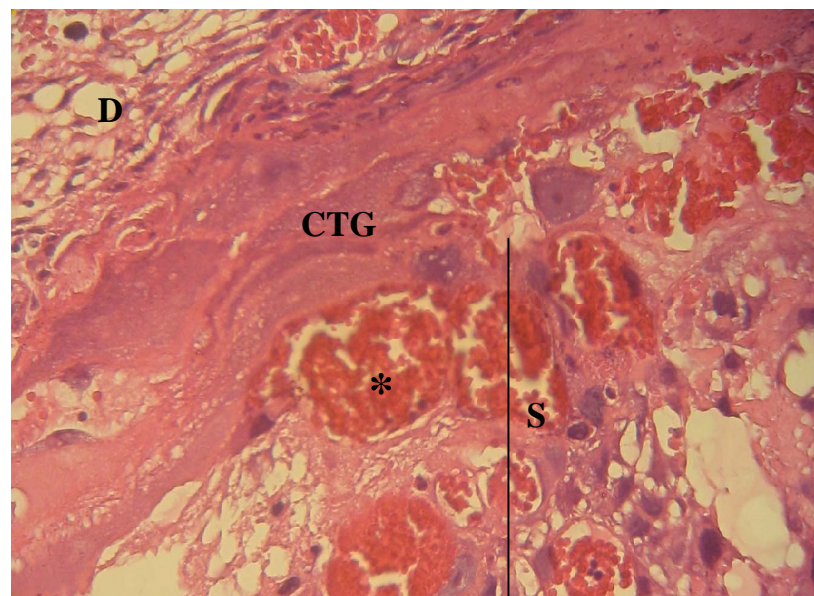
- Willhite, C., Ferm, V., Zeise, L., 1990. Route-dependent pharmacokinetics, distribution and placental permability of organic and inorganic selenium in hamsters. *Teratology* 42, 359-371.
- Wilson, D., Tubman, R., Bell, N., Halliday, H., McMaster, D., 1991. Plasma manganese, selenium and glutathione peroxidase levels in the mother and newborn infant. *Early Hum. Dev.* 26, 223-226.
- Woodall, S.M., Johnston, B.M., Breier, B.M., Gluckman, P.D., 1996. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatres* 40, 438-443.

Figures:

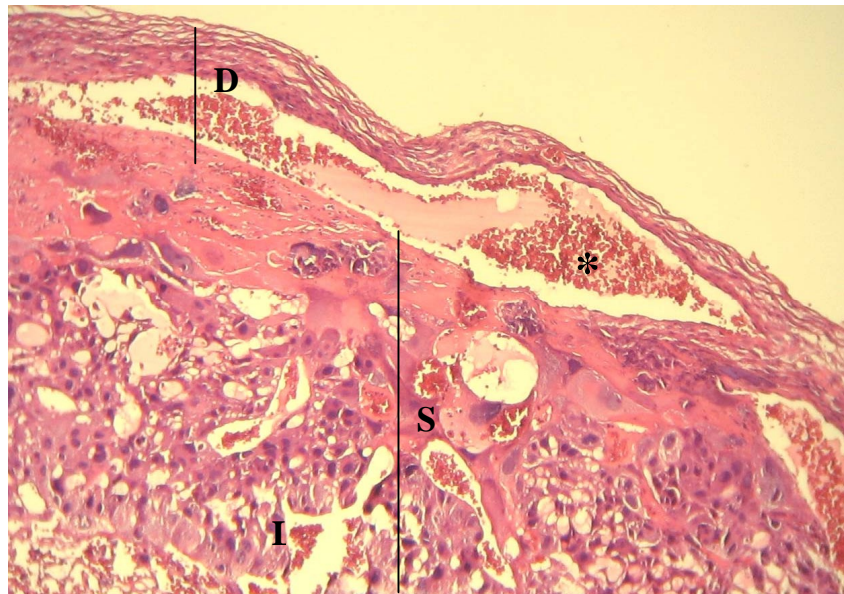
A.



