



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

**AVALIAÇÃO DO DISSELENETO DE DIFENILA E
ANÁLOGOS COMO SUBSTRATOS DA TIOREDOXINA
REDUTASE**

Tese de Doutorado

Andressa Sausen de Freitas

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**AVALIAÇÃO DO DISSELENETO DE DIFENILA E
ANÁLOGOS COMO SUBSTRATOS DA TIOREDOXINA
REDUTASE**

por

Andressa Sausen de Freitas

Tese 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
Doutora em Bioquímica Toxicológica.

Santa Maria, RS, Brasil

2011

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

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

**AVALIAÇÃO DO DISSELENETO DE DIFENILA E
ANÁLOGOS COMO SUBSTRATOS DA TIOREDOXINA
REDUTASE**

Elaborada por
Andressa Sausen de Freitas

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

COMISSÃO ORGANIZADORA

João Batista Teixeira da Rocha
(Presidente/ Orientador)
(UFSM)

Jeferson Luís Franco
(UNIPAMPA)

Daiana Silva de Ávila
(UNIPAMPA)

Margareth Linde Athayde
(UFSM)

Ricardo Brandão
(UFSM)

Santa Maria, 15 de julho de 2011

“DA FELICIDADE
Quantas vezes a gente, em busca da ventura,
Procede tal e qual o avozinho infeliz:
Em vão, por toda parte, os óculos procura
Tendo-os na ponta do nariz!”

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela vida, pela saúde, pela família, pelo amor e por iluminar os caminhos que escolho para seguir;

Aos meus pais, Carlos e Lara pelos valores, ensinamentos, apoio incondicional e por acreditarem que sou capaz, mesmo quando nem eu acredito. Enfim, por sempre me incentivarem a estudar e estar em busca de novos conhecimentos. Este momento é para vocês;

Aos meus avós, Delfino e Geracilda, Lourenço e Altanira, pelo carinho, pela torcida, pelas velas acesas. Obrigada!

Ao meu irmão Luiz Felipe, pela amizade, pelos momentos de descontração.... Saudade de passarmos mais momentos juntos.

Ao Guilherme, por tudo: amar, apoiar, compreender e tornar tudo mais fácil. Obrigada, por ser o melhor companheiro que poderia ter, estando do meu lado de forma incondicional e assim me fazendo mais feliz. Amo-te;

Ao meu orientador João Batista, meus agradecimentos pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela dedicação e pela paciência comigo. Minha sincera admiração!

Ao pessoal do laboratório, em especial, à Carol, Jéssie e Cris, pelos ensinamentos, empréstimos de materiais, pela amizade. Ao Alessandro e a Emily pelo apoio durante os experimentos. Agradeço a todos pelo convívio e conhecimentos compartilhados;

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica que contribuíram de alguma forma para minha formação;

As funcionárias, Angélica e Márcia pelo atendimento e auxílio sempre prestados com boa vontade e simpatia;

Enfim, a todos aqueles, que com seus conhecimentos, comentários, sugestões e apoio tornaram possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

Avaliação do Disseleneto de Difenila e análogos como substratos da tioredoxina redutase

AUTOR: Andressa Sausen de Freitas

ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, Julho de 2011

Desde que o ebselen, um composto orgânico de selênio, foi utilizado com relativo sucesso no tratamento de condições neuropatológicas associadas ao estresse oxidativo, há um empenho para o entendimento preciso de seu mecanismo de ação e de outros compostos orgânicos de selênio. Embora o mecanismo de ação destes compostos tenha sido relacionado com suas capacidades de mimetizar a enzima glutationa peroxidase (GPx), estudos têm demonstrado que o ebselen serve como substrato para a tioredoxina redutase (TrxR) de mamíferos, o que pode ser outro componente de sua ação farmacológica, uma vez que o sistema da TrxR tem um importante papel na defesa celular protegendo as células de processos oxidativos, por meio da redução de hidroperóxidos. Contudo, há uma escassez de informações sobre a capacidade de outros compostos orgânicos de selênio atuarem como substrato para a TrxR de mamíferos. Assim, no presente estudo testamos a hipótese de que o ebselen, o disseleneto de difenila e seus análogos (disseleneto de 4,4-bistrifluormetildifenila, disseleneto de 4,4-bismetoxidifenila, disseleneto de 4,4-biscarboxidifenila, disseleneto de 4,4-bisclorodifenila e disseleneto de 2,4,6-hexametildifenila) também poderiam servir como substratos para a TrxR hepática e cerebral de ratos. O disseleneto de difenila, disseleneto de bismetoxidifenila e disseleneto de bisclorodifenila (em concentrações de 10, 15 e 20 μ M) estimularam a oxidação do NADPH na presença de TrxR hepática e cerebral. No entanto, ebselen e disseleneto de bistrifluormetildifenila que demonstraram ser substrato para a TrxR hepática, não serviram como substrato para a TrxR cerebral, o que pode ser explicado pelas diferenças de expressão das isoformas de TrxR, bem como pela existência de variantes de splices alternativos em diferentes tecidos e células. Os resultados aqui apresentados também sugerem que o disseleneto de difenila apresenta propriedades hepato e

neuroprotetoras por fazer uso das duas vias, aqui estudadas, para degradação de peróxidos, ou seja, por servir como substrato para a TrxR e por atuar como mimético da glutathiona peroxidase. No entanto, as propriedades neuroprotetoras do ebselen podem ser devido à atividade mimética à glutathiona peroxidase, uma vez que este composto não provou ser um bom substrato para a TrxR cerebral. Também o disseleneto de bismetoxidifenila não demonstrou atividade mimética à GPx, porém foi um bom substrato para a TrxR, logo nossos estudos indicam uma dissociação entre as duas vias para degradação de peróxido de hidrogênio, ou seja, disselenetos que são bons substratos para a TrxR não são necessariamente miméticos à GPx e vice-versa.

Palavras-chaves: Glutathiona Peroxidase, Tioredoxina redutase, Compostos orgânicos de selênio

ABSTRACT

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

Ability of diphenyl diselenide and analogs as substrates of thioredoxin reductase

AUTHOR: Andressa Sausen de Freitas
ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha
DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, July, 2011

Since the successful use of the organoselenium compound ebselen in clinical trials for the treatment of neuropathological conditions associated with oxidative stress, there have been concerted efforts geared towards understanding the precise mechanism of action of ebselen and other organoselenium compounds, especially the diorganyl diselenides such as diphenyl diselenide, and its analogs. Although the action mechanism of ebselen and other organoselenium compounds has been shown to be related to their ability to generally mimic native glutathione peroxidase (GPx), ebselen has also been shown to serve as a substrate for the mammalian thioredoxin reductase (TrxR), demonstrating another component of its pharmacological mechanisms, since thioredoxin reductase (TrxR) system plays important roles in cellular defense protecting against oxidative processes, possibly by the detoxification of hydroperoxides. In fact, there is a dearth of information on the ability of other organoselenium compounds, especially diphenyl diselenide and its analogs, to serve as substrates for the mammalian enzyme thioredoxin reductase. Therefore, in the present study, we tested the hypothesis that ebselen, diphenyl diselenide and some of its analogs (4,4'-bistrifluoromethyldiphenyl diselenide, 4,4'-bismethoxy-diphenyl diselenide, 4,4'-biscarboxydiphenyl diselenide, 4,4'-bischlorodiphenyl diselenide, 2,4,6,2',4',6'-hexamethyldiphenyl diselenide) could also be substrates for rat hepatic and cerebral TrxR. Then, Diphenyl diselenide, bismethoxydiphenyl diselenide and bischlorodiphenyl diselenide (at concentrations of 10, 15 and 20 μM) stimulated NADPH oxidation in the presence of partially purified brain and liver rat TrxR. However, Ebselen and bistrifluoromethyl-diphenyl diselenide that demonstrated to act as a substrate for liver TrxR did not serve as a substrate for cerebral TrxR. This fact can be

explained by the differential expression of TrxR isoforms and the existence of alternative splice variants of TrxR in different mammalian tissues or cells. The results presented here, also, suggest that diphenyl diselenide displays neuroprotective properties by mimicking the activity of glutathione peroxidase and also act as a substrate for the enzyme thioredoxin reductase. However, Ebselen has not proven to be a good substrate for the brain TrxR, indicating that the neuroprotective property of this compound is due to its thiol peroxidase- like activity. Therefore, we show for the first time that diselenides are good substrates for mammalian TrxR, but not necessarily good mimetics of GPx, and *vice versa*. For instance, bis-methoxydiphenyl diselenide had no GPx activity, whereas it was a good substrate for reduction by TrxR. Our experimental observations indicate a possible dissociation between the two pathways for peroxide degradation (either via substrate for TrxR or as a mimic of GPx).

Keywords: Glutathione peroxidase; Thioredoxin reductase; Organoselenium compounds

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Representação esquemática da incorporação de selenocisteína a selenoproteínas (Nogueira& Rocha, 2011)..... 22

Figura 2- Representação esquemática das isoformas de TrxR e GPx. (Lu & Holmgren, 2009)..... 23

Figura 3- Ciclo catalítico da enzima GPx..... 24

Figura 4- Mecanismo catalítico da TrxR (Arnér & Holmgren,2000)..... 26

Figura 5- Estrutura química do 2-fenil-1,2-benzilsoselenazol-3(2H)-ona ou ebselen..... 27

Figura 6- Redução do ebselen (Ebse) e selenocistina (Sec-Sec) pelo sistema tioredoxina redutase (Lu, Berndt & Holmgren, 2009)..... 28

Figura 7- Estrutura química do disseleneto de difenila ((PhSe)₂)..... 28

Figura 8- Estrutura química do disseleneto de 3,3- bistrifluormetildifenila (Machado, 2009)..... 30

Figura 9- Estrutura química do disseleneto de 4,4-bismetoxidifenila (Wilhelm, 2009b)..... 30

ARTIGO 1

Figure 1- Structures of diselenide compounds..... 38

Figure 2- Reduction of diselenide compounds I (A), II (B), III (C), IV (D), V (E) e VI (F) by NADPH catalyzed by mammalian Thioredoxin Reductase (TrxR). Enzyme was mixed with a medium containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH

7,5 and then reaction was started by adding NADPH (final concentration 100 μ M). 0 (\square), 10(O), 15(Δ), 20(∇) μ M diselenide compounds..... 40

Figure 3- Reduction of ebselen (0, 5, 7.5, 10, 15 or 20 μ M) by NADPH catalyzed by mammalian TrxR. Enzyme was mixed with a medium containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 and, then reaction was started by adding NADPH (final concentration 100 μ M). 43

Figure 4- GPx like behavior of diselenide compounds: (I) diphenyl diselenide, (II) bistrifluoromethyldiphenyl diselenide, (III) bismethoxydiphenyl diselenide, (IV) biscarboxydiphenyl diselenide, (V) bischlorodiphenyl diselenide and (VI) hexamethyl-diphenyl diselenide. Two hundred μ M of diselenide compounds was added..... 44

Figure 5- GPx like behavior of ebselen . Fifty μ M of ebselen was tested. Statistical analysis were performed by two-way ANOVA (two concentrations \times 13 times of sampling)..... 45

Figure 6- Correlation analysis (by Sperman rank test) between the thiol oxidase activity with the effectiveness of diselenides and ebselen as substrate of hepatic mammalian TrxR (A) or with thiol peroxidase-like activity (B) or and between thiol-peroxidase like activity and the effectiveness of diselenides and ebselen as substrates for TrxR (C)..... 46

MANUSCRITO 1

Figure 1- Structures of diselenide compounds and ebselen..... 67

Figure 2- Reduction of diselenide compounds and Ebselen I (A), II (B), III (C), IV (D), V (E), VI (F), VII (G) by NADPH catalyzed by cerebral mammalian Thioredoxin Reductase (TrxR)..... 68

LISTA DE ESQUEMAS

MANUSCRITO 1

Scheme 1- Mechanisms for neuroprotective (A,C) and hepatoprotective (B,D) effects of diphenyl diselenide (PhSeSePh) and Ebselen (Ebse). Two pathways are indicated: 1) indicates the TrxR catalyzed formation of selenophenol (the selenol intermediate of diphenyl diselenide; PhSeH; A,B) and the selenol of ebselen ;Ebse-SeH; D) and 2) indicates the thiol-peroxidase-like pathway, where endogenous reduced thiols can directly reduce diphenyl diselenide and ebselen to their respective selenol intermediates (A-D).....69

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1- Effects of different selenium compounds on DTT oxidation..... 39

Table 2- Comparisons of the relative activities (GPx, TrxR and Thiol oxidase) of organoseleno compounds..... 47

MANUSCRITO 1

Table 1 – Comparative Reduction of Diphenyl Diselenide and Ebselen by Hepatic and Cerebral TrxR..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância
Cys- cisteína
DMSO- dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
DTNB- 5'5'-ditiobis (ácido-2-nitrobenzóico)
DTT- ditioneitol
EbSe- ebselen
EbSe-SeH/EbSe-Se⁻ - selenol/selenolato intermediário do Ebselen
EbSe-SeOH- ácido selenênico
EDTA- ácido etilenodiamino-tetra-acético
EFSec- fator de alongamento
Enz-SeH- selenol
Enz-SeOH- ácido selenênico
ERNs- espécies reativas de nitrogênio
EROs – espécies reativas de oxigênio
FAD- flavina adenina di-nucleotídeo
Gly - glicina
GPx – glutationa peroxidase
GSH – glutationa reduzida
GSSG – glutationa oxidada
HNO₂- ácido nitroso
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NO[•] - óxido nítrico
NO₂⁻ - nitrito
NO₃⁻ - nitrato
N₂O₃ – óxido nitroso
O₂^{•-} – superóxido
[•]OH – radical hidroxil
ONOO⁻ - peroxinitrito

(PhSe)₂, PhSe-SePh – disseleneto de difenila
PhSeH/PhSe⁻ - selenol/selenolato intermediário do disseleneto de difenila
PhSeOH – ácido selenênico
PhSH – tiofenol
PhSPh – dissulfeto de difenila
RNA – ácido ribonucléico
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
RNAt - ácido ribonucléico transportador
RSH – tiol reduzido
RSSG – tiol oxidado
Se – selênio
Se⁺⁶ – selenato
Se⁺⁴ – selenito
Se⁰ – selênio elementar
Se⁻² – seleneto
Sec – selenocisteína
Sec-Sec – selenocistina
Sec-SeH – selenol
Sec- SeOH – ácido selenênico
SECIS – fator de inserção de elemento de sequência
SECIS 2 – proteína de ligação
SePO₄ – selenofosfato
Ser - serina
TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGR – tioredoxina glutathion redutase ou glutaredoxina
Trx – tioredoxina
TrxR – tioredoxina redutase
Trx-S₂ – tioredoxina oxidada
Trx- SH₂ – tioredoxina reduzida
U - selenocisteína

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ESQUEMAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
APRESENTAÇÃO.....	17
1.INTRODUÇÃO.....	18
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Estresse oxidativo.....	20
2.2 Selênio.....	21
2.3 Selenoproteínas.....	21
2.3.1 Glutathiona Peroxidase.....	24
2.3.2 Tioredoxina redutase.....	25
2.4 Compostos orgânicos de selênio.....	26
2.4.1 Ebselen.....	27
2.4.2 Disseleneto de Difenila.....	28
2.4.3 Análogos do disseleneto de difenila.....	29
3.OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	33
4.1 ARTIGO 1.....	34
4.2 MANUSCRITO 1.....	55
5. DISCUSSÃO.....	70
6.CONCLUSÃO.....	74
7. PERSPECTIVAS.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

APRESENTAÇÃO

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres, substâncias cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado, principalmente, nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No entanto, o excesso dessas espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERNs) apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão à proteínas, carboidratos e DNA, podendo conduzir a várias patologias, tais como Alzheimer, Parkinson, aterosclerose, diabetes, câncer, entre outras (Halliwell, 1992). O excesso de radicais livres é combatido por antioxidantes que são produzidos pelo organismo ou que provém da dieta, entre as substâncias antioxidantes, está o selênio, por isso, atualmente existe um grande interesse no estudo dessa substância.

O selênio foi descoberto pelo químico suíço Jöns Jacob Berzelius em 1817 e tem sido reconhecido como um microelemento essencial para muitas formas de vida, incluindo o homem, uma vez que faz parte de enzimas com atividade antioxidante. Nas últimas três décadas, o conceito de que o selênio pode ser melhor nucleófilo que outros antioxidantes têm levado à síntese de compostos orgânicos de selênio (Arteel & Sies, 2001).

O Ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona), um organocalcogênio, têm demonstrado êxito em experimentos clínicos, especialmente em patologias associadas com estresse oxidativo (Yamaguchi et al., 1998; Saito et al., 1998; Ogawa et al., 1999). Esses resultados promissores têm estimulado o interesse na área dos compostos orgânicos de selênio, com ênfase em suas propriedades biológicas (Engman et al., 1997; Mugesh et al., 2001; Nogueira et al., 2004; Ávila et al., 2008). De modo geral, estas propriedades têm sido atribuídas, principalmente, às suas atividades tipo tiol peroxidase ou glutathione peroxidase, ou seja, a capacidade de decompor peróxidos utilizando para isso a glutathione reduzida ou outros tióis (Wilson et al., 1989; Mugesh et al., 2001; Farina et al., 2003; Nogueira et al., 2004).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o Ebselen é também substrato para a tioredoxina redutase (TrxR) de mamíferos, ou seja, o Ebselen e

seus disselenetos podem ser reduzidos em presença de NADPH e TrxR a um intermediário selenol/selenolato que decompõe eficientemente o peróxido de hidrogênio. Estes estudos consideram, ainda, que a decomposição de peróxidos pelo Ebselen pode ser mais eficiente pela via da TrxR do que por sua atividade tiol peroxidase (Zhao & Holmgren, 2002; Zhao et al., 2002).

