



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica

*Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico do
diseleneto de difenila em células de mamíferos*

Renato Moreira Rosa

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre

2008



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica

*Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico do
diseleneto de difenila em células de mamíferos*

Renato Moreira Rosa

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pegas Henriques

Porto Alegre

2008

Apresentação

Esse trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (GENOTOX-Instituto Royal).

A redação da tese fundamentou-se nas recomendações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, dessa Universidade.



*Dedico esses 10 anos de estudo
aos meus pais Renato e Yara,
por serem tudo pra mim.
Minha dívida é eterna. E a Deus,
por ser tão generoso comigo.*

“Não existe nada de nobre em ser superior a algum outro homem. A verdadeira nobreza está em ser superior ao seu ser anterior.”

Provérbio Hindu

Agradecimentos

Ao professor Henriques por esses vários anos de orientação, os quais não propiciaram apenas amadurecimento científico, mas também um aprendizado pessoal ímpar no âmbito de relações humanas e trabalho em equipe. Obrigado pela oportunidade e confiança; não é fácil descrever o sentimento de gratidão e admiração em poucas palavras.

Para Jenifer pelas conversas científicas e não científicas. Com certeza todas serviram como orientação de trabalho ou de vida. Também pela confiança, alegria e ensinamentos.

Ao professor Martin Brendel pelo bom convívio e muitas correções de inglês dos artigos.

Ao professor e amigo Rafael Roesler por ser essa pessoa alegre e positiva. Por toda consideração e pelas muitas reflexões científicas e cafezinhos alegres na *Roeslerlândia*.

Ao departamento de biofísica, um ambiente de trabalho peculiar e divertíssimo, palco de acontecimentos que o mundo não acreditaria. Por essa razão, as histórias fantásticas (assim como as lamentáveis) desse local permanecem apenas na lembrança daqueles que lá passaram e deixaram um pouco de si e estão certamente levando um pouco da alegria consigo. Em especial para Jussara, Iranez, Rosane, Dona Helena, Dona Zelma, Sérgio, professor Eduardo e Marli.

Para professora Ana Lígia, pessoa agradabilíssima, pelas conversas, confidências, ensinamentos, desabafos e por ser um exemplo a ser seguido no ensino e relacionamento com os alunos.

Para professora Fabiana Horn pelas conversas, risadas, reflexões científicas, pelo apoio e confiança nas atividades de ensino e materiais emprestados (e não foram poucos).

Ao programa de Pós-Graduação em bioquímica, pela acolhida. Para Cléia, Silvinha e Luciano pela solicitude e profissionalismo. A todos colegas do grupo do professor Henriques, departamento de biofísica e centro de biotecnologia (para as amigas dos velhos tempos da Rádio Corredor, Daniela e Alessandra). Em especial: Ana Catarina, Priscila, Márcia, Miriana, Miriam, Izabel, Knulp, Gustavo Reolon, Cláudio, Jaque Cardone e Cassiana. E Para Nucha, por ser essa pessoa tão doce.

Para a minha imensa amiga Dinara, um dos melhores acontecimentos desses anos, pelas alegrias, conversas, milhares de festas e eventos e por ser essa pessoa tão maravilhosa. Espero que essa amizade dure ainda muitos anos. Se fosse um vídeo, com certeza estaria na pasta da alegria infinita.

Para a Fernanda e Fabi, duas felizes conseqüências de uma mala que desembarcou num aeroporto indevido, revelando essas amigas maravilhosas em minha vida. Com certeza, nossa amizade não se perderá como a mala da Fabi...

Para um amigo descoberto na reta final, o Iuri, grande galo, por divertir as tardes do laboratório, ser parceiro de orkut e youtube. E por ser um depositário fiel dos acontecimentos do departamento. Ah sim, também pelas discussões-ciência. “Tu vê; vos vedes, tu vendo”. E claro, para professora Kátia por ser o pólo positivo do departamento.

Para Albanim, por ensinar que a Xuxa era uma mentirosa e concordar que nada é fácil. E pelos programas overnight divertidíssimos e caipirinhas espetaculares.