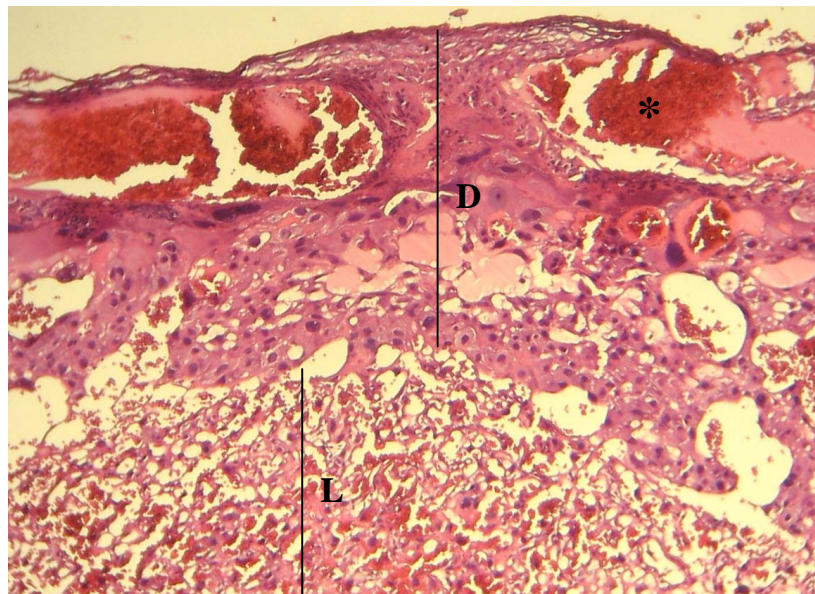
B.



C.



D.



## 4. DISCUSSÃO

O interesse por estudos químicos e bioquímicos dos compostos orgânicos de Se tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas principalmente devido ao fato de que vários desses compostos apresentam importante atividade antioxidante (Arteel & Sies, 2001). Em virtude da descoberta desta e de outras propriedades biológicas (Parnham & Graf, 1991; Kanda *et al.*, 1999; Nogueira *et al.*, 2004) esses compostos têm sido alvo de muitos estudos farmacológicos e toxicológicos.

A introdução de uma nova droga no mercado costuma ser precedida de experimentação humana, excetuando-se o uso na gestação. Os estudos epidemiológicos e laboratoriais demonstram, indubitavelmente, que a exposição materna a agentes externos físicos, químicos ou biológicos poderia comprometer o desenvolvimento intra-uterino. Assim, os testes relativos à exposição materna a agentes químicos passaram a ser obrigatórios e regulamentados internacionalmente devido às múltiplas formas através das quais os mamíferos e principalmente o homem, são expostos a esses agentes.

Com isso, nosso principal objetivo foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos de dois compostos organocalcogênicos administrados durante o período da organogênese de ratas Wistar (**Artigo e Manuscrito**).

### 4.1. TOXICIDADE MATERNA

Nas diretrizes internacionais recomenda-se que os estudos de toxicidade reprodutiva, além de conduzidos de forma a viabilizar a avaliação da relação dose-efeito, apresentem pelo menos um nível de dose que produza alguma toxicidade materna (que não cause mais de 10% de mortalidade das mães expostas ao agente em questão) (Collins *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos no **Artigo**, referentes à exposição ao  $(\text{OSe})_2$ , indicam que o composto, mesmo em baixas doses (1,5 e 3,0 mg/kg), causa toxicidade materna, sem afetar o consumo de alimento destes animais. Da mesma forma, os resultados referentes à exposição ao  $(\text{F}_3\text{COSe})_2$  (**Manuscrito**) demonstram que a exposição a este organocalcogênio (nas doses de 5 e 10 mg/kg) também levou a uma significativa diminuição do ganho de peso corporal materno, indicando que o composto causa toxicidade materna. Neste caso, o composto causou uma diminuição do consumo de

alimento durante o período de tratamento (do dia 6 ao dia 15 de gestação), nas ratas expostas a maior dose do composto. Estes resultados estão de acordo com trabalhos da literatura que relacionam perda de peso à exposição a compostos de Se (Tinggi, 2003; Favero *et al.*, 2005; 2006, Stangherlin *et al.*, 2006). Tanto na exposição ao  $(\text{OSe})_2$  quanto ao  $(\text{F}_3\text{CSe})_2$ , foi observado um aumento significativo no peso relativo do fígado das mães, o qual está de acordo com os dados descritos na literatura que demonstram que o fígado é o órgão alvo primário da exposição à compostos de Se (Maciel *et al.*, 2003; Favero *et al.*, 2006).