O disseleneto de difenila (PhSe)₂, outro organocalcogênio, tem demonstrado propriedades antioxidantes e neuroprotetoras similares às do Ebselen. Esse composto, assim como o Ebselen, reage eficientemente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos através de reação similar à catalisada pela glutathiona peroxidase (GPx). Contudo, há uma escassez de informações na literatura indicando que compostos orgânicos de selênio, tais como o disseleneto de difenila e análogos, possam ser substratos para TrxR. Considerando que a TrxR pode ser a principal via para decomposição de peróxidos utilizada pelo Ebselen e que diaril disselenetos têm demonstrado atividades semelhantes às do Ebselen, testamos a hipótese de que estes compostos também poderiam ser substratos para a TrxR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estresse oxidativo

As células estão continuamente produzindo radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) como parte do processo metabólico. As EROs incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como radicais livres tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($\cdot OH$) entre outros. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ($NO\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Essas espécies possuem grande reatividade e instabilidade e, por isso, podem atacar componentes celulares provocando danos em lipídios, proteínas e no DNA, o que desencadeia uma série de eventos envolvidos em diversas doenças.

As espécies reativas são normalmente neutralizadas pelos sistemas antioxidantes presentes no organismo. Os antioxidantes são substâncias que direta ou indiretamente protegem os sistemas celulares dos efeitos tóxicos produzidos por radicais oxidativos (Halliwell, 1995). As defesas antioxidantes podem ser tanto enzimáticas (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, tioredoxina redutase, entre outras) quanto não-enzimáticas (glutathione, tocoferóis, ácido ascórbico). Assim, o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de espécies reativas quanto da redução da capacidade antioxidante celular total (Halliwell, 1992; Dawson & Dawson, 1996).

O estresse oxidativo tem sido implicado em uma variedade de doenças degenerativas incluindo, os males de Alzheimer e Parkinson, doenças inflamatórias, câncer, diabetes mellitus e aterosclerose, bem como na toxicidade induzida por metal (Aschner et al., 2007). Desta forma, a utilização de agentes com atividade antioxidante na terapêutica desses distúrbios pode ser eficaz. Por isso a busca por esses agentes tem se tornado cada vez maior.

2.2. Selênio

O selênio é um calcogênio do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

Na primeira metade do século XX, foi considerado um elemento indesejável devido à sua toxicidade, contudo, na segunda metade do século XX houve uma mudança na importância deste composto para a biologia e nutrição humana.. Uma nova perspectiva biológica do selênio foi demonstrada por um trabalho pioneiro de Schwarz & Foltz (1957), o qual reportava que esse elemento, em baixas concentrações, é um nutriente essencial.

O selênio pode ser encontrado nos seguintes alimentos: castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (Dumont et al., 2006). Nos últimos anos, tem sido relatado que a sua deficiência pode levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose, doença cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000). Contudo, altas doses podem ser tóxicas, uma vez que esse elemento possui a habilidade de oxidar grupamentos tiólicos (Barbosa et al., 1998; Nogueira et al., 2004).

O papel bioquímico do selênio ficou evidente quando foi demonstrado que esse calcogênio é componente de muitas proteínas nomeadas, selenoproteínas. Entre elas, as enzimas glutathione peroxidase (Flohe & Gunzler, 1973) e tioredoxina redutase (Engman et al., 1997). Estes sistemas enzimáticos têm importantes papéis na defesa celular, protegendo contra processos oxidativos, possivelmente pela detoxificação de hidroperóxidos e, ainda, apresentam envolvimento específico na defesa contra o peroxinitrito (Sies & Arteel, 2000; Klotz & Sies, 2003).

2.3 Selenoproteínas

Selenoproteínas são proteínas que contêm o selênio na forma de seleniocisteína (Sec, U), agora reconhecida como o 21º aminoácido. Muitas selenoproteínas têm sido identificadas, entre elas as enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e tioredoxina redutase (Holben et al., 1999).

As selenoproteínas existem em bactérias e eucariotos, mas não em todas as espécies desses reinos. Plantas superiores e leveduras, por exemplo, não possuem selenoproteínas e nem o sistema necessário para sua síntese (Lu & Holmgren, 2009).

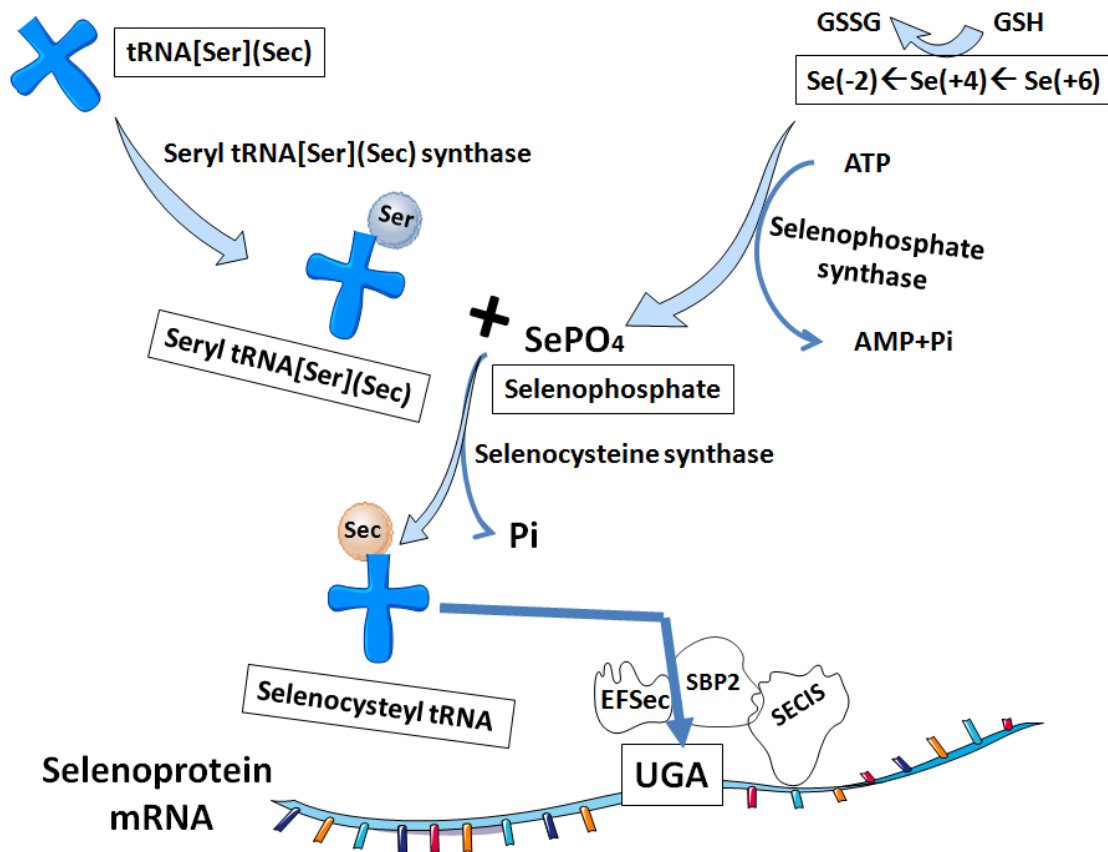


Figura 1: Representação esquemática da incorporação de selenocisteína a selenoproteínas (Nogueira & Rocha, 2011).

A incorporação de selênio como Sec em uma selenoproteína exige um mecanismo específico para decodificar o códon UGA no RNA mensageiro (RNAm), que normalmente opera na terminação da tradução. Selenito e selenato provenientes dos alimentos são utilizados por células de mamíferos como fonte de selênio. O selenito é reduzido a seleneto pela glutathiona e sistema tioredoxina. Selenetos também podem ser gerados a partir de selenometionina e Sec da dieta, e ser utilizado como fonte de selênio para biossíntese de Sec.

A selenofosfato sintase 2, converte o seleneto a selenofosfato, que é o doador de selênio para um selenocisteinil no RNA transportador (RNAt). Fatores

de inserção de elemento de seqüência (SECIS) e proteínas (um fator de alongamento EFSec e a proteína de ligação SECIS 2) trabalham em conjunto para incorporar a Sec em um polipeptídeo nascente no local codificado pelo códon UGA em células de mamíferos (Lu & Holmgren, 2009; Nogueira & Rocha, 2011) (Figura 1).

As selenoproteínas de mamíferos podem ser classificadas em dois grupos de acordo com a localização do resíduo de selenocisteína. Um grupo de selenoproteínas possui Sec em um sítio muito perto do C-terminal da proteína, como a Tio redoxina redutase. E o outro grupo, que inclui a glutatona peroxidase, tem o resíduo de Sec na parte N-terminal (Figura 2) (Lu & Holmgren, 2009).

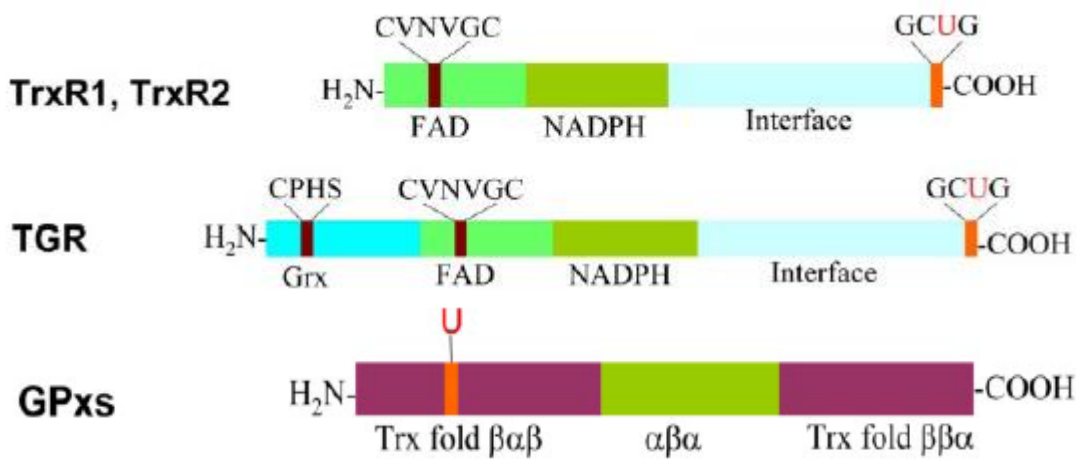


Figura 2: Representação esquemática das isoformas de TrxR e GPx. (Lu & Holmgren, 2009)

As pesquisas recentes têm procurado estabelecer a função e a biologia molecular destas selenoproteínas, uma vez que o selênio está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas como a glutatona peroxidase (Wingler & Brigelius-Flohé, 1999) e tioredoxina redutase (Holmgren, 1985). A partir dessas evidências muitas pesquisas têm proposto que compostos orgânicos de selênio possam mimetizar a ação da enzima glutatona peroxidase (Mugesh et. al, 2001; Nogueira et. al, 2004).

2.3.1 Glutathiona peroxidase

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma selenoenzima com atividade antioxidante que protege vários organismos vivos do estresse oxidativo. Ela catalisa a redução de metabólitos do ânion superóxido, tais como peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos lipídicos na presença de glutathiona (GSH), formando, como produtos, água e glutathiona oxidada (GSSG) (Iwaoka & Tomoda, 1993).

Nos anos 70 ficou demonstrado que a GPx é uma enzima selênio (Se)-dependente com estrutura tetramérica (Flohé et al., 1973), ou seja, possui quatro subunidades idênticas contendo, em cada uma, um sítio catalítico composto pelo resíduo de selenocisteína (Sec) como subunidade que participa do processo catalítico (Chambers et al., 1986).

O selênio (Se) do sítio catalítico está envolvido na formação do intermediário selenol (Enz-SeH), que reage com o peróxido reduzindo-o à água ou álcool formando o ácido selenênico (Enz-SeOH). Este reage com a glutathiona reduzida (GSH) formando o selenosulfeto (Enz-SeSG). Finalmente, este é atacado por um segundo equivalente de GSH regenerando a forma ativa da enzima e produzindo simultaneamente a glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 3) (Wendel et al., 1984; Ursini et al., 1995).

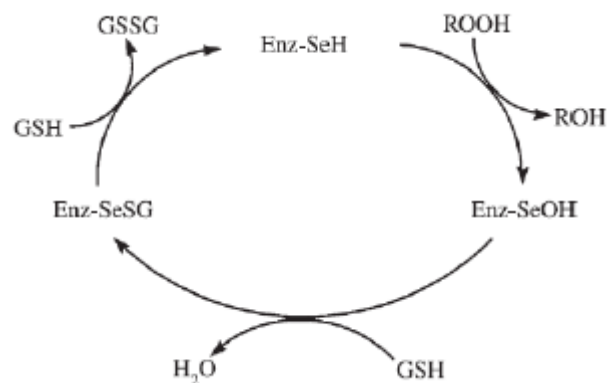


Figura 3: Ciclo catalítico da enzima GPx

Existem seis tipos de enzimas GPx, as quais são divididas de acordo com a sequência de aminoácidos, especificidade por substrato e localização subcelular. A GPx, também chamada de GPx clássica, citosólica ou celular (GPx1) é a mais abundante selenoenzima, pois é encontrada em quase todos

os tecidos (Chu et al., 1993). A GPx2 ocorre no citosol principalmente do trato gastrintestinal (Cheng et al., 1997). A GPx3 foi primeiramente identificada no plasma humano e é uma glicoproteína compatível com sua função extracelular (Takahashi et al., 1987). A GPx4, também chamada de fosfolípido hidroperóxido, está associada à membrana celular e é descrita como uma proteína inibidora de peroxidação. Em contraste com as outras GPx, as quais possuem estrutura tetramérica, a GPx4 é um monômero e encontra-se principalmente no cérebro e coração de mamíferos (Duan et al., 1988; Ursini et al., 1995). As GPx5 e GPx6, diferem das demais por não serem selênio-dependentes, ou seja, apresentam cisteína no sítio catalítico (Kryukov et al., 2003) e suas funções biológicas ainda não estão bem estabelecidas. Embora a GPx possa agir em uma ampla gama de substratos, dados experimentais *in vitro* sugerem que todos os tipos de GPx são específicos para a GSH como agente redutor.

2.3.2. Tioredoxina redutase (TrxR)

Juntamente com o sistema da glutathiona peroxidase, o sistema da tioredoxina redutase é reconhecido como o principal regulador do ambiente redox intracelular. O sistema tioredoxina é formado pela enzima tioredoxina redutase, pela proteína tioredoxina (principal substrato para a TrxR) e NADPH. Nesse sistema, a TrxR reduz o dissulfeto do sítio ativo da tioredoxina a ditiol, usando o NADPH como doador de elétrons (Figura 4) (Arnér & Holmgren, 2000; Arnér, 2009).

As isoenzimas de TrxR são oxirredutases homodiméricas dependentes de NADPH e contêm um FAD por subunidade (Lu & Holmgren, 2009). Três isoformas de TrxR já foram identificadas em mamíferos: TrxR citosólica (TrxR1 ou TrxR), a mitocondrial (TrxR2) e tioredoxina glutathiona redutase (TrxR3 ou TGR), isolada de testículos de ratos (Figura 1) (Nordberg & Arnér, 2001; Arnér, 2009; Lu & Holmgren, 2009).

As três isoformas de TrxR são selenoproteínas que contêm um resíduo selenocisteína (Sec) próximo à porção carboxi-terminal, o qual é essencial para sua atividade (Lu & Holmgren, 2009) (Figura 1). Além disso, a acessibilidade e alta reatividade do selenolato na porção C-terminal do sítio ativo confere à TrxR

de mamíferos uma ampla gama de substratos, desde moléculas pequenas como selenito e hidroperóxidos lipídicos a proteínas como a tioredoxina (Trx).

Muitos estudos demonstram que a atividade antioxidante da TrxR de mamíferos pode estar relacionada também à regeneração direta de compostos antioxidantes pela enzima. A redução do ácido ascórbico e do radical ascorbil livre, do ácido lipóico e da ubiquinona podem ser eficientemente realizadas pela TrxR. Da mesma maneira, a redução de compostos de selênio para a síntese da própria TrxR e de outras selenoproteínas torna a TrxR uma enzima chave no metabolismo do selênio no organismo (Nordberg & Arnér, 2001).

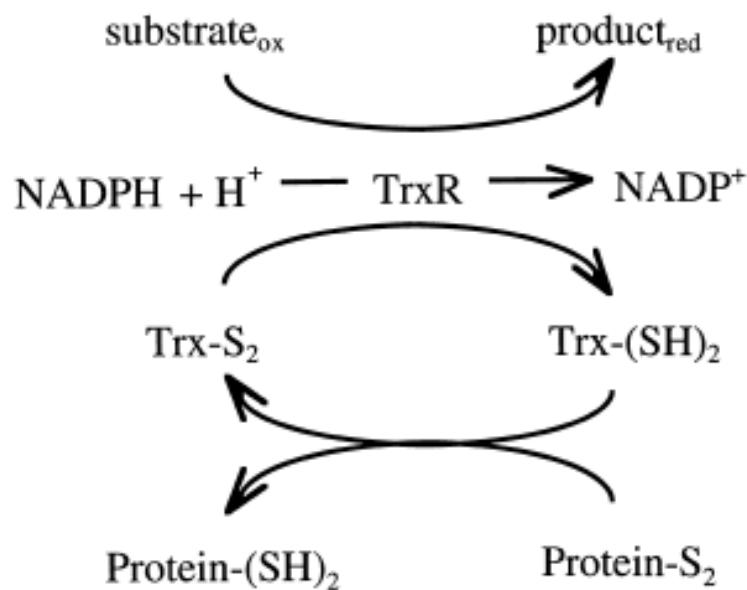


Figura 4: Mecanismo catalítico da TrxR (Arnér & Holmgren,2000)

2.4. Compostos orgânicos de selênio

O interesse pelos organocalcogênios teve início a partir de 1930, após a descoberta de aplicações sintéticas e de propriedades biológicas importantes desta classe de compostos (Petraghani et al., 1976; Parnham & Graf, 1991). Consequentemente, a tentativa crescente de desenvolver substâncias dessa classe com aplicações farmacológicas aumentou notavelmente nas últimas décadas (Parnham & Graf, 1991). O fato de moléculas simples contendo selênio atuarem como potentes agentes antioxidantes tem conduzido à síntese de

compostos orgânicos que utilizam a atividade redox do selênio (Arteel & Sies, 2001; Commandeur et al., 2001; May et al., 2002).

2.4.1 Ebselen

O protótipo da classe de orgânicos de selênio é o ebselen (Figura 5), um composto que tem sido extensivamente estudado nas últimas décadas. Apresenta baixa toxicidade, sendo o primeiro a ser relatado como um mimético da enzima GPx e usado com relativo sucesso no tratamento de isquemia cerebral humana (Dawson et al., 1995).