Ao Gabriel Furtado, pau pra toda obra, pelo profissionalismo, bom humor e por ser esse indivíduo tão indiferente, sem sentimentos, um cubo de gelo. É a única que pessoa que consegue retirar o mérito de todos esses anos de estudo, mas eu gosto dele mesmo assim. Ao Atílio Galhardo, o cara mais viajante da UFRGS (literalmente) pela diversão das poucas tardes de trabalho... mas que, sem dúvida, foram as melhores.

Para Rafael Roehrs, grande amigo e irmão de laboratório e de vida. Grandes tempos em que nosso maior problema era: “E aí, o que vamos fazer amanhã à noite?”

Para os amigos de longa data da faculdade de farmácia Juliana Jung, Gabriel Escoto, Cristina Tinoco, Rafael Halmenschlager, Denise Jornada, Rodrigo Fortunato e Luciane Buzin.

Para as pessoas que fizeram a maior mudança desses últimos anos... começou inocentemente como uma aula qualquer.. e me acolheram em uma segunda família, repleta das melhores pessoas que já pude conhecer- o pessoal da biomedicina. Vocês moram no meu coração, Matheus, Maurício, Gabriel e Jonier.

Ao Werner, por tornar-se de um mero desconhecido para um amigo inominável em segundos. Para a amiga substituta mais titular que pode existir, Roberta, por ser tão meiga e querida.

Para meu pai e minha mãe por serem um exemplo de carinho e amor incondicional; pelo apoio sempre e pela proteção. Por tornar a nossa casa o melhor lugar do mundo, um refúgio dos problemas e tristezas desse mundo. Embora não seja de demonstrar, amo vocês muito.

Estruturação da tese

Essa tese está estruturada da seguinte maneira: uma introdução geral, os objetivos (gerais e específicos), os quatro capítulos principais escritos na forma de artigos científicos, uma discussão geral, conclusões (gerais e específicas) e perspectivas.

A introdução geral aborda os aspectos mais importantes a respeito do papel fisiológico do selênio, seus metabólitos de baixa massa molecular e das selenoproteínas assim como os efeitos tóxicos do metalóide e dos compostos inorgânicos e orgânicos contendo o elemento. Nos fundamentos das ações biológicas dessas moléculas encontram-se as bases racionais para o desenvolvimento de estruturas organoselenadas com potencial farmacodinâmico, o qual também é exposto nessa seção, com ênfase no planejamento de substâncias com ação antioxidante. A necessidade do estudo do potencial genotóxico dos compostos organoselenados é discutido, tanto sob o ponto de vista de segurança quanto para aproveitamento na terapia antiproliferativa. Ao final da introdução, abordam-se as propriedades farmacológicas e toxicológicas do diseleneto de difenila e os métodos experimentais empregados.

O capítulo I trata de uma revisão sobre os efeitos farmacológicos e tóxicos do diseleneto de difenila e os mecanismos moleculares envolvidos. Nesse capítulo, alguns resultados em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em reparação de DNA são mostrados e complementam trabalhos anteriores com essa molécula organoselenada.

O capítulo II descreve um estudo de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagênese em células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês em cultura (células V79) e investiga o mecanismo envolvido, abordando principalmente o conteúdo citosólico de glutatona reduzida.

O capítulo III estuda o efeito antioxidante, observado no capítulo II, e sua repercussão no potencial lesivo de vários agentes mutagênicos em células V79. Nessa seção, o aumento da atividade glutatona peroxidase das células V79 tratadas com esse composto organoselenado é mostrado como processo responsável pela sua ação antioxidante e antimutagênica.

O capítulo IV encerra os estudos de toxicidade genética do diseleneto de difenila em mamíferos dessa tese, explorando o potencial genotóxico em diversos órgãos e tecidos de camundongos tratados com essa substância em dose única por via intraperitoneal. Na seqüência apresenta-se uma discussão geral, inter-relacionando os resultados apresentados nos capítulos anteriores, as conclusões e perspectivas geradas por essa tese.