No entanto, a interpretação de efeitos adversos sobre o desenvolvimento da prole, em níveis de dose tóxicos para o organismo materno, ainda é difícil na medida em que é praticamente impossível distinguir os efeitos embriofetotóxicos diretos decorrentes da exposição transplacentária a um dado agente, daqueles induzidos indiretamente, em consequência de alteração da fisiologia materna (Khera, 1984, 1985; Chernoff *et al.* 1988, 1989; Chahoud *et al.*, 1999). Em muitos casos, a toxicidade embriofetal é um efeito secundário (indireto) à toxicidade materna. Muitas doenças desenvolvidas nas mães, como por exemplo o diabetes melito, podem comprometer o desenvolvimento geral da progênie (Larsen, 1986; Moore & Persaud, 1993). Porém, nem sempre a toxicidade materna está associada à indução de anormalidades do desenvolvimento embriofetal. O estireno, por exemplo, mesmo em níveis de dose altamente tóxicos para a mãe não causa alterações embriofetais, provavelmente porque seus mecanismos tóxicos não envolvem a indução de danos teciduais (Murray *et al.*, 1978).

Neste estudo, nós atendemos às recomendações das diretrizes internacionais, uma vez que os compostos foram claramente materno-tóxicos em certas doses, porém os compostos causaram efeitos diferenciados à prole, como será discutido a seguir.

#### 4.2. TOXICIDADE INTRA-UTERINA

Os efeitos de um agente embriofetotóxico podem aparecer na forma de malformações, *déficit* funcional, retardo de desenvolvimento geral ou específico ou letalidade, dependendo do tipo de agente, da dose e frequência de exposição e do estágio de desenvolvimento no qual se encontra o conceito no momento da exposição (Wilson, 1977).

A exposição ao  $(\text{OSe})_2$  durante o período da organogênese de ratas Wistar causou um dano significativo ao desenvolvimento embrionário. A administração do composto causou uma diminuição tanto do peso quanto das medidas corporais fetais. Estes parâmetros indicam que a exposição a este composto causou um retardo no desenvolvimento intra-uterino da prole.

A avaliação de anomalias do esqueleto nos estudos experimentais é extremamente sensível e leva à identificação e registro de inúmeras alterações ou desvios da normalidade, cujo grau de severidade precisa ser considerado caso a caso. Os fetos cujas mães foram expostas ao  $(\text{OSe})_2$  apresentaram, mesmo em baixas doses, uma maior frequência de variações e malformações menores do esqueleto. O aumento dessas sugere que, embora claramente tóxico para o organismo materno, o  $(\text{OSe})_2$  não é teratogênico, uma vez que as variações encontradas são alterações geralmente reversíveis e são caracterizadas por não apresentarem riscos à vida e por envolverem alterações estruturais de menor significado funcional. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Favero *et al.* (2005), que demonstram que o  $(\text{OSe})_2$ , em altas doses, causa toxicidade materna e induz alterações no peso e esqueleto fetal.

Diferentemente dos resultados obtidos com o  $(\text{OSe})_2$ , a exposição das ratas durante o período da organogênese ao  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$  não causou qualquer alteração de peso e medidas corporais fetais. Este resultado pode nos sugerir que houve uma possível tolerância adquirida pelo organismo materno e por sua prole após o tratamento com a maior dose (10 mg/kg) de  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$ , uma vez que 55% dessas ratas tiveram suas ninhadas totalmente reabsorvidas. Este fato sugere que estas mães foram mais suscetíveis aos efeitos pré-natais do  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$  na fase inicial de tratamento e que, passado este primeiro momento, ocorre tolerância a este composto. Esta suposição é também sustentada pela análise do ganho de peso materno (do dia 6 ao dia 15 de gestação) e pelos sinais de toxicidade observados durante a gestação.