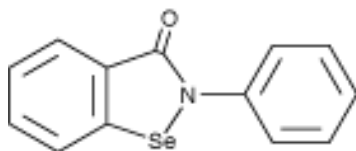


Figura 5: Estrutura química do 2-fenil-1,2-benziloselenazol-3(2H)-ona ou ebselen.

Este composto reage com grupos tióis, como a glutathiona (GSH) (Ullrich et al., 1996), e apresenta uma série de propriedades farmacológicas, tal como inibição da peroxidação lipídica (Parnhan & Graf, 1987), inibição da atividade de lipoxigenase (Parnhan & Graf, 1987), bloqueio da produção do ânion superóxido e proteção contra o peroxinitrito (Masumoto & Sies, 1996). Além disso, possui propriedades antioxidantes incluindo atividade antiinflamatória, antinociceptiva e neuroprotetora (Maiorino et al., 1992; Nogueira et al., 2004; Burger et al., 2005). Isso se deve provavelmente à sua habilidade de reduzir peróxidos consumindo GSH e outros tióis, mimetizando a atividade catalítica da selenoenzima GPx. Essa capacidade mimética do ebselen tem sido utilizada como padrão para comparar com outros compostos de Selênio.

Recentemente, Zhao & Holmgren (2002), demonstraram que o ebselen também interage como substrato para a enzima TrxR podendo ser reduzido pelos elétrons provenientes do NADPH e formando um intermediário selenol/selenolato. Este, por sua vez, pode eficientemente decompor peróxido de hidrogênio (Figura 6). Essa pesquisa também considera que a decomposição

de peróxidos pelo ebselen via TrxR pode ser mais eficiente do que pela atividade mimética à GPx.

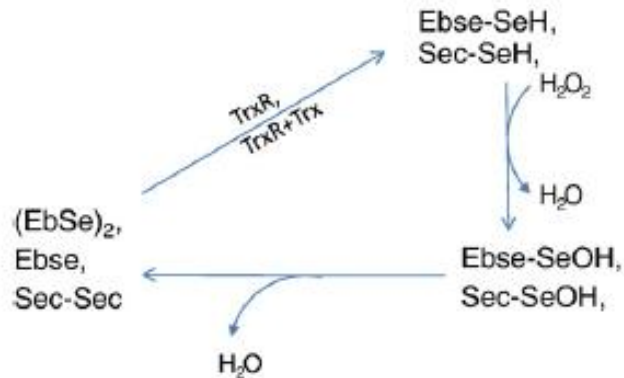


Figura 6: Redução do ebselen (Ebse) e selenocistina (Sec-Sec) pelo sistema tioredoxina redutase (Lu, Berndt & Holmgren, 2009)

2.4.2 Disseleneto de Difenila

Estudos têm reportado que diaril disselenetos são potentes antioxidantes (Cotgreave et al, 1992). Entre esses compostos, o disseleneto de difenila (figura 7), um simples organocalcogênio, apresenta muitas atividades biológicas comuns ao Ebselen (Meotti et al., 2004, Nogueira et al., 2004).

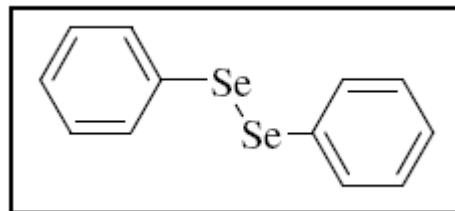


Figura 7: Estrutura química do disseleneto de difenila $((\text{PhSe})_2)$.

O disseleneto de difenila é um composto orgânico de selênio que apresenta efeitos anti-ulcerosos (Savegnago et al., 2005), antiinflamatórios,

antinociceptivos (Nogueira et al, 2003b), hepatoprotetor (Borges et al., 2006) e antioxidante em alguns modelos experimentais para a avaliação de estresse oxidativo (Nogueira et al., 2004; Santos et al., 2005a,b; Borges et al., 2006; Luchese et al., 2007). Adicionalmente, este composto também apresenta atividade quelante em animais expostos ao cádmio (Santos et al., 2005a), bem como, capacidade de reduzir as concentrações de mercúrio em cérebro, rim e fígado de camundongos (de Freitas et al., 2009).

Assim como o ebselen, o disseleneto de difenila reage eficientemente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos através de reação similar à catalisada pela glutathione peroxidase (GPx). Todavia, o disseleneto de difenila demonstrou ser mais ativo como mimético da glutathione peroxidase (Wilson et al., 1989) e menos tóxico em roedores que o Ebselen (Nogueira et al., 2003a; Meotti et al., 2003).

2.4.3 Análogos do disseleneto de difenila

Devido às numerosas atividades biológicas relatadas para o disseleneto de difenila, tem sido investigado se a introdução de grupamentos funcionais no anel aromático do disseleneto de difenila pode alterar seus efeitos. De fato, segundo Nogueira et al., (2003a) o disseleneto de difenila provoca convulsões tônico-clônicas em camundongos, que são reduzidas ou suprimidas pela introdução de grupamentos funcionais (cloro, trifluormetil e metoxi) no anel aromático deste composto.

Contudo, Wilhelm et al., (2009a) demonstrou que a introdução do grupamento trifluormetil na posição *meta* do anel aromático do disseleneto de difenila induz toxicidade e altera o efeito protetor deste composto contra o dano induzido pelo 2-nitropropano em ratos. Em contrapartida, outros estudos demonstram que este mesmo composto, o disseleneto de 3,3-bistrifluormetildifenila (Figura 8) é um composto antioxidante e antimutagênico, capaz de proteger bactérias, leveduras e culturas de células de mamíferos contra mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio (Machado et al., 2009).

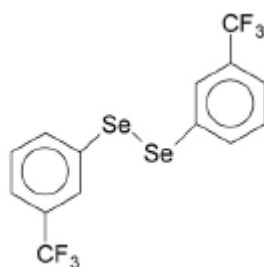


Figura 8: Estrutura química do disseleneto de 3,3-bistrifluormetildifenila (Machado et al., 2009).

Outro composto com substituição na posição *para* do anel aromático do disseleneto de difenila, o disseleneto de 4,4-bismetoxidifenila, (figura 9) demonstrou compensar o déficit nos sistemas antioxidantes hepáticos e melhorar o dano induzido por lipopolissacarídeo e D-galactosamina em camundongos (Wilhelm et al., 2009b). Este composto também tem demonstrado propriedades antinociceptivas (Jesse et al., 2009) e neuroprotetoras (Pinton et al., 2010) que são mais relacionadas com sua capacidade de modular receptores do que com sua atividade antioxidante. Contudo, há uma escassez de informações na literatura indicando que compostos orgânicos de selênio, tais como o disseleneto de difenila e análogos possam ser substratos para TrxR.

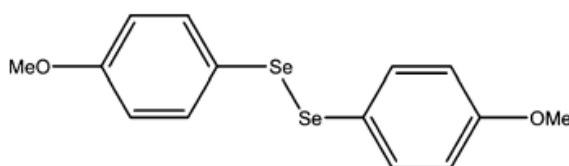


Figura 9: Estrutura química do disseleneto de 4,4 bismetoxidifenila (Wilhelm, 2009b).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de alguns compostos orgânicos de selênio como substratos para a enzima tioredoxina redutase de cérebro e fígado de rato.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a redução do ebselen, disseleneto de difenila e análogos (disseleneto de 4,4-bistrifluormetildifenila, disseleneto de 4,4-bismetoxidifenila, disseleneto de 4,4-biscarboxidifenila, disseleneto de 4,4-bisclorodifenila e disseleneto de 2,4,6-hexametildifenila) pela tioredoxina redutase de fígado de rato.

Avaliar a redução do ebselen, disseleneto de difenila e análogos (disseleneto de 4,4-bistrifluormetildifenila, disseleneto de 4,4-bismetoxidifenila, disseleneto de 4,4-biscarboxidifenila, disseleneto de 4,4-bisclorodifenila e disseleneto de 2,4,6-hexametildifenila) pela tioredoxina redutase de cérebro de rato.

Testar a atividade tiol peroxidase do ebselen, disseleneto de difenila e análogos (disseleneto de 4,4-bistrifluormetildifenila, disseleneto de 4,4-bismetoxidifenila, disseleneto de 4,4-biscarboxidifenila, disseleneto de 4,4-bisclorodifenila e disseleneto de 2,4,6-hexametildifenila).

Testar a atividade tiol oxidase do ebselen, disseleneto de difenila e análogos (disseleneto de 4,4-bistrifluormetildifenila, disseleneto de 4,4-bismetoxidifenila, disseleneto de 4,4-biscarboxidifenila, disseleneto de 4,4-bisclorodifenila e disseleneto de 2,4,6-hexametildifenila).

Correlacionar as atividades tiol peroxidase e tiol oxidase do ebselen, disseleneto de difenila e análogos (disseleneto de 4,4-bistrifluormetildifenila,

disseleneto de 4,4-bismetoxidifenila, disseleneto de 4,4-biscarboxidifenila, disseleneto de 4,4-bisclorodifenila e disseleneto de 2,4,6-hexametildifenila) com a capacidade desses compostos de ser substrato para a enzima tioredoxina redutase hepática.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. O artigo 1 está na forma como foi publicado na revista, enquanto o manuscrito 1 está na forma como foi submetidos à revista.

4.1 Artigo 1

Redução do disseleneto de difenila e análogos pela tioredoxina redutase de mamíferos é independente da atividade mimética a glutathione peroxidase: Uma nova via possível para sua atividade antioxidante

Reduction of Diphenyl Diselenide and Analogs by Mammalian Thioredoxin Reductase Is Independent of Their Glutathione Peroxidase-Like Activity: A Possible Novel Pathway for Their Antioxidant Activity

Andressa Sausen de Freitas, Alessandro de Souza Prestes, Caroline Wagner, Jéssie Haigert Sudati , Diego Alves , Lisiane Oliveira Porciúncula, Ige Joseph Kade and João Batista Teixeira Rocha

Molecules (2010) 15:7699-7714

Article

Reduction of Diphenyl Diselenide and Analogs by Mammalian Thioredoxin Reductase Is Independent of Their Gluthathione Peroxidase-Like Activity: A Possible Novel Pathway for Their Antioxidant Activity

Andressa Sausen de Freitas ¹, Alessandro de Souza Prestes ¹, Caroline Wagner ¹,
Jéssie Haigert Sudati ¹, Diego Alves ², Lisiane Oliveira Porciúncula ³, Ige Joseph
Kade ⁴
and João Batista Teixeira Rocha ^{1,*}

¹ Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria RS, Brazil; E-Mails: andressasausen@yahoo.com.br(A.S.F.); prestes_asp@hotmail.com(A.S.P.); carolwagner@ibest.com.br(C.W.); jhsudati@gmail.com(J.H.S.)

² Departamento de Química, Universidade Federal de Pelotas, Brazil; E-Mail: dalves@gamil.com (D.A.)

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; E-Mail: loporciuncula@yahoo.com.br (L.O.P.)

⁴ Department of Biochemistry, Federal University of Technology of Akure, Akure, Ondo, Nigeria; E-Mail: ijkade@yahoo.com (I.J.K.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jbtrocha@yahoo.com.br; Tel.: 55-55-3220-8140; Fax: 55-55-3220-8978.

Received: 23 August 2010; in revised form: 14 October 2010 / Accepted: 26 October 2010 /

Published: 28 October 2010

Abstract: Since the successful use of the organoselenium drug ebselen in clinical trials for the treatment of neuropathological conditions associated

with oxidative stress, there have been concerted efforts geared towards understanding the precise mechanism of action of ebselen and other organoselenium compounds, especially the diorganyl diselenides such as diphenyl diselenide, and its analogs. Although the mechanism of action of ebselen and other organoselenium compounds has been shown to be related to their ability to generally mimic native glutathione peroxidase (GPx), only ebselen however has been shown to serve as a substrate for the mammalian thioredoxin reductase (TrxR), demonstrating another component of its pharmacological mechanisms. In fact, there is a dearth of information on the ability of other organoselenium compounds, especially diphenyl diselenide and its analogs, to serve as substrates for the mammalian enzyme thioredoxin reductase. Interestingly, diphenyl diselenide shares several antioxidant and neuroprotective properties with ebselen. Hence in the present study, we tested the hypothesis that diphenyl diselenide and some of its analogs (4,4'-bistrifluoromethyldiphenyl diselenide, 4,4'-bismethoxy-diphenyl diselenide, 4,4'-biscarboxydiphenyl diselenide, 4,4'-bischlorodiphenyl diselenide, 2,4,6,2',4',6'-hexamethyldiphenyl diselenide) could also be substrates for rat hepatic TrxR. Here we show for the first time that diselenides are good substrates for mammalian TrxR, but not necessarily good mimetics of GPx, and *vice versa*. For instance, bis-methoxydiphenyl diselenide had no GPx activity, whereas it was a good substrate for reduction by TrxR. Our experimental observations indicate a possible dissociation between the two pathways for peroxide degradation (either via substrate for TrxR or as a mimic of GPx). Consequently, the antioxidant activity of diphenyl diselenide and analogs can be attributed to their capacity to be substrates for mammalian TrxR and we therefore conclude that subtle changes in the aryl moiety of diselenides can be used as tool for dissociation of GPx or TrxR pathways as mechanism triggering their antioxidant activities.

Keywords: glutathione peroxidase; thioredoxin reductase; organoselenium compounds

1. Introduction

In the last three decades, the concept that selenium-containing molecules may be better nucleophiles than classical antioxidants has led to the design of synthetic organoselenium compounds such as ebselen, (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-one) that was reported to exhibit borderline success in clinical trials, especially in pathologies associated with oxidative stress [1-3]. These promising results have stimulated the

interest in the area of organochalcogen synthesis with particular emphasis on their biological properties [4-7].

The antioxidant properties of ebselen and other organochalcogenides have been linked mainly to glutathione peroxidase- or thiol-peroxidase-like activities (*i.e.*, these compounds can decompose peroxides using either reduced glutathione or other thiols) [4,5,8,9]. However, the Holmgren group recently demonstrated that ebselen is also a substrate for mammalian Trx reductase (TrxR) and can be reduced by electrons derived from NADPH, forming its selenol/selenolate intermediate [10,11]. These authors have also observed that the selenol/selenolate of ebselen can be oxidized to ebselen diselenide, which is also a good substrate for mammalian Trx reductase [10]. Consequently, ebselen and its diselenide can be reduced to a common selenol/selenolate that can efficiently decompose hydrogen peroxide. Most importantly, the Holmgren group elegantly obtained persuasive experimental points of evidence indicating that the decomposition of hydrogen peroxide by ebselen via Trx reductase was more efficient than that the thiol-peroxidase-like activity [10].

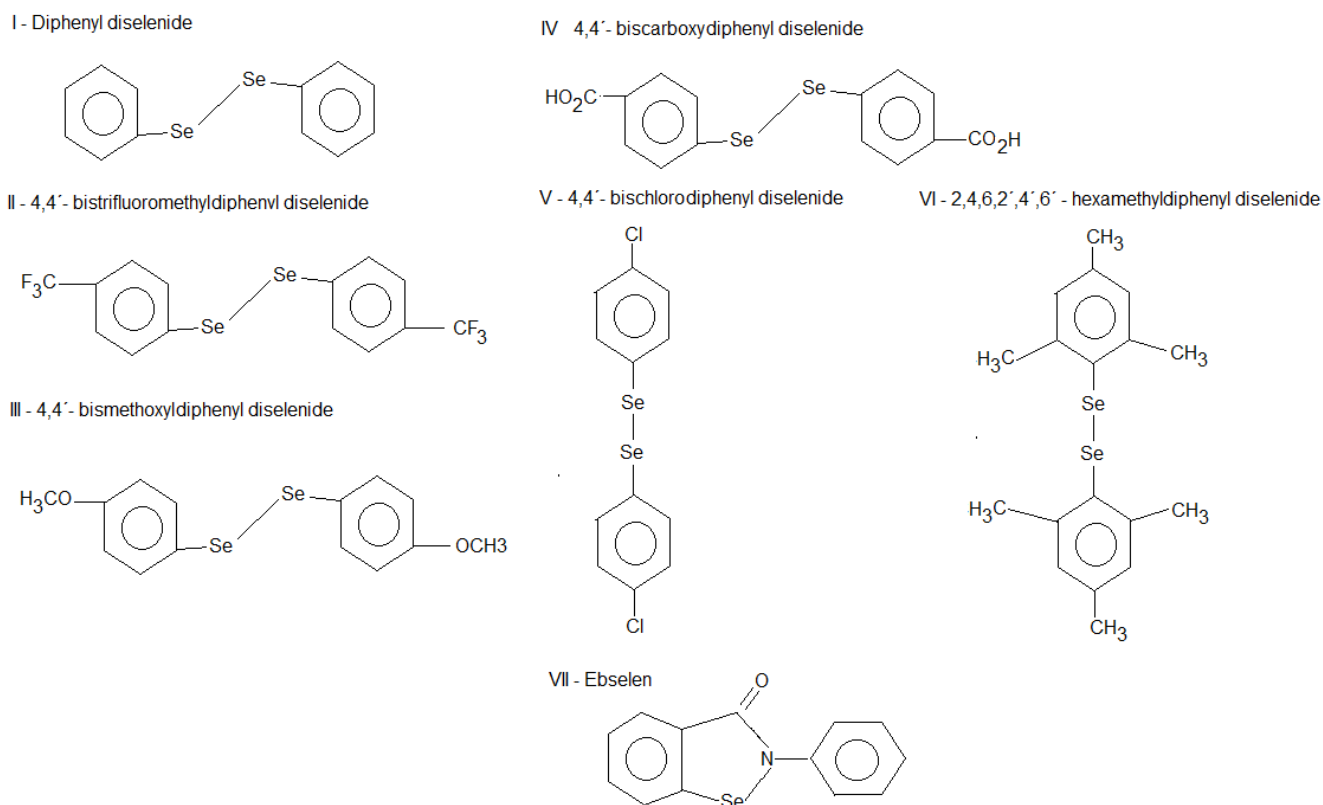
Mammalian TrxRs are large selenoproteins with structures showing a close homology to glutathione reductase, but with an elongation containing a unique catalytically active selenolthiol/selenenylsulfide in the conserved C-terminal sequence Gly-Cys-Sec-Gly. It also has a remarkable wide substrate specificity, reducing not only different thioredoxins but also selenite, selenodiglutathione, selenocystine, ebselen and its diselenide [10,12-15]. During its catalytic cycle, the selenocysteinyl residue of TrxR interacts with a cysteinyl residue, forming an enzyme intermediate that transiently possesses a -S-Se- bond. This bond is subsequently reduced to -SH and SeH, which participate in the reduction of the disulfide from Trx or disulfides and diselenides from artificial substrates (including ebselen diselenide).