Sumário

Resumo	2
Abstract	4
Lista de siglas e abreviaturas	6
Introdução	
1. Breve história dos efeitos biológicos do selênio	8
2. Selenoproteínas	12
2.1. Glutathiona peroxidases	14
2.2. Tioredoxina redutases	18
2.3. Deiodinases	20
2.4. Selenofosfato sintetases	21
2.5. Outras selenoproteínas	21
2.5.1. Selenoproteína P	21
2.5.2. Selenoproteína W	22
2.5.3. Selenoproteína de 15 kDa	23
2.5.4. Selenoproteína de 18 kDa	23
2.5.5. Selenoproteína N	23
2.5.6. Selenoproteínas menos conhecidas	23
2.6. Selenoproteínas e a síntese de compostos organoselenados de interesse terapêutico	24
3. Biodisponibilidade e metabolismo do selênio	25
3.1. Biodisponibilidade	25
3.2. Ocorrência e metabolismo em animais.....	26
4. Desenvolvimento da farmacologia dos compostos organoselenados: moléculas com ação antioxidante	28
5. Selênio e formas organoselenadas na prevenção e tratamento do câncer	31
5.1. Evidências de estudos epidemiológicos	32
5.2. Visão geral dos mecanismos de ação anticarcinogênica	32
5.3. Organoselenados sintéticos aromáticos	37
5.4. Oxaseleninas, selenazinas e selenazolidinas	38
5.5. Ebselen	38
6. Por que estudar a genotoxicidade dos compostos organoselenados?	39
7. O diseleneto de difenila, objeto desse estudo	44
8. Estratégias para o estudo dos compostos organoselenados empregadas nesse trabalho	46
8.1. Células V79	46
8.2. Teste de micronúcleos	48
8.3. Ensaio cometa	50
Objetivos	
Objetivo geral	54
Objetivos específicos	54

Capítulo I - Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models	55
Capítulo II - Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts	74
Capítulo III - Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells	87
Capítulo IV - DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide	99
Discussão	111
Conclusão	
Considerações finais.....	130
Conclusão.....	132
Perspectivas	133
Referências bibliográficas	137
Anexos	
Lista de figuras	162

RESUMOS



O diseleneto de difenila, objeto de estudo desse trabalho é um composto orgânico simples e estável, utilizado como reagente eletrofílico em indústrias de síntese química, com interessantes atividades farmacológicas e vários efeitos tóxicos. O objetivo desse estudo é aumentar o conhecimento a respeito dos efeitos do DPDS em células de mamíferos em cultura, com intuito de investigar novos efeitos farmacológicos e entender os mecanismos envolvidos em sua toxicidade. A abordagem experimental foi realizada em fibroblastos de pulmão de hamster chinês em cultura e em órgãos e tecidos de camundongos, avaliando-se o estado redox celular, citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico.

Esse trabalho avaliou os efeitos citotóxicos, pró-oxidantes, genotóxicos e mutagênicos dessa molécula em células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês). A citotoxicidade em células V79 foi avaliada por quatro ensaios metabólicos diferentes e observou-se efeito tóxico somente em concentrações acima de 50 μM , em maneira dose e tempo dependente. O ensaio de redução do MTT sugeriu a possível geração de espécies reativas de oxigênio. O tratamento das células por 3h em doses citotóxicas de DPDS aumentou o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e aumentou a sensibilidade ao tratamento com mutágenos oxidativos, indicando um efeito pró-oxidante. Esses efeitos devem-se a redução dos níveis intracelulares de glutathione reduzida sem aumento de taxa de formação de glutathione oxidada, ou seja, a depleção de GSH ocorre por formação de adutos, reforçando os resultados prévios. Utilizando-se o ensaio cometa em condições alcalinas, verificou-se que o tratamento com diseleneto de difenila em altas concentrações é capaz de induzir quebras de cadeias de DNA. O teste de micronúcleos mostra que as lesões geradas pelo composto organoselenado em doses citotóxicas em células V79 não são eficientemente reparadas e fixam-se como quebras cromossômicas. Considerando-se também a proteção conferida pela N-acetilcisteína, um precursor da biosíntese de glutathione, em termos de depleção do tripeptídeo, é compreensível entender o seu potencial protetor observado contra as lesões ao DNA e mutagênese induzida pelo diseleneto de difenila.