Além disso, nesse estudo, observamos claramente uma diferença interindividual quanto à suscetibilidade das fêmeas aos efeitos induzidos *in utero* pelo  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$ . Enquanto, em algumas mães, a ocorrência de ninhadas totalmente reabsorvidas foi evidente, em outras este efeito parece não ter ocorrido, uma vez que as demais mães deste grupo de dose não diferiram do grupo controle quanto ao número médio de fetos vivos por ninhada. Sendo assim, podemos sugerir que o  $(\text{F}_3\text{C}\text{OSe})_2$  tendeu a um efeito tudo-ou-nada, ou seja, ou matou toda a ninhada ou não a afetou. Este efeito, somado aos indícios de toxicidade materna, observados neste nível de dose, sugere que as

reabsorções totais encontradas em algumas ninhadas são um efeito mediado pelo organismo materno.

#### 4.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS PLACENTAS

A placenta é uma estrutura membranosa que separa as circulações materna e fetal. Todos os nutrientes necessários para o crescimento fetal são transportados da circulação materna para o feto através da placenta. Juntamente com os nutrientes, também podem atravessar a placenta substratos endógenos e xenobióticos. A transferência placentária de diferentes substâncias químicas é influenciada por diversos fatores, tais como: grau de absorção, estado de ionização, peso molecular e lipossolubilidade. Além disso, as propriedades da placenta (fluxo de sangue entre a mãe e o feto, metabolismo da droga e idade da placenta) também podem interferir neste transporte. Existem evidências que moléculas químicas com peso molecular < 600 atravessam facilmente a “barreira placentária” (Mirkin, 1973).

Com relação aos dados que existem na literatura, sabe-se que o Se atravessa a “barreira placentária” e é distribuído nos tecidos fetais (Shariff *et al.*, 1984; Bedwal & Bahuguna, 1994). Com base nos resultados já obtidos pelo nosso grupo de pesquisa e os do presente estudo, nós podemos inferir que os compostos organocalcogênicos, pelo seu baixo peso molecular, solubilidade lipídica e pelos efeitos apresentados quando expostos durante o desenvolvimento intra-uterino, atravessam a membrana da placenta e são transportados para a circulação fetal.

A exposição aos dois compostos organocalcogênicos foi capaz de alterar de forma significativa a morfologia da placenta. Alterações como, congestão vascular na região da interface materno-fetal, aumento da infiltração leucocitária e uma intensa atividade fagocítica nos sugerem que estas e outras alterações causadas pela administração dos compostos representam um mecanismo compensatório para manter as membranas íntegras e um adequado mecanismo de passagem dos nutrientes, uma vez que estas alterações impedem uma função adequada da placenta, contribuindo para aumentar a chance de efeitos deletérios para o organismo embriofetal.

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, nós podemos inferir que:

- A administração dos compostos orgânicos de selênio,  $(\text{ØSe})_2$  e  $(\text{F}_3\text{CØSe})_2$ , causou toxicidade materna, evidenciada pela diminuição de ganho de peso corporal, e este resultado variou conforme o composto utilizado e à dose administrada.

- A exposição ao  $(\text{ØSe})_2$  afetou o desenvolvimento intra-uterino da prole, causando diminuição do peso corporal e medidas corporais fetais, além de alterações esqueléticas evidenciadas em todos os níveis de dose testados.

- O  $(\text{F}_3\text{CØSe})_2$ , quando administrado durante o período da organogênese, não afetou os parâmetros de peso e medidas corporais fetais, entretanto, causou embriofetalidade na maior dose testada do composto. Este efeito parece ser do tipo tudo-ou-nada, uma vez que levou à reabsorção total de metade das ninhadas estudadas, sendo que a outra metade não foi afetada pelo composto. Neste nível de dose também foram observadas variações esqueléticas, que são geralmente reversíveis e parecem não apresentar riscos à vida.