On the other hand, classical GPx (GPx1) is a selenium-containing antioxidant enzyme composed of four identical subunits, and each subunit contains one selenocysteine residue [16,17]. This enzyme reduces hydrogen peroxide and a broad scope of organic hydroperoxides using GSH as electron donor. However, it does not reduce the hydroperoxy groups of complex lipids, a reaction mediated by a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) [16]. In contrast to TrxR, the catalytic cycle of Seleno-GPx enzymes involves the oxidation of the selenol to selenenic acid that is subsequently reduced back to selenol in two steps by the consumption of an equivalent of two molecules of GSH. Consequently, the formation of -S-Se- bond involves first the interaction of the oxidized selenium atom from the selenenic acid in the catalytic centre of the enzyme with the low molecular weight GSH.

From a mechanistic point of view, the interaction of a thiol with a diselenide can form the corresponding disulfide and selenol intermediates [5,18]. The selenol/selenolate can subsequently be oxidized to the selenenic acid by hydrogen peroxide [10,18], which can be a low-molecular weight analog of the selenocysteinyl residue from the active centre of GPx. In the presence of excess of thiol, the selenenic acid can be reduced back to

selenol that hypothetically could maintain a mimetic catalytic cycle of GPx (glutathione peroxidase- or thiol-peroxidase like activity, depending on the reducing thiol considered) [5,8]. Alternatively, in the absence of an excess of a low molecular weight reducing thiol, TrxR can reduce ebselen and/or ebselen diselenide using reducing equivalents from NADPH [10,11].

Figure 1. Structures of diselenide compounds.



Diphenyl diselenide and analogs share several antioxidant and neuroprotective properties with ebselen [5,19-26] and they are also mimetics of native GPx enzyme [5,8]. However, there is a dearth of information in the literature indicating that simple diorganyl diselenides such as diphenyl diselenide and its analogs can be substrates for TrxR. Hence, taking into account that the TrxR can be the major pathway for the observed reduction of ebselen or its diselenide form *in vivo*, and also that simple aryl diselenide compounds are analogs of ebselen diselenide, we tested the hypothesis that these compounds (Figure 1) could also be substrates for TrxR.

2. Results

2.1. Thiol Oxidase Activity of Selenium Compounds

Table 1 shows the thiol oxidase activity of selenium compounds. Apparently, diphenyl diselenide exhibited a more profound thiol oxidase activity when compared to

other organoselenium tested. In fact, diphenyl diselenide caused an almost complete oxidation of DTT after 60 min of reaction. The ability of the seven organoselenium tested to oxidize thiol is in the order: diphenyl diselenide > bischlorodiphenyl diselenide > bisfluoromethyldiselenide > hexamethyldiphenyl diselenide \approx ebselen > bismethoxydiphenyl diselenide > biscarboxydiphenyl diselenide ($p < 0.01$, one-way ANOVA followed by Duncan's test). It is noteworthy that DTT oxidation determined in the presence of hexamethyl-diphenyl diselenide or ebselen was not different from that determined in the absence of chalcogens (control). In addition, bismethoxydiphenyl diselenide and biscarboxydiphenyl diselenide did not exhibit significant thiol oxidase activity. Indeed, they decreased DTT oxidation.

Table 1. Effects of different selenium compounds on DTT oxidation.

	0 min (nmol -SH/mL)	60 min (nmol - SH/mL)	(%) -SH oxidation)
Control	43.48 \pm 0.24	30.62 \pm 0.25 ^a	29.57
I—Diphenyl diselenide		5.82 \pm 0.27 ^e	86.61
II—Bistrifluoromethyl-		23.37 \pm 0.36 ^c	46.25
III—Bismethoxy-		36.46 \pm 0.83 ^f	16.14
IV—Biscarboxy-		47.19 \pm 0.32 ^h	0.0
V—Bischloro-		17.88 \pm 0.26 ^d	58.87
VI—Hexamethyl-		28.00 \pm 0.40 ^b	35.60
VII—Ebselen		29.51 \pm 0.27 ^{a,b}	32.12

Values represent mean \pm s.e. from three independent experiments performed in duplicate. Selenium compounds were tested at 0.1 mM [(i) diphenyl diselenide, (ii) bistrifluoromethyl-diphenyl diselenide, (iii) bismethoxydiphenyl diselenide, (iv) biscarboxydiphenyl diselenide, (v) bischlorodiphenyl diselenide, (vi) hexamethyldiphenyl diselenide and (vii) ebselen]. Reaction was started by adding DTT (to a final concentration of 0.5 mM) and then, aliquots (100 μ L) were sampled immediately or 60 min after mixing DTT with compounds. Statistical analysis was performed by One-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Means that do not share the same superscript letter are different ($p < 0.05$).

2.2. Ebselen and Diphenyl Diselenide Compounds Are Substrates for Hepatic Mammalian Thioredoxin Reductase (TrxR)

Figures 2 and 3 show the effect of organoselenium compounds on the oxidation of NADPH in the presence of partially purified hepatic mammalian TrxR. Diphenyl diselenide, bisfluoromethyldiphenyl diselenide, bismethoxydiphenyl diselenide and bischlorodiphenyl diselenide (at concentrations of 10, 15 and 20 μ M) and ebselen (at concentrations varying from 5 to 15 μ M) stimulated NADPH oxidation in the presence of partially purified hepatic mammalian Trx Reductase (TrxR), indicating that they are substrates for hepatic mammalian TrxR. In fact, diphenyl diselenide was a better

substrate than its analogs particularly when tested at 20 μM (Figure 2, three-way ANOVA, see Figure legend for details) and ebselen (Figure 3, separate analysis performed only for diphenyl diselenide and ebselen using 5-15 μM by two-way ANOVA, data not shown). Oxidation of NADPH observed in the presence of these selenium compounds were almost completely blocked by 1 μM AuCl_3 (more than 90%), Furthermore, we confirmed the formation of reduced intermediates of diselenides that were substrate for TrxR by reacting aliquots of the enzymatic reaction of NADPH oxidation with DTNB (here we have included 5 μM of AuCl_3 to inhibit any further reduction of DTNB by NADPH catalyzed by TrxR during color development (data not shown).

Figure 2. Reduction of diselenide compounds I (A), II (B), III (C), IV (D), V (E) e VI (F) by NADPH catalyzed by mammalian Thioredoxin Reductase (TrxR). Enzyme was mixed with a medium containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 and then reaction was started by adding NADPH (final concentration 100 μM). 0 (\square), 10(O), 15(Δ), 20(∇) μM diselenide compounds. Statistical analysis were performed by three-way ANOVA (six diselenides \times four concentrations \times 11 sampling points). Data analysis yielded a significant diselenide \times concentration \times time interaction $F(150, 1,440) = 42.5$; $p < 0.000001$, which indicates that the consumption of NADPH was dependent on the concentration, on the type of compound and on the sampling time.

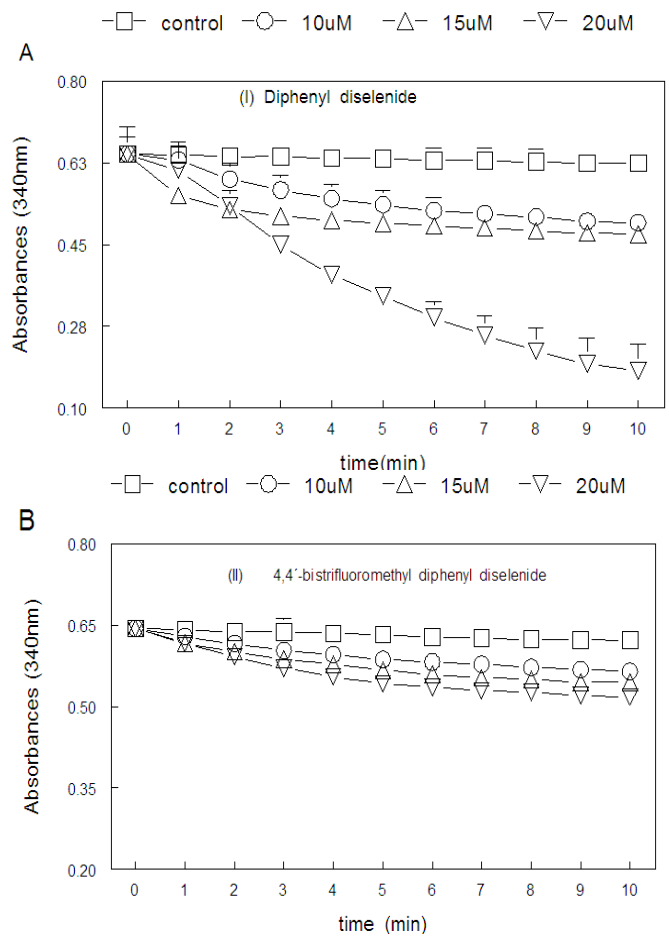


Figure 2. Cont.

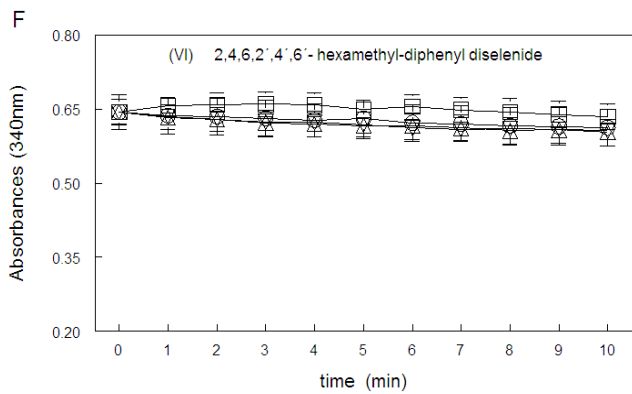
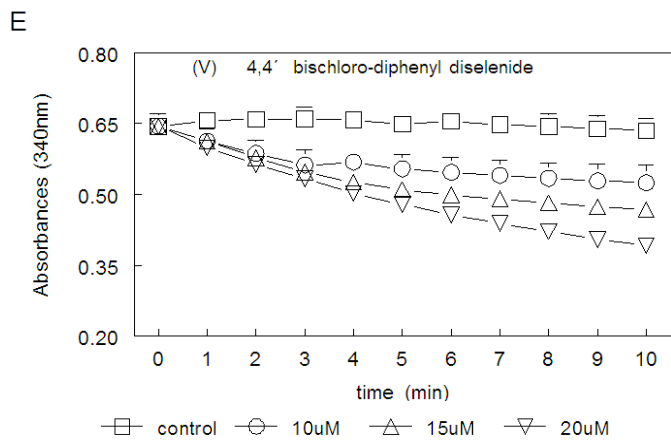
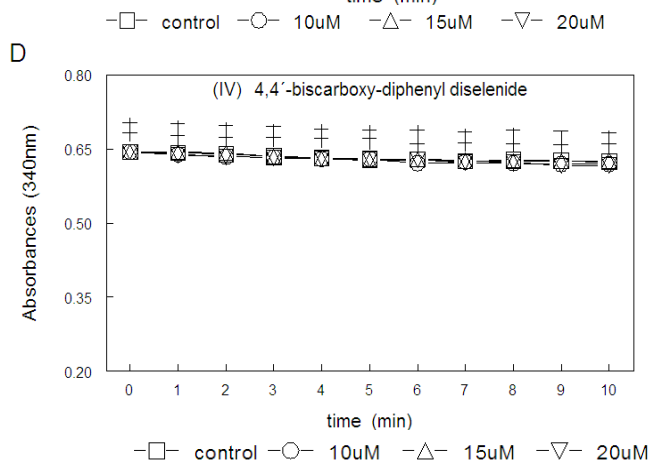
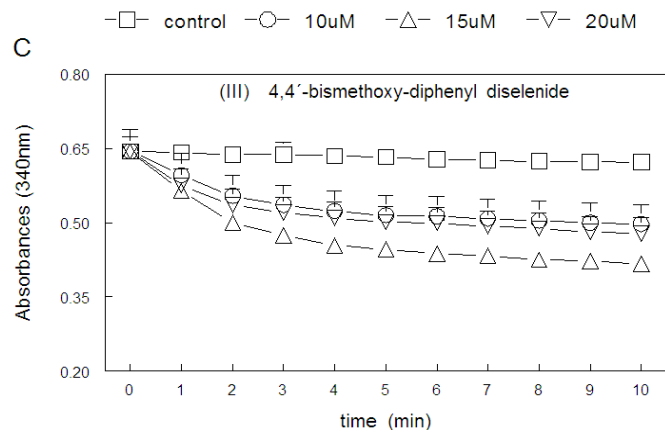
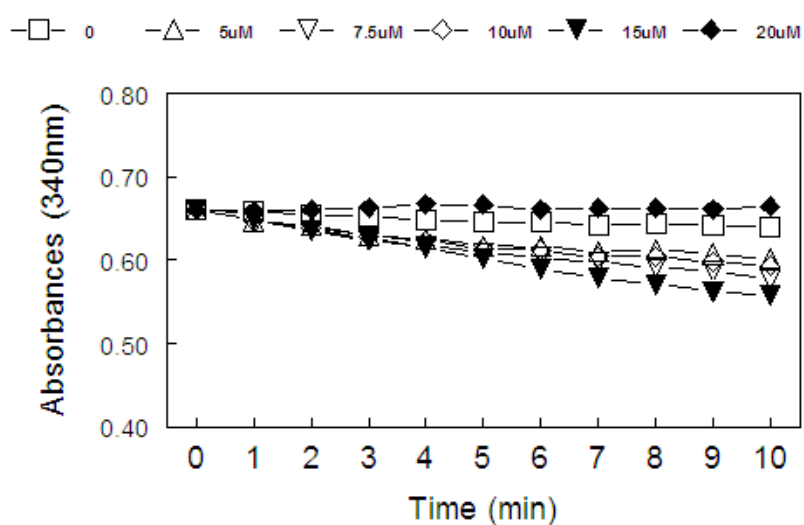


Figure 3. Reduction of ebselen (0, 5, 7.5, 10, 15 or 20 μM) by NADPH catalyzed by mammalian TrxR. Enzyme was mixed with a medium containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 and, then reaction was started by adding NADPH (final concentration 100 μM). Statistical analysis were performed by two-way ANOVA (six concentrations \times 11 time points). Data analysis yielded a significant concentration \times time interaction [F(50, 360) = 24.6; $p < 0.000001$], which indicates that the consumption of NADPH determined in the presence of ebselen depended both on its concentration and on time of sampling.



2.3. Thiol Peroxidase-Like Activity of Diphenyl Diselenide and its Analogs

The results obtained from the analysis of the thiol peroxidase-like activity of 200 μM of diphenyl diselenide and its analogs and ebselen (50 μM) are presented in Figures 4 and 5, respectively. In Figure 4, we observe that bischlorodiphenyl diselenide and bistrifluoromethyldiphenyl diselenide decomposed hydrogen peroxide with a similar efficiency, when compared to diphenyl diselenide. In contrast, bismethoxydiphenyl diselenide, bismethoxydiphenyl diselenide, bismethoxydiphenyl diselenide and hexamethyldiphenyl diselenide had no thiol-peroxidase-like activity. In Figure 5, the thiol peroxidase-like activity of ebselen could not be measured at 200 μM , because the readings at 305 nm were higher than the limit of the spectrophotometer.

Figure 4. GPx like behavior of diselenide compounds: **(I)** diphenyl diselenide, **(II)** bistrifluoromethyldiphenyl diselenide, **(III)** bismethoxydiphenyl diselenide, **(IV)** biscarboxydiphenyl diselenide, **(V)** bischlorodiphenyl diselenide and **(VI)** hexamethyl-diphenyl diselenide. Two hundred μM of diselenide compounds was added. Statistical analysis were performed by two-way ANOVA (seven compounds \times 13 sampling times). Data analysis yielded a significant compound type \times time of sampling interaction [$F(72, 504) = 57.9$ $p < 0.01$], which indicates that PhSSPh production varied as a function of sampling time and the diselenide considered.

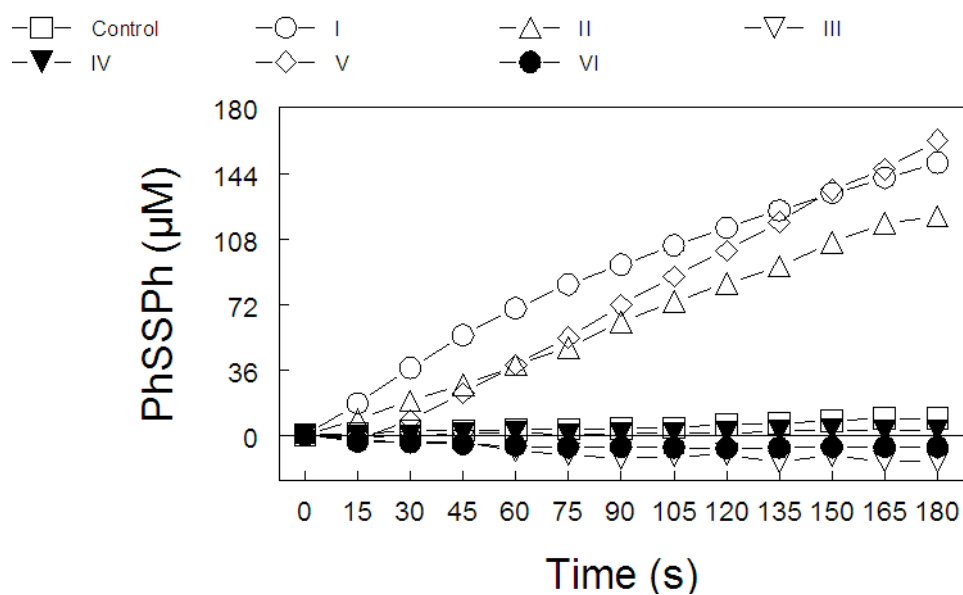
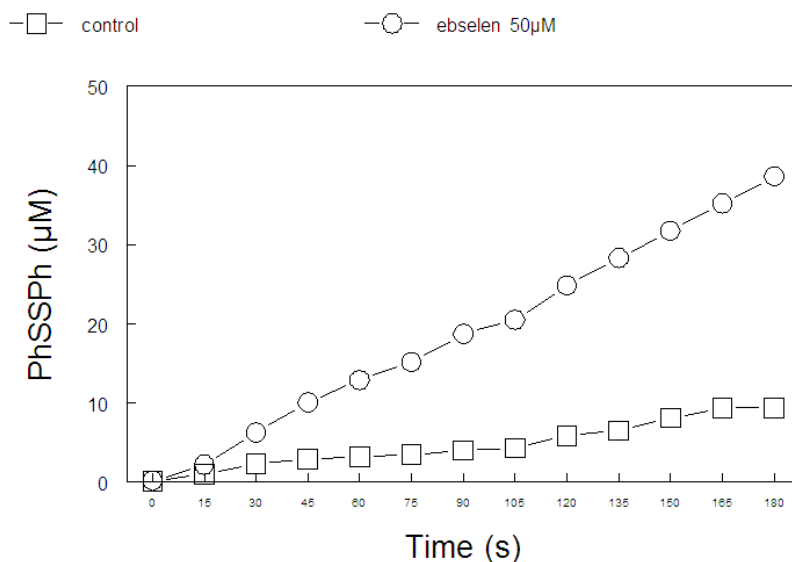


Figure 5. GPx like behavior of ebselen . Fifty μM of ebselen was tested. Statistical analysis were performed by two-way ANOVA (two concentrations \times 13 times of sampling). Data analysis yielded a significant concentration \times sampling time interaction [$F(12,144) = 228,4$; $p < 0.000001$], which indicates that ebselen caused an increase in PhSSPh formation that was time dependent.



2.4. Correlation between Thiol Oxidase, Thiol Peroxidase-Like and Effectiveness of Diphenyl Diselenide, its Analogs and Ebselen to be Substrate for TrxR

Figure 6 show the correlation analysis (Spearman rank test) between the thiol oxidase activity, thiol peroxidase-like activity, and the effectiveness of diselenides and ebselen to be substrates for hepatic mammalian TrxR. Figure 6a shows a significant correlation between thiol oxidase and the effectiveness of diselenides and ebselen to act as substrates of TrxR ($r = 0.85$; $p = 0.013$). In addition, Figure 6b shows a tendency for a significant correlation between thiol oxidase activity with thiol-peroxidase-like activity ($r = 0.71$, $p = 0.07$). However, as shown in Figure 6c, statistical analysis revealed no significant correlation between thiol-peroxidase like activity and the effectiveness of diselenides and ebselen to act as substrates for TrxR ($r = 0.67$, $p = 0.094$). From a qualitative point of view, it can easily be observed that bismethoxydiphenyl diselenide had a high activity as substrate for mammalian TrxR (Figure 2C), whereas it has no activity as a mimetic of GPx (Figure 4). Similarly, bistrifluoromethyldiphenyl diselenide had a weak activity as substrate for TrxR (Figure 2B), whereas it has a high thiol-peroxidase-like activity (Figure 4). The relative activities of all three determinations in relation to control groups are presented in Table 2.

Figure 6. Correlation analysis (by Spermank test) between the thiol oxidase activity with the effectiveness of diselenides and ebselen as substrate of hepatic mammalian TrxR (A) or with thiol peroxidase-like activity (B) or and between thiol-peroxidase like activity and the effectiveness of diselenides and ebselen as substrates for TrxR (C).

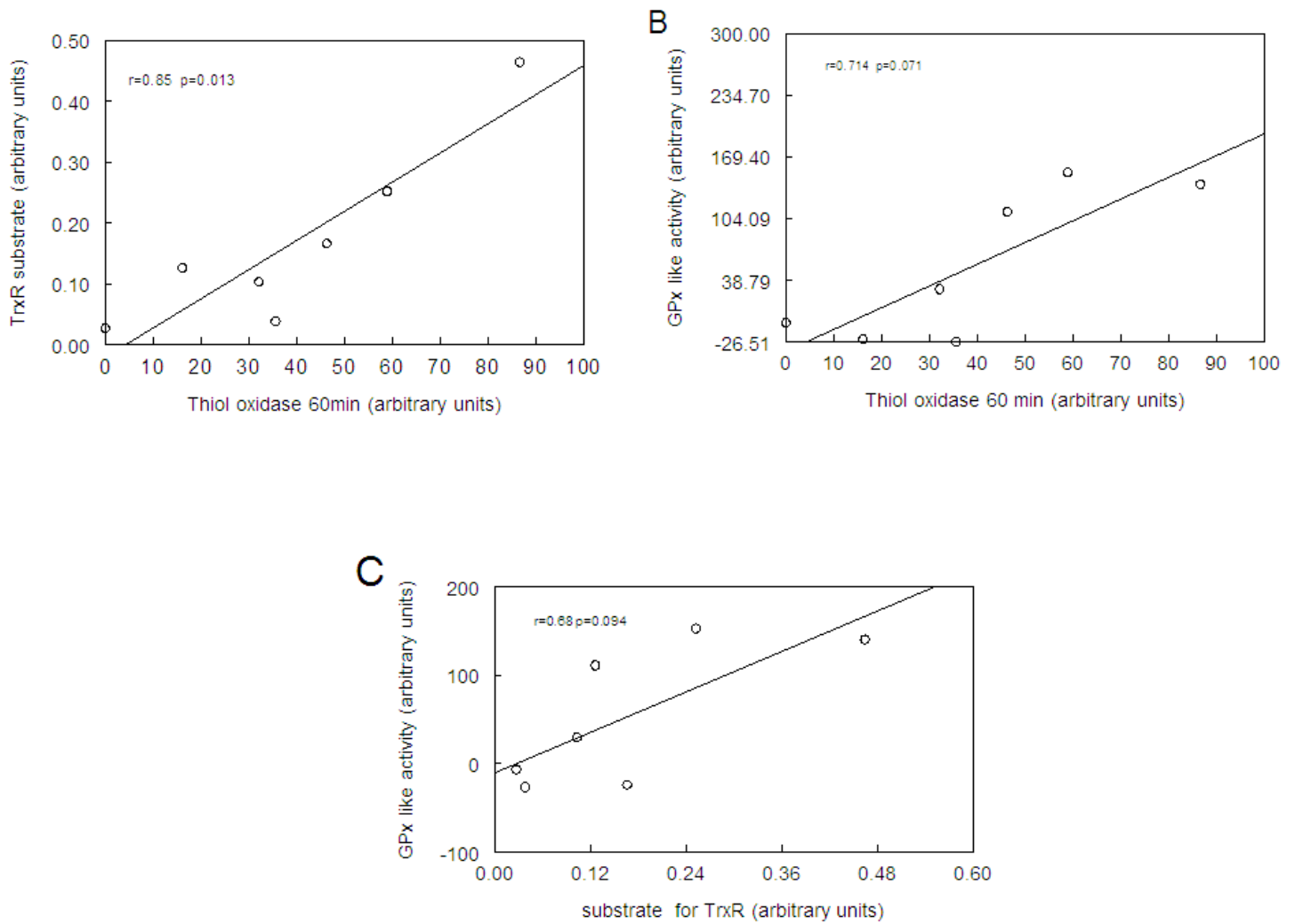


Table 2. Comparisons of the relative activities (GPx, TrxR and Thiol oxidase) of organoseleno compounds.

Sample	GPx	TrxR	Thiol oxidase
Control	1.00	1.00	1.00
I—Diphenyl diselenide	15.95	8.6	2.93
II—Bistrifluoromethyl-	12.84	4.95	1.56
III—Bismethoxy-	0.00	11.35	0.55
IV—Biscarboxy-	0.31	0.90	0.0
V—Bischloro-	17.29	8.8	1.99
VI—Hexamethyl-	0.00	2.05	1.20
VII—Ebselen	4.12	5.15	1.09

Relative activities were calculated in relation to the control (arbitrary value of 1.00), *i.e.*, activity determined in the absence of selenium compounds. For GPx the concentration of the diselenide compounds was 200 μM and for ebselen it was 50 μM . For TrxR assay, calculations were made using the concentration of 15 μM for all the tested selenium compounds.

3. Discussion

Organoseleno compounds, particularly, 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one or ebselen were used in clinical trials about 10 years ago for the treatment of neuropathological conditions associated with oxidative stress [1-3]. Based on literature data, these authors attributed the neuroprotective effects of ebselen to its anti-inflammatory properties and its thiol peroxidase-like activity (for reviews about the antioxidant properties of ebselen see [4,5]). In fact, the concept that ebselen (and other organocalchogens) could be used for the treatment of human diseases associated with oxidative stress was linked essentially to their GPx-like activity. Based on this assumption, we have investigated the pharmacological and antioxidant properties of diphenyl diselenide, the simplest of the diaryl diselenide compounds, in different *in vitro* and *in vivo* models of oxidative stress. In fact, literature demonstrates a higher GPx-like activity for diphenyl diselenide (about two times), than ebselen [8,27]. Furthermore, diphenyl diselenide and analogs also have higher anti-inflammatory activity than ebselen [28]. Although the GPx-like activity of organoseleno compounds could account for their pharmacological properties, there is no study showing a clear correlation between the thiol-peroxidase like activity and *in vivo* protective effects in rodents. Some of diselenides used here (diphenyl diselenide, p-Cl-, F₃C-) have antioxidant activity (determined by TBARS) in the μM range, when brain was used as the source of lipids. However, the compound with highest GPx-like activity (p-Cl-) was the one with a weak

antioxidant activity. These results indicate that the antioxidant activity (as determined by the production of TBARS) is also not directly related to GPx-like activity.

More recently, the Holmgren group have elegantly demonstrated that ebselen and its diselenide were good substrates for human thioredoxin reductase [10,11]. Furthermore, they have also clearly demonstrated that the antioxidant activity of ebselen and its diselenide is related to their reductions by mammalian thioredoxin reductase (TrxR) and thioredoxin (Trx) producing ebselen selenol and that the TrxR pathway could more efficiently decompose hydrogen peroxide than the GPx-like pathway [10]. Consequently, the potential participation of simple diaryl diselenides as substrates for TrxR could explain their antioxidant and pharmacological properties.

In the present study, we observed that the thiol oxidase-like ability (ability to oxidize thiols in the absence of peroxide), GPx-like activity (oxidation of thiols determined in the presence of peroxide) and the ability of these compounds to be reduced by TrxR varied greatly depending on the substitution in the aromatic moiety. Diphenyl diselenide, bisfluoromethyl diselenide and bischlorodiphenyl diselenide exhibited all these three activities. In contrast, bismethoxydiphenyl diselenide has a high activity as a substrate for mammalian TrxR, whereas it has no GPx mimetic activity. In the case of bistrifluoromethyldiphenyl diselenide, on the other hand, we have to emphasize that it exhibited a weak activity as a substrate for TrxR (Figure 2B), whereas it has a high thiol-peroxidase-like activity. Biscarboxydiphenyl diselenide and hexamethyldiphenyl diselenide did not exhibit any of these activities in appreciable amounts. Although the thiol oxidase activities of a diselenide can indicate a potential pro-oxidant property and, consequently, can give some indication about its potential toxicity [5,29], its interaction with thiols is critical for forming the selenol/selenolate for degradation of peroxides. In the present study, it is obvious that diselenides that exhibit appreciable thiol peroxidase like activity and/or that were good substrates for TrxR displayed thiol oxidase activity, except bismethoxydiphenyl diselenide. In fact, there is a positive correlation between thiol oxidase activity and the capacity of these compounds to be reduced by TrxR. In addition, the statistical analysis of the GPx of the organoselenium compounds showed a tendency towards a positive correlation between thiol oxidase and GPx-like activity. However, there is no significant correlation between thiol peroxidase-like activity and the capacity of diselenides to be reduced by TrxR indicating that for some compounds there is no relationship between their thiol peroxidase like activity and their ability to be a suitable substrate for TrxR. For instance, as indicated in Table 2, bismethoxydiphenyl diselenide was a good substrate for mammalian TrxR but has neither thiol peroxidase-like activity nor thiol oxidase activity. In fact, it exhibits thiol oxidase activity lower than the control. The apparent paradoxical effects of biscarboxy- and bismethoxydiphenyl diselenide on DTT oxidation are not easily explainable. Particularly if one consider that the carboxy group is an electron withdrawing group (which is expected to stabilize the selenol and, consequently, to diminish its catalytic properties as thiol oxidizing agent); and the methoxy- group is an

electron donating group and should increase the reactivity of the selenol/selenolate formed. For the case of the biscalboxy-substituent, the stability of the selenol/selenolate might permit it to reduce back the oxidized DTT to DTT before being oxidized by molecular oxygen (see [5] for details about the catalytic oxidation of thiols by diphenyl diselenide), which could explain its “protective” effect on thiol oxidation. However, this explanation cannot be applied to bismethoxydiphenyl diselenide. One factor that could contribute to these differences is the presence of a relatively bulky group with oxygen in both R groups. Thus, the presence oxygen in these groups and steric hindrance could difficult the interaction of these two compounds with DTT.

The diselenides used here are structurally similar, thus it is difficult to explain why they exhibit differential activities as either thiol oxidase or thiol peroxidase mimic and/or their capacity to be reduced by TrxR. Previously, we have observed that a bulky organic moiety markedly decreased the antioxidant and thiol-peroxidase-like activity of a diselenide analog of cholesterol [30]. Here, the organic moiety substitutions in the diselenides examined in the present study were relatively smaller molecules when compared to cholesterol, but the present data showed a marked decline in their reactivity as thiol oxidase, thiol peroxidase mimic and their ability to act as substrates for TrxR. For instance, biscalboxydiphenyl diselenide and hexamethyldiselenide were almost inactive either as GPx mimic or as substrates for TrxR. Furthermore, we also observe that the GPx mimetic ability of the diselenides could be altered due to electronic effects. For example, electron donating groups (in the case of hexamethyl and bismethoxydiphenyl deselenide) caused a complete loss of thiol peroxidase activity. On the other hand, introduction of electron withdrawing groups (chloro- or trifluoromethyl-) was generally associated with non-significant changes in thiol peroxidase-like activity (the exception was the introduction of a carboxyl group that caused a complete inactivation of all the activities). It is apparent however, that electronic effect may not be a critical factor that could determine the capacity of the diselenides to be reduced by TrxR. In fact, the introduction of an electron donating group could either be associated with a high (bismethoxydiselenide) or low (hexamethyl-) capacity to be reduced by TrxR. In contrast to GPx-like activity, introduction of electron withdrawing groups (chloro or trifluoromethyl) were associated with high and moderate capacity to be substrate for TrxR (Table 2). Consequently, we can suppose that the ability of the diselenides to be substrates for TrxR may be related to steric effect which could be a more important factor than factors that could interfere with the selenol/selenolate stability such as electronic effect.

The results presented here indicate that diphenyl diselenide and some of its analogs were good substrates for mammalian TrxR, which indicate that theirs *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties could also be associated with their interaction with the thioredoxin-thioredoxin reductase system. These results expand those of Holmgren and collaborators and demonstrated that simple diselenides could also be substrates for TrxR. One aspect that deserves further investigation is whether the thiol oxidase, thiol

peroxidase and the capacity to be reduced by TrxR could be used to predict the potential toxicity and/or pharmacology of these molecules. In fact, considering the thiol oxidase activity of diselenides and, from a linear point of view, one should expect a higher toxicity for diphenyl diselenide than their analogs. However, among the diselenides tested in the present study, diphenyl diselenide had a good thiol peroxidase-like activity and a moderate capacity to be reduced by TrxR.

4. Experimental

4.1. Materials and Enzyme

All chemicals were of analytical grade and were obtained from either Sigma Aldrich or Fluka. TrxR from rat liver was purified essentially as described by Hill *et al.* [31].

4.2. Thioredoxin Reductase Assay

TrxR activity was determined according to Zhao and Holmgren [10]. Activity was performed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5, 100 μ L of TrxR (10 μ g protein/mL of reaction medium) and 100 μ M of NADPH. The volume of enzyme was chosen based on previous experiments (data not shown), in which trials were conducted with concentrations of 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15.0 and 20 μ g of the partially purified protein/mL of reaction medium and we have observed a linear reaction from 5.0 to 12.5 μ g/mL when diphenyl diselenide and 4,4'-bischlorodiphenyl diselenide were used as substrate (data not shown). Enzyme reaction was started with the addition of different amount of organoselenium compounds.

4.3. Determination of GPx like Activity

Catalytic GPx model reaction ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{PhSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{PhSSPh}$) [32] was initiated by the addition of H_2O_2 (10.4 mM) to a solution of PhSH (5 mM) in presence of diselenide compounds (**I-VII**), separately, and was monitored by UV spectroscopy at 305 nm (3 min), at least more than three times under the same conditions.

4.4. Thiol Oxidase Activity

Thiol oxidase activity was determined according to the Ellman method [33]. Diselenide compounds (100 μ M) were dissolved in DMSO and they were incubated (37 $^\circ\text{C}$) separately in a medium reaction containing 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) and the sulphhydryl compound dithiothreitol (DTT, 0.5 mM) in a final volume of 1,800 μ L. An aliquot (100 μ L) from each sample was removed at different times during the reaction (0, 30, 60 and 120 mins) and mixed in a system containing 25 μ L of 5,5' dithiobis -2-nitrobenzoic acid (DTNB) 10 mM and 100 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) in a final volume of 1800 μ L. Samples were read at 412 nm. DTT was used as the standard.

4.5. Statistical Analysis

Statistical analysis were performed using one-way (thiol oxidation), two-way (thiol peroxidase activity) and three-way (TrxR determinations) ANOVA. Univariate analysis followed by Duncan's multiple range test were performed where appropriate. Correlation between thiol oxidase activity, thiol peroxidase-like activity and effectiveness of diphenyl diselenides and ebselen to be substrate for TrxR were analyzed using Spearman rank test. Correlation R values were calculated using the maximal percentage of thiol oxidation in relation to time zero of sampling (*i.e.*, %-SH oxidation of Table 1) for thiol oxidase activity. For TrxR, we have used the activity obtained with 20 μM of diphenyl diselenides in 10 min of reaction. For ebselen, we have used 15 μM because at 20 μM there was a marked inhibition of TrxR. For GPx, we have used the activity obtained with 200 μM of diphenyl diselenides. For ebselen we have used the activity obtained with 50 μM , because it was not possible to determine the activity in the presence of 100 μM of ebselen.