- A exposição tanto ao  $(\text{ØSe})_2$  quanto ao  $(\text{F}_3\text{CØSe})_2$  alterou a morfologia da placenta e estes efeitos parecem ter contribuído para os efeitos adversos encontrados nas proles analisadas.



## 6. PERSPECTIVAS

Referente aos estudos desse assunto, faz-se necessário:

- Realizar estudos comparativos utilizando outras espécies animais, como por exemplo, camundongos e coelhos;
- Avaliar os efeitos de outros compostos organocalcogênios sobre o desenvolvimento intra-uterino de ratos e outras espécies animais;
- Investigar os possíveis efeitos bioquímicos envolvidos na toxicidade intra-uterina, causada pelos compostos organocalcogênios

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-KUNANI, A.S.; KNIGHT, R.; HASWELL, S.J.; THOMPSON, J.W.; LINDOW, S.W. The selenium status of women with a history of recurrent miscarriage. **Brit. J. Obstet. Gynaec.** v. 108, p.1094-1097, 2001.
- ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. Phar.** v. 10, p. 153-158, 2001.
- BARBOSA, N.B.V.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M.C.; BRAGA, A.L. Effect of organic forms of selenium on  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharm.** v. 149, p. 243-253, 1998.
- BARRINGTON, J.W.; LINDSAY, P.; JAMES, D.; SMITH, S.; ROBERTS, A. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? **Brit. J. Obstet. Gynaec.** v. 103, p. 130–132, 1996.
- BEDWAL, R.S.; BAHUGUNA, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**, v. 50, p. 626-640, 1994.
- BOGDEN, J.D.; KEMP, F.W.; CHEN, X.; STAGNARO-GREEN, A.; STEIN, T.P.; SCHOLL, T.O. Low-normal serum selenium early in human pregnancy predicts lower birth weight. **Nutr. Res.** v. 26, p. 497–502, 2006.
- BOLZAN, R.C.; FOLMER, V.; FARINA, M.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T.; EMANUELLI, T. Aminolevulinate dehydratase inhibition by phenyl selenoacetilene: effects of reaction with hydrogen peroxide. **Pharmacol. Toxicol.** v. 90, p. 214-219, 2002.
- BORGES, L.P.; BORGES, V.C.; MORO, A.V.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology** v. 210, p. 1-8, 2005.

- BRAGA, A.L.; SILVEIRA, C.C.; ZENI, G.; SEVERO, W.A.; STEFANI, H.A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J. Chem. Res.** v. 4, p. 206-207, 1996.
- BRAGA, A.L.; ZENI, G.; ANDRADE, L.H.; SILVEIRA, C.C. Stereoconservative formation and reactivity of  $\alpha$ -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinyllic chalcogens. **Synlett** v. 5, p. 595-596, 1997.
- BRYDON, P.; SMITH, T.; PROFFITT, M.; GEE, H.; HOLDER, R.; DUNNE, F. Pregnancy outcome in women with type 2 diabetes mellitus needs to be addressed. **Int. J. Perin.** v. 9, p. 87-93, 2000.
- CHAHOU D I, BUSCHMANN J, CLARK R, *et al.* Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. **Reprod. Toxicol.** v. 13, p. 77-82, 1999.
- CHAHOU D, I; KURIYAMA, S; PAUMGARTTEN, F.J.R. Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyurea in rats. **Toxicology** v. 179, p. 137-49, 2002.
- CHERNOFF, N.; MILLER, D.B.; ROSEN, M.B.; MATTSHECK, C.L. Developmental effects of maternal stress in the CD1 mouse by restraint on single days during the period of major organogenesis. **Toxicology** v. 51, p. 57-65, 1988.
- CHERNOFF, N.; ROGERS, J.M.; KAVLOCK, R.J. An overview of maternal and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. **Toxicology** v. 59, p. 111-125, 1989.
- COLLINS, T.F.X.; SPRANDO, R.L.; SHACKELFORD, M.E.; HANSEN, D.K.; WELSH, J.J. Food and Drug Administration proposed guidelines for reproduction studies. **Regul. Toxicol. Pharm.** v. 30, p. 29-38, 1999.
- COMASSETO, J.V. Vinyllic selenides. **J. Organomet. Chem.** v. 253, p. 131-181, 1983.