5. Conclusions

Thus, the therapeutic potential or toxicity of diselenides may depend on a delicate balance among these three activities (substrate for TrxR; GPx like activity and thiol oxidase activity). However, we must emphasize that some of the pharmacological properties found for these compounds are not only based on their antioxidant characteristics, but also in the interesting ability of these molecules to modulate some pathways and neurotransmitter systems. For instance, 4,4'-bismethoxydiphenyl diselenide has very interesting antinociceptive [34] and neuroprotective actions [35] that are more related to its ability to modulate receptors than for being an antioxidant. In short, we have demonstrated here for the first time that diphenyl diselenide and its analogs can be substrate for mammalian TrxR, which can explain, at least in part, their *in vivo* antioxidant properties. Furthermore, we also demonstrated for the first time that it is possible to dissociate the two pathways for peroxides degradation (*i.e.*, either via substrate for TrxR or via the mimic of the endogenous antioxidant enzyme, GPx) for structurally related diaryl diselenides.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CAPES, FINEP, FAPERGS, PRONEX and CNPq. The authors are also thankful to the FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)" # 01.06.0842-00 and the INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection-CNPq.

References

1. Yamaguchi, T.; Sano, K.; Takakura, K.; Saito, I.; Shinohara, Y.; Asano, T.; Yasuhara, H. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial, Ebselen Study Group. *Stroke* **1998**, *29*, 12-17.
2. Saito, I.; Asano, T.; Sano, K.; Takakura, K.; Abe, H.; Yoshimoto, T.; Kikuchi, H.; Ishibashi, S. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **1998**, *42*, 269-277.
3. Ogawa, A.; Yoshimoto, T.; Kikuchi, H.; Sano, K.; Saito, I.; Yamaguchi, T.; Yasuhara, H. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: A placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cereb. Dis.* **1999**, *9*, 112-118.
4. Mugesch, G.; Dumont, W.W.; Sies, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2125-2179.
5. Nogueira, C.W.; Zeni, G.; Rocha, J.B. Organoselenium and organotellurium compounds: pharmacology and toxicology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6255-6286.
6. Engman, L.; Cotgreave, I.; Angulo, M.; Taylor, C.W.; Paine-Murrieta, G.D.; Powis, G. Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 4599-4605.
7. Avila, D.S.; Gubert, P.; Palma, A.; Colle, D.; Alves, D.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T.; Soares, F.A.A. An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Res. Bull.* **2008**, *76*, 114-123.
8. Wilson, S.R.; Zucker, P.A.; Huang, R.R.C.; Spector, A. Development of synthetic compounds with glutathione-peroxidase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5936-5939.
9. Farina, M.; Dahm, K.C.; Schwalm, F.D.; Brusque, A.M.; Frizzo, M.E.; Zeni, G.; Souza, D.O.; Rocha, J.B. Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. *Toxicol. Sci.* **2003**, *73*, 135-140.
10. Zhao, R.; Holmgren, A. A novel antioxidant mechanism of Ebselen Involving Ebselen diselenide, a substrate of mammalian Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39456-39462.
11. Zhao, R.; Masayasu, H.; Holmgren, A. Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 8579-8584.
12. Watson, W.H.; Yang, X.; Choi, Y.E.; Jones, D.P.; Kehrer, J.P. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol. Sci.* **2004**, *78*, 3-14.
13. Lu, J.; Berndt, C.; Holmgren, A. Metabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 1513-1519.
14. Lu, J.; Holmgren, A. Selenoproteins. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 723-727.

15. Arnér, E.S.J. Focus on mammalian thioredoxin reductases - Important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 495-526.
16. Toppo, S.; Flohé, L.; Ursini, F.; Vanin, S.; Maiorino, M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 1486-1500.
17. Sies, H.; Arteel, G.E. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1451-1455.
18. Farina, M.; Barbosa, N.B.; Nogueira, C.W.; Folmer, V.; Zeni, G.; Andrade, L.H.; Braga, A.L.; Rocha, J.B. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinatase from rat liver and cucumber leaves. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2002**, *35*, 623-631.
19. Ghisleni, G.; Porciuncula, L.O.; Cimarostia, H.; Rocha, J.B.T.; Salbego, C.G.; Souza, D.O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocent. *Brain Res.* **2003**, *986*, 196-199.
20. De Bem, A.F.; Farina, M.; Portella, R.L.; Nogueira, C.W.; Dinis, T.C.P.; Laranjinha, J.A.N.; Almeida, L.M.; Rocha, J.B.T. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis* **2008**, *201*, 92-100.
21. Rosa, R.M.; Roesler, R.; Braga, A.L.; Saffi, J.; Henriques, J.A. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40*, 1287-1304.
22. Moretto, M.B.; Boff, B.; Franco, J.; Posser, T.; Roessler, T.M.; Souza, D.O.; Nogueira, C.W.; Wofchuk, S.; Rocha, J.B. Ca⁽²⁺⁾ influx in rat brain: effect of diorganylchalcogenides compounds. *Toxicol. Sci.* **2007**, *99*, 566-571.
23. Hassan, W.; Ibrahim, M.; Deobald, A.M.; Braga, A.L.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T. pH-Dependent Fe (II) pathophysiology and protective effect of an organoselenium compound. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1011-1016.
24. Hassan, W.; Ibrahim, M.; Nogueira, C.W.; Braga, A.L.; Mohammadzai, I.U.; Taube, P.S.; Rocha, J.B.T. Enhancement of iron-catalyzed lipid peroxidation by acidosis in brain homogenate: Comparative effect of diphenyl diselenide and ebselen. *Brain Res.* **2009**, *1258*, 71-77.
25. Kade, I.J.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T. Diphenyl diselenide and streptozotocin did not alter cerebral glutamatergic and cholinergic systems but modulate antioxidant status and sodium pump in diabetic rats. *Brain Res.* **2009**, *11*, 202-211.
26. Ardais, A.P.; Viola, G.G.; Costa, M.S.; Nunes, F.; Behr, G.A.; Klamt, F.; Moreira, J.C.; Souza, D.O.; Rocha, J.B.; Porciúncula, L.O. Acute treatment with diphenyl diselenide inhibits glutamate uptake into rat hippocampal slices and modifies

- glutamate transporters, SNAP-25 and GFAP immunocontent. *Toxicol. Sci.* **2010**, in press.
27. Meotti, F.C.; Stangherlin, E.C.; Zeni, G.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.* **2004**, *94*, 276-282.
 28. Nogueira, C.W.; Quinhones, E.B.; Jung, E.A.; Zeni, G.; Rocha, J.B. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* **2003**, *52*, 56-63.
 29. Barbosa, N.B.; Rocha, J.B.; Zeni, G.; Emanuelli, T.; Beque, M.C.; Braga, A.L. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, *149*, 243-253.
 30. Kade, I.J.; Paixão, M.W.; Rodrigues, O.E.; Barbosa, N.B.; Braga, A.L.; Avila, D.S.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B. Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 167-178.
 31. Hill, K.E.; McCollum, G.W.; Boeglin, M.E.; Burk, R.F. Thioredoxin Reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *234*, 293-295.
 32. Iwaoka, M.; Tomoda, T. A model study on the effect of an amino group on the antioxidant activity of Glutathione Peroxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2557-2560.
 33. Ellman, G.L. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70-77.
 34. Jesse, C.R.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Savegnago, L. Further analysis of the antinociceptive action caused by p-methoxyl diphenyl diselenide mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2009**, *91*, 573-580.
 35. Pinton, S.; Rocha, J.T.; Zeni, G.; Nogueira, C.W. Organoselenium improves memory decline in mice: Involvement of acetylcholinesterase activity. *Neurosci. Lett.* **2010**, *472*, 56-60.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2010 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

4.2 Manuscrito 1

Disseleneto de difenila e análogos são substratos para a tioredoxina redutase de cérebro de ratos: Uma via para seus efeitos neuroprotetores

Diphenyl Diselenide and Analogs are Substrates for Cerebral Rat Thioredoxin Reductase: A Pathway for their Neuroprotective Effects

Andressa Sausen de Freitas and João Batista Teixeira Rocha

Submetido à Neuroscience Letters

**Diphenyl Diselenide and Analogs Are Substrates of Cerebral Rat
Thioredoxin Reductase: A Pathway for their Neuroprotective Effects**

Andressa Sausen de Freitas¹, João Batista Teixeira Rocha¹

¹Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

*Correspondence should be sent to:

Dr. João Batista Teixeira da Rocha

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

Phone: 55-55-3220-8140

FAX: 55-55-3220-8978

E-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

Abstract

Thioredoxin reductase (TrxR) isoforms play important roles in cell physiology, protecting cells against oxidative processes. In addition to its endogenous substrates (Trx isoforms), hepatic TrxR can reduce organic selenium compounds such as ebselen and diphenyl diselenide to their selenol intermediates, which can be involved in their hepatoprotective properties. Taking this into account, the aim of the present study was to evaluate the hypothesis that ebselen, diphenyl diselenide and its analogs (4,4'-bistrifluoromethyldiphenyl diselenide, 4,4'-bismethoxydiphenyl diselenide, 4,4'-biscarboxydiphenyl diselenide, 4,4'-bischlorodiphenyl diselenide, 2,4,6,2',4',6'-hexamethyldiphenyl diselenide) could be substrates of rat brain TrxR. In the presence of partially purified rat brain TrxR, diphenyl diselenide, bismethoxydiphenyl diselenide and bischlorodiphenyl diselenide (at 10, 15 and 20 μ M) stimulated NADPH oxidation, indicating that they are substrates of brain TrxR. In contrast, ebselen and bistrifluoromethyldiphenyl diselenide, that have been previously demonstrated to be substrate of hepatic TrxR, were not reduced by rat brain TrxR. The results presented here suggest that diphenyl diselenide can exert neuroprotective effects by mimicking glutathione peroxidase activity and also via its reduction by TrxR. However, ebselen was not reduced by brain TrxR, indicating that the neuroprotective properties of this compound is possibly mediate by its glutathione peroxidase- like activity.

Keywords: Thioredoxin reductase (TrxR); selenium compounds; Ebselen; Diphenyl diselenide

1.Introduction

Oxidation is a fundamental part of life and aerobic metabolism. However, excessive free radicals production, as well as low antioxidant defenses can be harmful to living cell. In effect, reactive oxygen and nitrogen species can oxidize macromolecules (protein, DNA, lipids and carbohydrates), which can lead to cell dysfunction. Therefore, oxidative stress can be involved in the development of chronic degenerative diseases, including neurological diseases [4, 10, 12, 15, 24]. Of particular pharmacological significance, experimental studies have indicated that antioxidants may reduce oxidative damage associated with different pathological conditions [2, 3, 7, 20].

Selenium (Se) is an integral component of about 25 selenoproteins, including critical antioxidant seleno-enzymes; namely, the isoforms of glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TrxR) [1, 13, 19, 21, 23]. Selenium is normally found as a selenocysteine residue and its selenol group is a softer and stronger nucleophile than its sulfur (cysteine) analog. Consequently, the selenol group is expected to attack toxic electrophile species more efficiently than thiol analogs [8, 9, 19]. Maintenance of full GPx and TrxR activity by adequate dietary selenium supply has been proposed to be useful for the prevention of several cardiovascular and neurological disorders [23].

Of particular therapeutic significance, organoselenium compounds can mimicry endogenous antioxidant enzymes, such as GPx or can be metabolized by TrxR to form selenol intermediates [6, 16, 25, 26] that can imitate the function of the antioxidant selenoenzymes [14, 18, 19]. For instance, ebselen and diphenyl diselenide have antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties [16-20, 22] that can be mediated, at least in part, by their *in vivo* metabolism to selenol intermediates [18, 19].

Recently we have demonstrated that diphenyl diselenide and some analogs are substrates of rat liver mammalian TrxR [6], which is in accordance with previous studies from the laboratory of Holmgren [25, 26], which has demonstrated that ebselen and its diselenide were good substrates of *E. coli*, human placenta and calf thymus TrxR. Of potential pharmacological significance, the reduction of these substrates by mammalian TrxR isoforms can generate selenol intermediates that could imitate the role of some antioxidant selenoenzymes, such as GPx and TrxR [6]. In effect, Holmgren and

collaborators have indicated that the TrxR-like (i.e., the ability of TrxR to form the selenol intermediate of ebselen) is more important than the glutathione peroxidase-like activity of ebselen [25, 26]. In analogy, the beneficial effects of diphenyl diselenide and its analogs can also be mediated via their reduction catalyzed by the liver TrxR [6]. However, to the best of our knowledge, the potential reduction of diphenyl diselenide and ebselen by cerebral TrxR enzymes has not been previously investigated. In effect, the reduction of ebselen (or its diselenide) and of diphenyl diselenide by brain TrxR can be an important molecular mechanism involved in their neuroprotective properties. We therefore aimed to evaluate the hypothesis that diphenyl diselenide and its analogs (4,4'-bistrifluoromethyl-diphenyl diselenide, 4,4'-bismethoxy-diphenyl diselenide, 4,4'-biscarboxy-diphenyl diselenide, 4,4'-bischloro-diphenyl diselenide, 2,4,6,2',4',6'-hexamethyl-diphenyl diselenide) (Figure 1) could be substrates for rat brain TrxR. Furthermore, we have done a comparative study with ebselen, a prototype organoselenium compound that has been used in clinical trials with borderline success [5,18,19, 22].

2. Materials and Methods

2.1. Material and Enzyme

All Chemicals were of analytical grade and were obtained from Sigma Aldrich, Merk or Fluka. TrxR from rat brain was purified essentially as described by Hill et al., 1997 [11].

2.2. Thioredoxin reductase assay

TrxR activity was determined according Zhao and Holmgren, 2002 [25]. Activity was performed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5, 100 μ L of TrxR (8-10 μ g protein/mL) and 100 μ M of NADPH. The quantity of enzyme was chosen based on previous experiments, in which trials were conducted with concentrations of 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15.0 and 20 μ g of the partially purified protein/mL of reaction medium and we have observed a linear reaction from 5.0 to 12.5 μ g/ml when diphenyl diselenide and 4,4'-bischloro-

diphenyl diselenide were used as substrate (data not shown). Enzyme reaction was started with the addition of organoselenium compounds. Since ebselen and bistrifluoromethyl diselenide did not stimulate NADPH oxidation in the presence of brain TrxR, we also tested concentrations of 2.5, 5, 7.5, 30 and 50 μM (data not shown).

2.4. *Statistical analysis*

Statistical analysis were performed using three-way (type of compound) x (concentration) x time ANOVA. Univariate analyses followed by Duncan's multiple range test were performed where appropriate.

3. Results

In the presence of partially purified brain mammalian Trx Reductase (TrxR), diphenyl diselenide, bismethoxydiphenyl diselenide and bischlorodiphenyl diselenide (at 10, 15 and 20 μM) stimulated NADPH oxidation, indicating that they are substrates of brain rat TrxR (Figure 2A, 2C and 2E). However, ebselen and bistrifluoromethyl diselenide did not stimulate NADPH oxidation in the presence of partially purified rat brain TrxR. Consequently, ebselen and bistrifluoromethyl diselenide are not substrate of cerebral TrxR obtained from rats (Figure 2B and 2G).

4. Discussion

Here we have investigated the ability of diphenyl diselenide and its analogs (4,4'-bistrifluoromethyl-diphenyl diselenide, 4,4'-bismethoxy-diphenyl diselenide, 4,4'-biscarboxy-diphenyl diselenide, 4,4'-bischloro-diphenyl diselenide, 2,4,6,2',4',6'-hexamethyl-diphenyl diselenide) and ebselen to serve as substrate of rat cerebral and hepatic TrxR enzymes. Of note, in our recent study [6], we observed that diphenyl diselenide, 4,4'-bistrifluoromethyl-diphenyl diselenide, 4,4'-bismethoxy-diphenyl diselenide, 4,4'-bischloro-diphenyl diselenide and ebselen were substrate of hepatic TrxR; in contrast, here we have observed that ebselen and bistrifluoromethyl-diphenyl diselenide were not

reduced by cerebral TrxR. The differential expression of TrxR isoforms and the existence of alternative splice variants of TrxR in different mammalian tissues or cells [1] could explain, at least in part, why ebselen and bistrifluoromethyl-diphenyl diselenide were not substrate of rat brain TrxR.

In accordance with our previous results [6], here we have confirmed that ebselen is substrate of rat hepatic TrxR and stimulated NADPH oxidation (Table 1). Furthermore, as previously observed [6], diphenyl diselenide was six times more active than ebselen as a substrate of hepatic TrxR (Table 1). The results presented here suggest that diphenyl diselenide could exhibit neuroprotective properties by mimicking the activity of glutathione peroxidase and also via its reduction catalyzed by rat brain TrxR enzymes (Scheme 1A). However, ebselen was not a good substrate of rat brain TrxR, indicating that its neuroprotective properties can be associated predominantly with its thiol peroxidase-like activity (Scheme 1C). In contrast, the hepatoprotective effect of both compounds can occur via the two pathways (Scheme 1B and 2B). However, the extent of operation of GPx-like or the TrxR-like (i.e., the NADPH reduction of ebselen or diphenyl diselenide catalyzed by TrxR) pathway *in vivo* is unknown. Consequently, a better understanding of the antioxidant properties and, consequently, the potential pharmacological and therapeutic use of these agents could be greatly improved with the determination of the extent that each pathway works in different tissues.

Acknowledgement

The financial support by FAPERGS-PRONEX-CNPQ, CAPES, FINEP, INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection and CNPq is gratefully acknowledged.

References

[1] E.S.J. Arnér, Focus on mammalian thioredoxin reductases – Important selenoproteins with versatile functions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1790 (2009) 495-526.