- DOBZYNSKI, W.; TRAFIKOWSKA, U.; TRAFIKOWSKA, A.; PILECKI, A.; SZYMANSKI, W.; ZACHARA, B.A. Decreased selenium concentration in maternal and cord blood in preterm compared to term deliveries. **Analyst** v. 123, p. 93-97, 1998.
- DUNN, L.C. **A Short History of Genetics**. New York: McGraw-Hill, p. 3-24, 1965.
- EDWARDS, M.J.; SHIOTA, K.; SMITH, M.S.; WALSH, D.A. Hyperthermia and birth defects. **Reprod. Toxicol.** v. 9, p. 411-425, 1995.
- EWAN, R.C. Effect of selenium on rat growth, growth hormones and diet utilization. **J. Nutr.** v. 106, p. 702-709, 1976.
- FARINA, M.; FOLMER, V.; BOLZAN, R.C.; ANDRADE, L.H.; ZENI, G.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. Selenoxides inhibit  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicol. Lett.** v. 119, p. 27-37, 2001.
- FAVERO, A.M.; WEIS, S.N.; STANGHERLIN, E.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. **Reprod. Toxicol.** v. 20, p. 561-568, 2005.
- FAVERO, A.M.; WEIS, S.N.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 28, p. 607-616, 2006.
- FERM, V.H.; HANLON, D.P.; WILLHITE, C.C.; CHOY, W.N.; BOOK, S.A. Embryotoxicity and dose-responses relationships of selenium in hamsters. **Reprod. Toxicol.** v. 4, p. 183-190, 1990.
- FONSECA, V. **Educação Especial**: Porto Alegre: Artes Médicas, 1987.
- FOOD AND NUTRITION BOARD. **Recommended Dietary Allowances**. 10<sup>th</sup> ed. National Academy Press Washington DC, 1989.

- GREGG, N.M. Congenital cataract following German measles in the mother. **Trans. Ophthalmol. Soc. Aust.** v. 3, p. 34-45, 1941.
- HALE, F. The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. **Am. J. Ophthalmol.** v. 18, p. 1087, 1935.
- HERBST, A.L.; ULFELDER, H.; POSKANZER, D.C. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **N. Engl. J. Med.** v. 284, p. 878-881, 1971.
- HOFFMAN, D.J.; HEINZ, G.H. Embriotoxicity and teratogenic effects of selenium in the diet of mallards. **J. Toxicol. Env. Health** v. 24, p. 477-490, 1988.
- KANDA, T.; ENGMAN, L.; COTGREAVE, I.A.; POWIS, G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **J. Org. Chem.** v. 64, p. 8161-8169, 1999.
- KHERA, K.S. Maternal toxicity: a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology** v. 29, p. 411-416, 1984.
- KHERA, K.S. Maternal toxicity: a possible etiologic factor in embryo fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. **Teratology** v. 31, p. 129-136, 1985.
- KURIYAMA, S.N. Desnutrição Materna e Embriotoxicidade de Xenobióticos: Estudos Experimentais em Ratos. **Dissertação de Mestrado**, Rio de Janeiro: Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2000.
- LARSEN, J.W. *In: Teratogen Update: Environmentally Induced Birth Defect Risks* (Sever, J.L.; Brent, R.L.) New York: Alan R. Liss, Inc., 1986.
- LEMÔNICA, I.P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SANSEVERINO, M.T.V., SPRITZER, D.T., SCHÜLER-FACCINI, L. (Orgs.). **Manual de Teratogênese**, Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 19-39, 2001.

- LEMÔNICA, I.P. Embriofetotoxicidade. *In: Fundamentos de Toxicologia* (OGA, Z.), 2<sup>nd</sup> ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 91-99, 2003.
- LENZ, W. Thalidomide and congenital abnormalities. [letter] **Lancet** v. 1, p. 45, 1962.
- LENZ, W. A short history of thalidomide embriopathy. **Teratology** v. 38, p. 203-215, 1988.
- LU, B.Y. Changes of selenium in patients with pregnancy induced hypertension. **Chinese J. Obstet. Gynec.** v. 25, p. 325, 1990.
- MACHADO, M.S.; ROSA, R.M.; DANTAS, A.S.; REOLON, G.K.; APPELT, H.R.; BRAGA, A.L.; HENRIQUES, J.A.; ROESLER, R. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. **Neurosci. Lett.** v. 410, p. 198-202, 2006.
- MACIEL, N.; BOLZAN, R.C.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects  $\delta$ -aminolevulinatase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxic.** v. 14, p. 310-319, 2000.
- MACIEL, E.N.; FLORES, E.M.M.; ROCHA, J.B.T.; FOLMER, V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney and brain of mice. **B. Environ. Contam. Tox.** v. 70, p. 470-476, 2003.
- MAKHOUL, I.R.; SAMMOUR, R.N.; DIAMOND, E.; SHOHAT, I.; TAMIR, A.; SHAMIR, R. Selenium concentrations in maternal and umbilical cord blood at 24-42 weeks of gestation: basis for optimization of selenium supplementation to premature infants. **Clin. Nutr.** v. 23, p. 373-381, 2004.
- MANSON, J.M.; Teratogens. *In: Casarett and Doull's. Toxicology. The Basic Science of Poison.* (Klassen, C.D.; Amdur, M.O.; Doull, J.) New York, Toronto, London: Macmillan Publishing Company, p. 195-220, 1986.

- MEOTTI, F.C.; BORGES, V.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.  
Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. **Toxicol. Lett.** v. 143, p. 9-16, 2003.
- MEOTTI, F.C.; STANGHERLIN, E.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.  
Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ. Res.** v. 94, p. 276-282, 2004.
- MIHAILOVIC, M.; CVETKOVIC, M.; LJUBIC, A.; KOSANOVIC, M.; NEDELJKOVIC, S.; JOVANOVIC, I.; PESUT, O. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 73, p. 47-54, 2000.
- MIRKIN, B.L. Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 14, p. 643-647, 1973.
- MONT, R.J.; FAUSTMAN-WATS, E. Pharmacokinetics considerations in the maternal-placental-fetal unit. **Clin. Obstet. Gynecol.** v. 26, p. 370-389, 1983.
- MOORE, K.; PERSAUD, T. *In: The Developing Human*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1993.
- MORETTO, M.B.; ROSSATO, J.I.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.  
Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx into brain synaptosomes is voltage-dependent. **J. Biochem. Mol. Toxic.** v. 17, p. 154-160, 2003.
- MURRAY, F.J.; JOHN, J.A.; BALMER, M.F.; SCHWETZ, B.A. Evaluation of styrene given to rats and rabbits by inhalation or by gavage. **Toxicology** v. 11, p. 335-343, 1978.
- NAU, H. Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis. **Environ. Health Persp.** v. 70, p.113-129, 1986.

- NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Tot. Environ.** v. 249, p. 347-371, 2000.
- NISHIMURA, H.; TANIMURA T. Clinical aspects of the teratogenicity of drugs. 1<sup>st</sup> ed. Amsterdam: Excerpta Medica, p. 155-156, 1976.
- NODA, T.; YAMANO, T.; SHIMIZU, M. Effects of maternal age on teratogenicity of di-n-butyltin diacetate in rats. **Toxicology** v. 167, p. 181-189, 2001.
- NOGUEIRA, C.W.; QUINHONES, E.B.; JUNG, E.A.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm. Res.** v. 52, p. 56-63, 2003a.
- NOGUEIRA, C.W.; BORGES, V.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organochalcogens effects on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology** v. 191, p. 169-178, 2003b.
- NOGUEIRA, C.W.; MEOTTI, F.C.; CURTE, E.; PILLISSÃO, C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Investigations into potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology** v. 83, p. 29-37, 2003c.
- NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and Pharmacology. **Chem. Rev.** v. 104, p. 6255-6286, 2004.
- OLDFIELD, J.E. The two faces of selenium. **J. Nutr.** v. 117, p. 2002-2008, 1987.
- PALMER, I.S.; ARNOLD, R.L.; CARLSON, C.W. Toxicity of various selenium derivatives to chick embryos. **Poultry Sci.** v. 52, p. 1841-1846, 1973.
- PARNHAN, M.J.; GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog. Drug Res.** v. 36, p. 10-47, 1990.