- [2] N.B.V. Barbosa, J.B.T. Rocha, D.C. Wondracek, J. Perottoni, G. Zeni, C.W. Nogueira, Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress, *Chem. Biol. Interact.* 163 (2006) 230-238.
- [3] N.B.V. Barbosa, J.B.T. Rocha, J.C.M. Soares, D.C. Wondracek, J.F. Gonçalves, M.R.C. Schetinger, C.W. Nogueira, Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 186-194.
- [4] P. Celi, Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33 (2011) 233-240.
- [5] D.A. Dawson, H. Masayasu, D.I. Graham, I.M. Macrae, The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat, *Neurosci. Lett.* 185 (1995) 65-69.
- [6] A.S. de Freitas, A.S. Prestes, C. Wagner, J.H. Sudati, D. Alves, L. O. Porciúncula, I.J. Kade, J.B. T. Rocha, Reduction of Diphenyl Diselenide and Analogs by Mammalian Thioredoxin Reductase Is Independent of Their Glutathione Peroxidase-Like Activity: A Possible Novel Pathway for Their Antioxidant Activity, *Molecules.* 15 (2010) 7699-7714.
- [7] G. Erbil, S. Ozbal, U. Sonmez, C. Perkçetin, K. Tugyan, A. Bagriyanik, C. Ozogul, Neuroprotective effects of selenium and ginkgo biloba extract (EGb761) against ischemia and reperfusion injury in rat brain, *Neurosciences.* 13 (2008) 233-238.
- [8] M. Farina, M. Aschner, J.B.T. Rocha, Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* In press (2011).
- [9] S. Flemer Jr., Selenol protecting groups in organic chemistry: Special Emphasis on selenocysteine Se-protection in solid phase peptide synthesis, *Molecules* 16(2011) 3232-3251.

- [10] G. Gille, H. Reichmann, Iron-dependent functions of mitochondria-relation to neurodegeneration, *J. Neural. Transm.* 118 (2011) 349-359.
- [11] K.E. Hill, G.W. McCollum, M.E. Boeglin, R.F. Burk, Thioredoxin Reductase activity is decreased by selenium deficiency, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 293-295.
- [12] K. Jomova, Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C.J. Rhodes, M. Valko, Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease, *J. Appl. Toxicol.* 31 (2011) 95-107.
- [13] J. Lu, A. Holmgren, Selenoproteins, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 723-727.
- [14] C. Luchese, C.W. Nogueira, Diphenyl diselenide in its selenol form has dehydroascorbate reductase and glutathione-S-transferase-like activity dependent on the glutathione content, *J. Pharm. Pharmacol.* 62 (2010) 1146-1151.
- [15] A. Maruszak, C. Zekanowski, Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35(2011) 320-330
- [16] G. Mugesh, W.W. Dumont, H. Sies, Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds, *Chem. Rev.* 101(2001) 2125–2179.
- [17] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: pharmacology and toxicology, *Chem. Rev.* 104(2004) 6255–6286.
- [18] C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule, *J. Braz. Chem. Soc.* 21(2010) 2055-2071.
- [19] C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Toxicology and Pharmacology of Selenium: Emphasis on Synthetic Organoselenium Compounds, *Arch Toxicol* DOI 10.1007/s00204-011-0720-3

- [20] S. Ozbal, G. Erbil, H. Kocdor, K. Tugyan, C. Pekcetin, C. Ozogul, The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, *Neurosci. Let.* 483 (2008) 265-269.
- [21] O. Rackham, A.M.J. Shearwood, R. Thyer, E.McNamara, S.M.K. Davies, B.A. Callus, A.M. Vizuete, S.J. Berners-Price, Q. Cheng, E.S.J. Arner, A. Filipovska, Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: Implications for developments of specific inhibitors, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (2011) 689-699.
- [22] I. Saito, T. Asano, K. Takakura, H. Abe, T. Yoshimoto, H. Kikichi, T. Ohta, S. Ishibashi, Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *Neurosurgery* 42 (1998) 269-277.
- [23] H. Steinbrenner, H. Sies, Protection against reactive oxygen species by selenoproteins, *Biochim Biophys Acta* 1790(2009) 1478-1485.
- [24] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazul, J.Telser, Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*39(2007) 44-84
- [25] R. Zhao, A. Holmgren, A novel antioxidant mechanism of Ebselen Involving Ebselen diselenide, a substrate of mammalian Thioredoxin and Thioredoxin Reductase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39456-39462.
- [26] R. Zhao, H. Masayasu, A. Holmgren, Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(2002) 8579-8584.

Legends of Figures and Schemes

Figure 1: Structures of diselenide compounds and ebselen.

Figure 2 Reduction of diphenyl diselenide compounds and ebselen I (A), II (B), III (C), IV (D), V (E), VI (F), VII (G) by cerebral mammalian Thioredoxin Reductase (TrxR). Enzyme was mixed with a medium containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 and then the reaction was started by adding NADPH (final concentration 100 μ M). 0 (\square), 10(O), 15(Δ), 20(∇) μ M of diselenide compounds or ebselen. Statistical analyses were performed by three-way ANOVA (seven compounds \times four concentrations \times 12 time points). Data analysis yielded a significant type of compound \times concentration \times time interaction $F(180, 1680) = 11.7$; $p < 0.000001$, which indicates that the consumption of NADPH was dependent on the concentration, on the type of compound and on the sampling time.

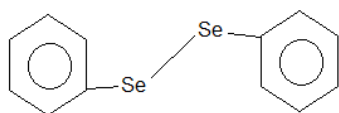
Scheme 1: Mechanisms for neuroprotective (A,C) and hepatoprotective (B,D) effects of diphenyl diselenide (PhSeSePh) and Ebselen (Ebse). Two pathways are indicated: 1) indicates the TrxR catalyzed formation of selenophenol (the selenol intermediate of diphenyl diselenide; PhSeH; A,B) and the selenol of ebselen ;Ebse-SeH; D) and 2) indicates the thiol-peroxidase-like pathway, where endogenous reduced thiols can directly reduce diphenyl diselenide and ebselen to their respective selenol intermediates (A-D).

Table 1 – Comparative Reduction of Diphenyl Diselenide and Ebselen by Hepatic and Cerebral TrxR.

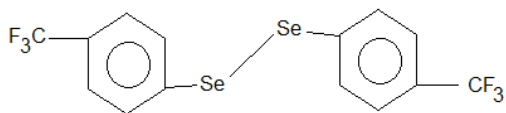
ΔAbs 340nm (NADPH oxidation/min) x 10³	Control	Diphenyl Diselenide	Ebselen
LIVER	1.00 ± 0.57	86.00 ± 4.91	14.31± 0.70
BRAIN	1.05 ± 0.14	11.60 ± 0.80	0.60 ± 0.05

Data are expressed as mean±SEM for 3 independent experiments. Two-way ANOVA (2 (tissues: liver or brain) x 3 (compounds: control, diselenide or ebselen) yielded a significant main effect of tissues ($F(1,12)= 307.4$; $p<0.001$), main effect of compounds ($F(2,12)=323.6$; $p<0.001$), and a significant interaction tissues x compounds ($F(2,12)= 188.5$; $p<0.001$).

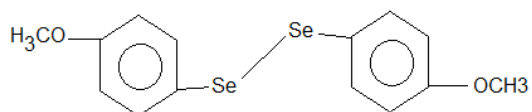
I - Diphenyl diselenide



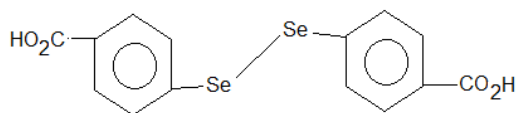
II - 4,4'- bistrifluoromethyldiphenyl diselenide



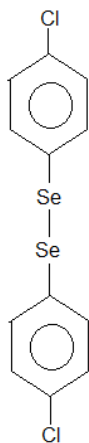
III - 4,4'- bismethoxydiphenyl diselenide



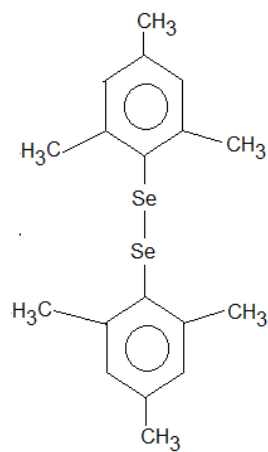
IV - 4,4'- biscalboxydiphenyl diselenide



V - 4,4'- bischlorodiphenyl diselenide



VI - 2,4,6,2',4',6' - hexamethyldiphenyl diselenide



VII - Ebselen

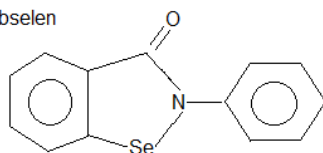


Figure 1

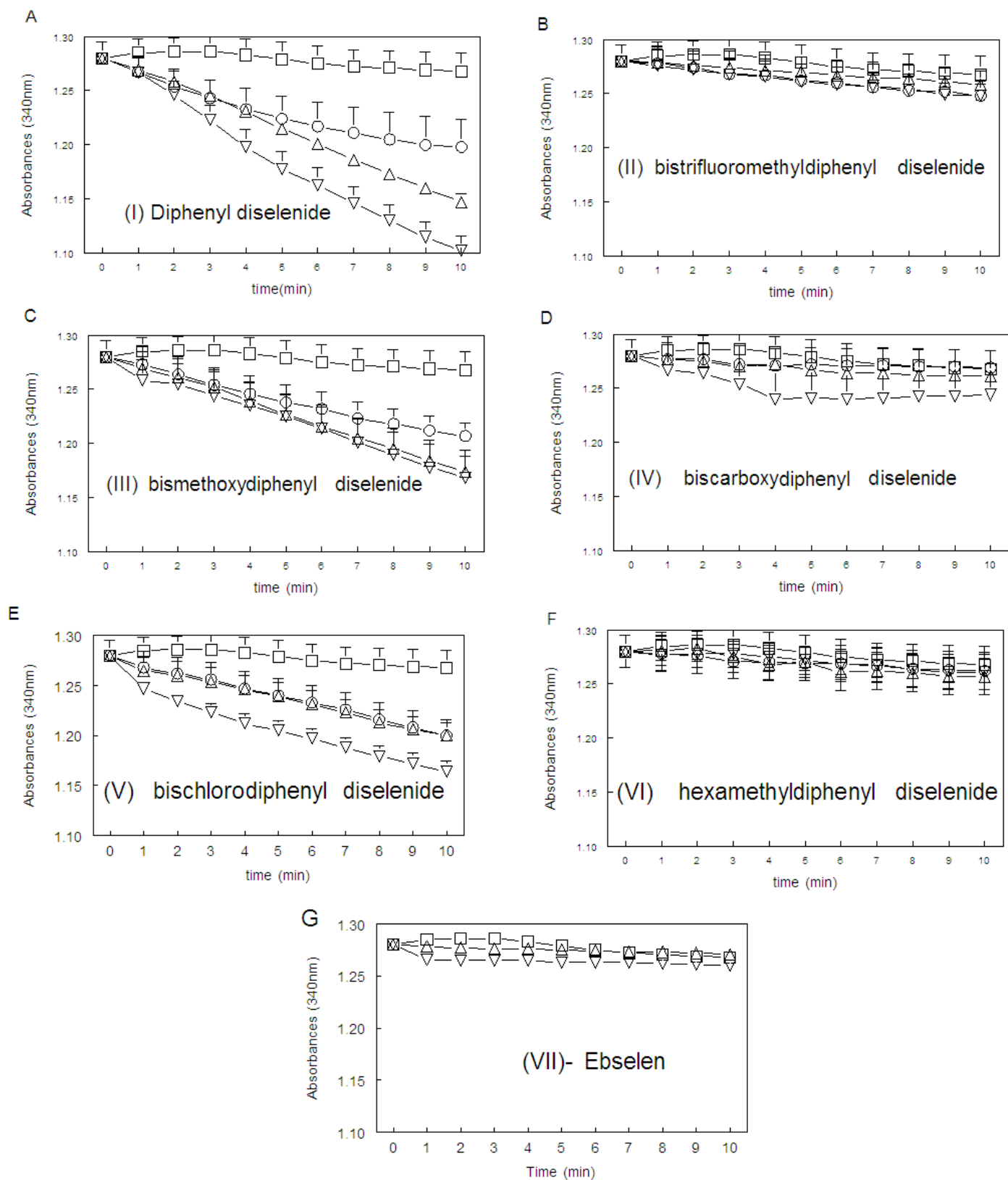
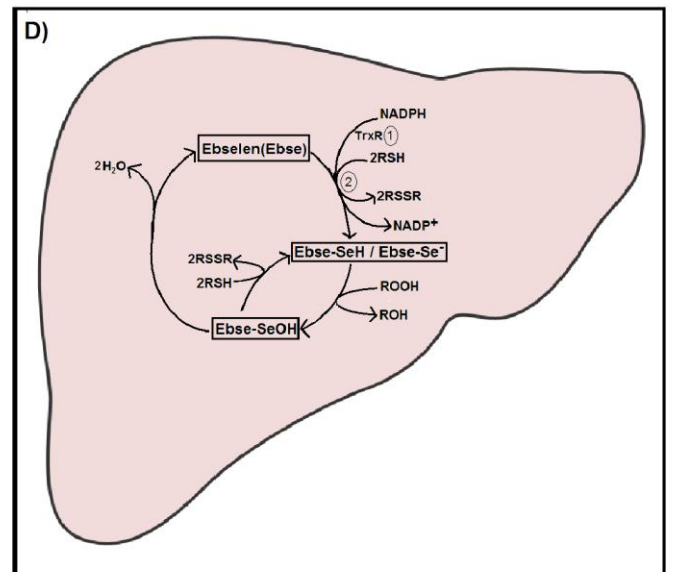
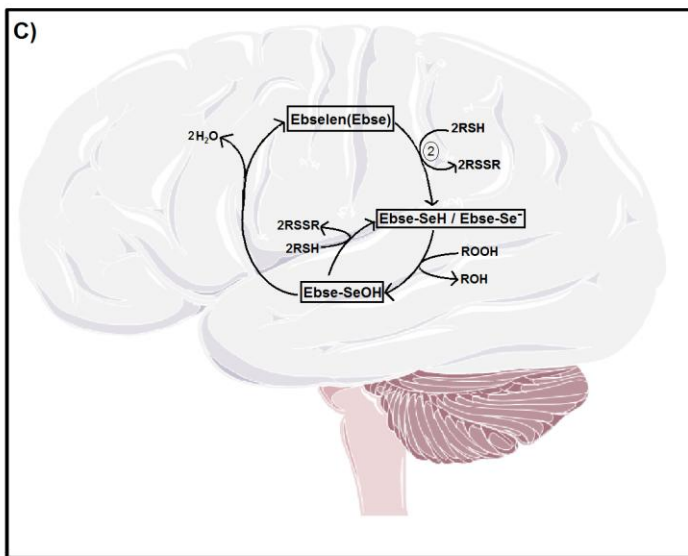
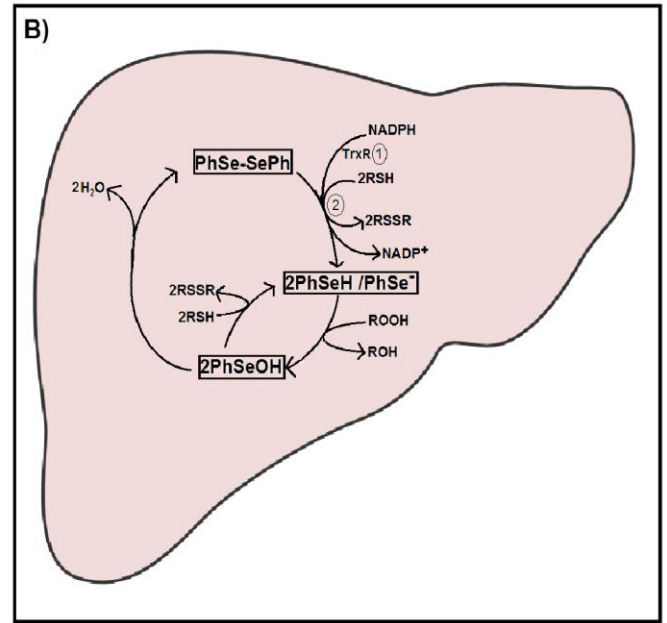
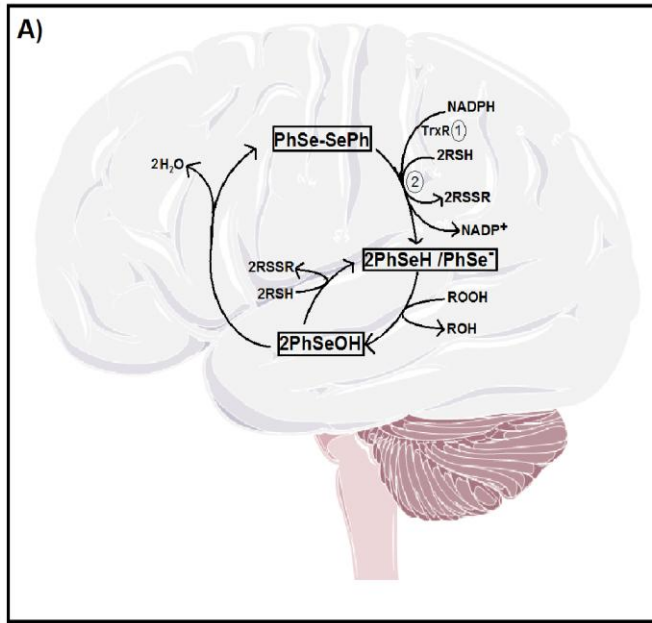


Figure 2



Scheme 1

5. DISCUSSÃO

O ebselen, um composto orgânico de selênio, foi utilizado há mais de 10 anos em ensaios clínicos para o tratamento de condições neuropatológicas associadas com o estresse oxidativo (Yamagush et al.,1998; Saito et al.,1998; Ogawa et al., 1999). Nesta época, o conceito de que o ebselen poderia ser usado para o tratamento de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo estava ligado essencialmente à sua atividade mimética a GPx. Mais recentemente, Zhao & Holmgren (2002) demonstraram que o ebselen também interage como substrato para a enzima TrxR, podendo ser reduzido pelos elétrons provenientes do NADPH, formando um intermediário selenol/selenolato que pode eficientemente decompor peróxido de hidrogênio. Essa pesquisa também considera que a decomposição de peróxidos pelo ebselen, via TrxR, pode ser mais eficiente do que pela atividade mimética à GPx.

Considerando o exposto acima, alguns diaril disselenetos como o disseleneto de difenila têm demonstrado possuir atividade antioxidante similar à do ebselen. Conseqüentemente, a eventual participação do disseleneto de difenila e seus análogos (disseleneto de bistrifluormetildifenila, disseleneto de bismetoxidifenila, disseleneto de biscalboxidifenila, disseleneto de bisclorodifenila e disseleneto de hexametildifenila) como substratos para TrxR de fígado e cérebro de mamíferos poderia explicar as suas propriedades antioxidantes e farmacológicas.

No **artigo 1** do presente estudo, observou-se que a capacidade tipo tiol oxidase (capacidade de oxidar tióis na ausência de peróxido), atividade mimética à glutathiona peroxidase (oxidação de tióis determinada na presença de peróxido) e a capacidade do disseleneto de difenila e análogos de serem reduzidos pela enzima TrxR hepática variou muito em função da substituição na porção aromática. Disseleneto de difenila, disseleneto de bistrifluormetildifenila e disseleneto de bisclorodifenila exibiram todas estas atividades. Em contraste, o disseleneto de bismetoxidifenila tem uma alta atividade como substrato para TrxR hepática, ao passo que não tem atividade mimética à GPx. No caso do disseleneto de bistrifluormetildifenila, por outro lado, tem-se que salientar que este composto exibiu uma fraca atividade como substrato para TrxR hepática

(**Figura 2B, artigo 1**) e não demonstrou afinidade para servir como substrato para a TrxR cerebral (**Figura 2B, manuscrito 1**), enquanto que apresenta uma alta atividade tiol-peroxidase. O disseleneto de biscarboxidifenila e disseleneto de hexametildifenila não apresentaram qualquer uma destas três atividades em níveis apreciáveis.

Embora a atividade tiol oxidase de alguns disselenetos possa indicar uma potencial propriedade pró-oxidante, uma vez que demonstra a oxidação de grupamentos tiólicos e, conseqüentemente, poderia dar alguma indicação sobre a toxicidade destes compostos (Nogueira et al., 2004), a sua interação com tióis é fundamental para a formação do selenol/selenolato e conseqüente degradação de peróxidos. Como observado no **artigo 1**, os disselenetos que foram bons substratos para a TrxR apresentaram atividade tiol oxidase, com exceção do disseleneto de bismetoxidifenila. Esse efeito é demonstrado por uma correlação positiva entre a atividade tiol oxidase e a capacidade desses compostos de serem reduzidos pela TrxR (**Figura 6A, artigo 1**). Além disso, a análise estatística também mostrou uma tendência para uma correlação entre tiol oxidase e a atividade mimética à glutathione peroxidase (**Figura 6B, artigo 1**). No entanto, não há correlação significativa entre a atividade tiol peroxidase e a capacidade dos disselenetos em serem reduzidos pela TrxR (**Figura 6C, artigo 1**), indicando que, para alguns compostos, a habilidade em servir como substrato para TrxR independe da atividade do tipo tiol peroxidase. Logo, estas duas vias para degradação de peróxido são autônomas.

Os efeitos do disseleneto de biscarboxidifenila e bismetoxidifenila em evitar a oxidação do DTT (**Tabela 1, artigo 1**) não são facilmente explicáveis. Um fator que poderia contribuir para um possível “efeito protetor” desses compostos na oxidação de tióis é a presença de um grupo relativamente volumoso com oxigênio em ambos os grupamentos R. Assim, a presença de oxigênio nesses grupamentos e o impedimento estérico poderiam dificultar a interação desses dois compostos com o DTT.

Em recente estudo, Kade et al. (2008) observou que uma molécula orgânica volumosa diminuiria a atividade mimética à GPx e conseqüentemente a atividade antioxidante de disselenetos análogos do colesterol. No presente estudo, as substituições na fração orgânica no disseleneto de difenila eram relativamente menores, quando comparados ao colesterol, mesmo assim, os

dados demonstraram uma marcada redução das atividades tiol oxidase, tiol peroxidase e sua capacidade de agir como substratos para TrxR, mantendo o disseleneto de difenila como o composto mais eficiente nestas três habilidades. Isso pode ser observado, por exemplo, para os disselenetos substituídos, como biscoxidifenila e hexametildifenila, que não atuaram como miméticos da GPx ou como substratos para TrxR.

Além disso, observamos também que a capacidade mimética da GPx dos disselenetos pode ser alterada devido à efeitos eletrônicos. Quando observamos grupamentos doadores de elétrons (no caso hexametildifenila e bismetoxidifenila) percebe-se que estes causaram uma perda completa da atividade tiol peroxidase. Por outro lado, a introdução de grupamentos receptores de elétrons (cloro ou trifluormetil) em geral, foi associado com a manutenção da atividade mimética à GPx do disseleneto de difenila.

Contudo, o efeito eletrônico não é um fator crítico para determinar a capacidade dos disselenetos em serem reduzidos pela TrxR, uma vez que a introdução de um grupamento doador de elétrons pode ser associada a uma alta (bismetoxidifenila) ou a uma baixa (hexametildifenila) habilidade em servir como substrato para a TrxR. Conseqüentemente, podemos supor que a capacidade dos disselenetos de serem substratos para TrxR pode ser relacionado ao efeito estérico, que poderia ser mais importante do que interferir com a estabilidade selenol/ selenolato, como o efeito eletrônico.

Como observamos no **artigo 1**, alguns dos diaril disselenetos como disseleneto de difenila, disseleneto de bistrifluormetildifenila, disseleneto de bismetoxidifenila, disseleneto de biscoxidifenila e o Ebselen demonstraram servir como substratos para TrxR hepática, no entanto, no **manuscrito 1**, ebselen e disseleneto de bistrifluormetildifenila não demonstraram afinidade para atuar como substrato para a TrxR cerebral. As diferenças na expressão e nas funções da TrxR em diferentes tecidos ou células de mamíferos poderiam explicar o fato de o ebselen e o disseleneto de bistrifluormetildifenila não atuarem como substrato para TrxR de cérebro de mamíferos.

Segundo Rackham et al. (2010), a TrxR citosólica (TrxR1) e a mitocondrial (TrxR2) têm afinidades diferentes para substratos como dissulfetos e inibidores metálicos. Arner, (2009) cita que as TrxRs são expressas a partir de três genes distintos em humanos (nomeados TXNRD1, TXNRD2 e TXNRD3),

assim, cada uma pode reduzir diferentes tipos de substratos em diferentes compartimentos celulares. Seus intrigantes padrões de expressão envolvem mecanismos complexos de transcrição, resultando em diversos “splicings” alternativos, ocorrendo codificação de uma série de variantes de proteínas que possam ter funções específicas para células e tecidos restritos. Além dessas diferenças evidentes e marcantes na expressão de TrxR1 e TrxR2 em diferentes tecidos, parece óbvio que também existam diferenças mais sutis na regulação e expressão dessas duas isoenzimas e suas muitas variantes de splice alternativo (Arnér, 2009).

A **tabela 1 do manuscrito 2**, mostrou que quando analisamos no mesmo dia, com os mesmos reagentes, os compostos disseleneto de difenila e ebselen na concentração de 15 μ M, o ebselen demonstrou uma habilidade seis vezes menor para ser substrato para TrxR hepática quando comparado ao disseleneto de difenila e falhou ao atuar como substrato para a TrxR cerebral. Esses resultados sugerem que o disseleneto de difenila apresenta propriedades neuroprotetoras, tanto por atuar como mimético da GPx quanto por agir como substrato para a TrxR (**Esquema 1A, manuscrito1**). No entanto, o ebselen não demonstrou ser um bom substrato para a TrxR cerebral, logo suas propriedades neuroprotetoras podem ser devidas à sua atividade mimética à GPx (**Esquema 1C, manuscrito1**). Em contraste, ambos os compostos possuem atividade hepatoprotetora por fazerem uso dessas duas vias, ou seja, além da atividade tiol peroxidase, tanto o disseleneto de difenila quanto o ebselen atuam como substrato para a enzima TrxR (**Esquema 1B e 1D, manuscrito 1**).

Dessa maneira, os resultados aqui apresentados indicam que o disseleneto de difenila e alguns de seus análogos agiram como substratos para TrxR de cérebro e fígado de rato. Logo, suas propriedades antioxidantes podem estar, também, associadas à sua interação com o sistema tioredoxina redutase. Contudo, mais estudos são necessários para concluir o potencial farmacológico e terapêutico destes agentes.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados presentes nesta tese podemos concluir que:

- A propriedade antioxidante do ebselen e de alguns diaril disselenetos (disseleneto de difenila, disseleneto de bisclorodifenila, disseleneto de bistrifluormetildifenila) deve-se, em parte, por sua atividade mimética à glutaciona peroxidase.
- A capacidade de mimetizar a glutaciona peroxidase pode ser alterada devido à efeitos eletrônicos.
- A atividade antioxidante do ebselen, disseleneto de difenila e alguns análogos (bistrifluormetildifenila, bistriclorometildifenila e bismetoxidifenila) pode ser também atribuída à capacidade destes compostos em atuarem como substratos para a TrxR.
- Há uma correlação positiva entre a atividade tiol oxidase e a habilidade em servir como substrato para TrxR hepática, uma vez que a interação com grupamentos tiólicos auxilia na formação de selenol/selenolato.
- Não há correlação entre a atividade do tipo tiol peroxidase dos compostos de selênio e a sua habilidade em sofrer redução na presença da TrxR, indicando, conseqüentemente, uma dissociação entre as duas vias aqui estudadas para degradação de peróxido (via substrato para TrxR hepática ou mimético da GPx).
- Substâncias que são substratos para TrxR hepática como o ebselen e o bistrifluormetildifenila, não necessariamente são substratos para a TrxR cerebral.

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Verificar a capacidade do Ebselen, disseleneto de difenila e análogos (disseleneto de bistrifluormetildifenila, disseleneto de bismetoxidifenila, disseleneto de biscoxidifenila, disseleneto de bisclorodifenila e disseleneto de hexametildifenila) em servir como substrato para TrxR de outros tecidos de mamíferos.
- Realizar estudos *in vivo* visando elucidar os efeitos tóxicos dos análogos do disseleneto de difenila (disseleneto de bistrifluormetildifenila, disseleneto de bismetoxidifenila, disseleneto de biscoxidifenila, disseleneto de bisclorodifenila e disseleneto de hexametildifenila);
- Realizar estudos *in vivo* com o objetivo de verificar o potencial neuro e hepatoprotetor dos análogos do disseleneto de difenila (disseleneto de bistrifluormetildifenila, disseleneto de bismetoxidifenila, disseleneto de biscoxidifenila, disseleneto de bisclorodifenila e disseleneto de hexametildifenila) em diferentes modelos experimentais;
- Realizar estudos *in vivo* com objetivo de verificar a capacidade dos análogos do disseleneto de difenila (disseleneto de bistrifluormetildifenila, disseleneto de bismetoxidifenila, disseleneto de biscoxidifenila, disseleneto de bisclorodifenila e disseleneto de hexametildifenila) como quelantes de metais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, p. 153–158, 2001.

ARNÉR, E. S. J. Focus on mammalian thioredoxin reductases - Important selenoproteins with versatile functions. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1790, p. 495-526, 2009.

ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 6102- 6109, 2000.

ASCHNER, M. et al. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 285-291, 2007.

ÁVILA, D. S. et al. An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. **Brain Res. Bull.**, v. 76, p. 114–123, 2008.

BARBOSA, N. B. V. et al. Effect of organic forms of selenium on δ -Aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 149, p. 243-253. 1998.

BORGES, L. P. et al. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem. Biol. Interact**, v. 160, p. 99- 107, 2006.

BURGER, M. E. et al. Ebselen attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat brain. **Pharm. Biochem. Beh.**, v. 81, p. 608 – 615, 2005.

CHAMBERS, I. et al. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the “termination” codon, TGA. **EMBO J.**, v. 5, p. 1221–1227, 1986.

CHENG, W. H. et al. Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. **J. Nutr.**, v. 127, p. 1445–1450, 1997.

CHU, F. F.; DOROSHOW, J. H.; ESWORTHY, R. S. Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 2571–2576, 1993.

COMMANDEUR, J. N. M.; ROOSEBOOM, M.; VERMEULEN, N. P. E. Chemistry and biological activity of novel selenium-containing compounds. Biological reactive intermediates VI. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 500, p. 105, 2001.

COTGREAVE, I. A. et al. α -(phenylselenenyl) acetophenone derivatives with glutathione peroxidase-like activity. A comparison with Ebselen. **Biochem. Pharm.**, v. 43, n. 4, p.793-802, 1992.

DAWSON V. L., DAWSON T. M. Nitric oxide neurotoxicity. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 10, p. 179–190, 1996.

DAWSON, D. A. et al. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione-peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in the rat. **Neurosci. Lett.**, v.185, n. 1, p. 65–69, 1995.

DE FREITAS, A. S. et al. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and Mercury deposition in adult mice. **Brain Res. Bull.**, v. 79, p. 77-84, 2009.

DUAN, Y. J. et al. Purification and characterization of a novel monomeric glutathione peroxidase from rat liver. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 19003–19008, 1988.

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, p. 1304-1343, 2006.

ENGMAN, L. et al. Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. **Anticancer Res.**, v. 17, n. 6, p. 4599-4605, 1997.

FARINA, M. et al. Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. **Toxicol. Sci.**, v. 73, p. 135-140, 2003.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 132-134, 1973.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem. Pharm.** v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 1609–1623, 1992.

HOLBEN, D. H.; SMITH, A. M. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. **J. Am. Diet. Ass.**, v. 99, p. 836-843, 1999.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 237-271, 1985.

IWAOKA, M.; TOMODA, T. A model study on the effect of an amino group on the antioxidant activity of glutathione peroxidase. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, p. 2557-2561, 1994.

JESSE, C.R. et al. Further analysis of the antinociceptive action caused by p-methoxyl diphenyl diselenide mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 91, p. 573-580, 2009.

KADE, I. J. et al. Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. **Neurochem. Res.**, v.33, p.167-178, 2008.

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

KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, p. 1439–1443, 2003.

LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoproteins. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 2, p. 723-727, 2009.

LUCHESE, C. et al. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. **Toxicology**, v. 230, p. 189-196. 2007.

MACHADO, M. S. et al. 3'3-Ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: A new organoselenium compound with interesting antigenotoxic activities. **Mut. Res.**, v. 673, p. 133-140, 2009.

MAIORINO, M.; ROVERI, A.; URSINI, F. Antioxidant effect of Ebselen (PZ 51): peroxidase mimetic activity on phospholipid and cholesterol hydroperoxides vs free radical scavenger activity. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 295, p. 404-409, 1992.

MASUMOTO, H.; SIES, H. The reaction of ebselen with peroxynitrite. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 9, p. 262-267, 1996.

MAY, S. W.; ZHI-CHAO, Q.; XIA, L. Requirement for GSH in recycling of ascorbic acid in endothelial cells. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 11, p. 1261–1269, 2002.

MEOTTI, F. C. et al. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ. Res.**, v. 94, p. 276–282, 2004.

MEOTTI, F. C. et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicol. Lett.**, v.143, n. 1, p. 9-16, 2003.

MUGESH, G.; DUMONT, W.W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2125-2179, 2001.

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.

NODBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J.B. Toxicology and Pharmacology of Selenium: Emphasis on Synthetic Organoselenium Compounds. **Arch Toxicol.**, DOI 10.1007/s00204-011-0720-3.

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

NOGUEIRA, C. W. et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, v.183, p. 29-37, 2003a.

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

OGAWA, A. et al. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: A placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Cereb. Dis.**, v. 9, p. 112-118, 1999.

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

PARNHAM, M. J.; GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. **Biochem. Pharmacol.**, v.36, p.3095-3102, 1987.

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

PETRAGNANI, N.; RODRIGUES, R.; COMASSETO, J. V. The reaction of selenenyl halides with wittig reagents. **J.Organomet Chem.**, v. 114, p. 281-292, 1976.

PINTON, S. et al. Organoselenium improves memory decline in mice: Involvement of acetylcholinesterase activity. **Neurosci. Lett.**, v. 472, p. 56-60, 2010.

RACKHAM, O. et al. Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: Implications for developments of specific inhibitors. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 50, p. 689-699, 2011.

SAITO, I et al. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery**, v.42, p. 269-277, 1998.

SANTOS, F. W. et al. Efficacy of 2,3-dimercapto-1- propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v.43, p.1723-1730, 2005a.

SANTOS, F. W. et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chem. Biol. Interact.**, v.151, p.159-165, 2005b.

SAVEGNAGO, L. et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 21: 86–92, 2006.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C.M. Selenium as integral part of factor 3 against dietary liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 3292–3293, 1957.

SIES, H.; ARTEEL, G.E. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. **Free Radic. Biol. Med.**, v.28, n.10, p. 1451-1455, 2000.

TAKAHASHI, K.T. et al. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoprotein distinct from the known cellular enzyme. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 256, p. 677–686, 1987.

ULLRICH, V. et al. Ebselen binding equilibria between plasma and target proteins. **Biochem. Pharmacol.**, v.52, p.15-19, 1996.

URSINI, F. et al. The diversity of glutathione peroxidases. **Methods Enzymol.**, v. 252, p. 38-53, 1995.

WENDEL, A. et al. A novel biologically active seleno-organic compound-II. Activity of PZ51 in relation to glutathione peroxidase. **Biochem. Pharmacol.**, v.33, p. 3241-3245, 1984.

WILHELM, E. A. et al. Introduction of trifluoromethyl group into diphenyl diselenide molecule alters its toxicity and protective effect against damage

induced by 2-nitropropano in rats. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.61, p. 197-203, 2009a.

WILHELM, E. A.; JESSE, C. R.; NOGUEIRA, C. W. Protective effect of p-methoxyl diphenyl diselenide in lethal acute liver failure induced by lipopolysaccharide and D-galactosamine in mice. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.23, p. 727-734, 2009b.

WILSON, S. R.; ZUCKER, P. A.; HUANG, R. R. C.; SPECTOR, A. Development of synthetic compounds with glutathione-peroxidase activity. **J. Am. Chem. Soc.**, v.111, p. 5936-5939, 1989.

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

YAMAGUCHI, T. et al. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial, Ebselen Study Group. **Stroke**, v. 29, p. 12-17, 1998.

ZHAO, R.; HOLMGREN, A. A novel antioxidant mechanism of Ebselen Involving Ebselen diselenide, a substrate of mammalian Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 39456-39462, 2002.

ZHAO, R.; MASAYASU, H.; HOLMGREN, A. Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p. 8579-8584, 2002.