PARNHAM, M.J.; GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog. Drug Res.** v. 36, p. 9-47, 1991.

PAULMIER, C. Selenoorganic functional groups. *In: Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis* (Paulmier, C.) 1<sup>st</sup> ed. Pergamon Press: Oxford, England, p. 25-51, 1986.

PERSAUD, T.V.N. Teratogenesis – Experimental Aspects and Clinical Implications. *In: Experimentelle Pathologie* (Experimental Patology, Supplement 4). Gustav Fischer Verlag, Jena. 1979.

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

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

SALDANHA, P.H. A tragédia da talidomida e o advento da teratologia experimental. **Ver. Brasil. Genet.** v. 17, p. 449-464, 1994.

SHARIFF, M.A.; KRISHNAMURTI, C.R.; SCHAEFER, A.L.; HEINDZE, A.M. Bidirectional transfer of selenium across the sheep placenta in utero. **Can. J. Anim. Sci.** v. 64, p. 252-254, 1984.

SILVA, O.M. A Epopéia Ignorada – A Pessoa Deficiente na História do Mundo de Ontem e de Hoje. São Paulo: CEDAS, 1987.

STANGHERLIN, E.C.; FAVERO, A.M.; WEIS, S.N.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Assessment of reproductive toxicity in male rats following acute and sub-chronic exposures to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. **Food Chem. Toxicol.** v. 44, p. 662-669, 2006.

- SCHWARTZ, K.; FOLTSZ, P. J. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.** v. 79, p. 200-214, 1957.
- TARANTAL, A.F.; WILLHITE, C.C.; LASLEY, B.L.; MURPHY, C.J.; MILLER, C.J.; CUKIERSKI, M.J.; BOOK, S.A; HENDRICKX, A.G. Developmental toxicity of L-selenomethionine in *Macaca fascicularis*. **Fund. Appl. Toxicol.** v. 16, p. 147-160, 1991.
- TEH, S.J.; DENG, X.; TEH, F.C.; HUNG, S.O. Selenium-induced teratogenicity in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). **Mar. Env. Res.** v. 54, p. 605-608, 2002.
- TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. **Toxicol. Lett.** v. 137, p. 103-110, 2003.
- USAMI, M.; TABATA, H.; OHNO, Y. Effects of ascorbic acid on selenium teratogenicity in cultured rat embryos. **Toxicol. Lett.** v. 105, p. 123-128, 1999.
- WARKANY, J. History of Teratology. In: **Handbook of Teratology** (Wilson, J.G.; Fraser, F.C.) New York: Editora Plenum Press v. 1, p. 3-46, 1977.
- WASOWICZ W, WOLKANIN P, BEDNARSKI M, GROMADZINSKA J, SKLODOWSKA M, GROMADZINSKA K. Plasma trace element (Se, Zn, Cu) concentrations in maternal and umbilical cord blood in Poland. Relation with birth weight, gestational age, parity. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 38, p. 205-15, 1993.
- WILSON, J.G. In: **Handbook of teratology**. 1<sup>st</sup> ed. New York: Plenum Press v. 1, 2, 3, 1973.
- WILSON, J.G. Current status of teratology. In: Wilson, J.G; Fraser, F.C. In: **The handbook of teratology**. New York: Plenum Press, 1977.

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

ZACHARA, B.A.; WARDAK, C.; DIDKOWSKI, W.; MACIAG, A.; MARCHALUK, E. Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. **Gynecol. Obstet. Inves.** v. 35, p. 12-7, 1993.

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

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.