No ensaio de sobrevivência clonogênica, em concentrações no intervalo 1.62-12.5 μM , DPDS não foi citotóxico, enquanto em concentrações a partir de 25 μM , essa molécula significativamente reduziu a sobrevivência das células V79. Nesse sentido, investigou-se o efeito antioxidante do DPDS nas concentrações não-citotóxicas em células V79. O potencial antioxidante do diseleneto nas concentrações empregadas aumentou a sobrevivência e bloqueou a genotoxicidade e mutagenicidade de metilmetanosulfonato e radiação ultravioleta de 254 nm, dois mutágenos capazes de causar danos oxidativos à molécula de DNA. Além disso, o tratamento não impediu os danos ao DNA induzidos por 8-metoxipsoraleno fotoativado, o qual não induz lesões oxidativas. O pré-tratamento das células V79 com a molécula organoselenada em concentrações inferiores a 12,5 μM foi capaz de reduzir os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico após exposição ao peróxido de hidrogênio, MMS e radiação UVC em maneira dose-resposta e aumentou a atividade da glutathione peroxidase das células V79. Dessa maneira, os resultados mostram claramente que DPDS, em baixas concentrações, apresenta propriedades antimutagênicas, as quais devem-se, provavelmente, a sua capacidade antioxidante.

Os efeitos genotóxicos do DPDS em diversos órgãos (cérebro, rins, fígado, baço, testículos e bexiga urinária) e tecidos (medula óssea, linfócitos) de camundongos, usando o ensaio cometa in vivo, foi usado para determinar o limiar de dose no qual a molécula exerce efeitos benéficos ou tóxicos em animais. DPDS induziu danos ao DNA em cérebro, fígado, rins e testículos em modo dose-resposta, no espectro de dose 75-200 $\mu\text{mol/Kg}$ em dose única por via intraperitoneal, sendo os maiores níveis observados no cérebro. Nossas análises demonstraram uma alta correlação com a redução dos níveis de GSH e um aumento na peroxidação lipídica e dano ao DNA. Dessa forma, esse estudo estabeleceu uma relação entre os efeitos

pró-oxidantes e genotóxicos para o DPDS em camundongos. DPDS não foi genotóxico e não induziu peroxidação lipídica em nenhum dos órgãos avaliados em doses menores que 50 $\mu\text{mol/kg}$. O pré-tratamento com N-acetilcisteína foi capaz de impedir os efeitos genotóxicos sistêmicos do composto. Em resumo, cérebro, fígado, rins e testículos são órgãos potenciais para a genotoxicidade sistêmica do DPDS, sendo o cérebro o principal órgão-alvo.

Em razão das propriedades genotóxicas observadas, investigou-se o efeito do tratamento com DPDS na manutenção da integridade estrutural do DNA em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, usando o ensaio cometa alcalino. O efeito genotóxico do DPDS em células MCF-7 foi idêntico àquele verificado em células V79, indicando que os mecanismos operantes na produção das quebras da fita de DNA são semelhantes e possivelmente baseados no efeito pró-oxidante por depleção de glutatona reduzida. Reforçando essa proposição, o pré-tratamento da linhagem MCF-7 nos mesmos moldes realizados em V79 também potencializou as lesões ao DNA induzidas pelo peróxido de hidrogênio. Esses achados sugerem que os efeitos genotóxicos do DPDS podem ser investigados para o uso na terapia antiproliferativa.

ABSTRACT

Diphenyl diselenide (DPDS) is an organoselenium compound with interesting pharmacological activities and various toxic effects. As it is an electrophilic reagent, it is used in the synthesis of a variety of pharmacologically active OS compounds. This study aimed at deepening our knowledge on the effects of DPDS on mammalian cultured cells in order to investigate new pharmacological possibilities for its application and the mechanisms underlying its toxicity. These assays were performed in mammalian cultured cells, using a permanent cell line derived of Chinese hamster lung fibroblasts- V79 cells- and mice organs and tissues, focusing on effects of DPDS on cell redox status, cytotoxicity, genotoxicity, and mutagenicity.

This work evaluated the cytotoxic, pro-oxidant, genotoxic, and mutagenic properties of this molecule in V79 Chinese lung fibroblast cells. When cells were treated with increasing concentrations of DPDS, its cytotoxic activity, as determined using four cell viability endpoints, occurs in doses up to 50 μ M. The MTT reduction was stimulated, which may indicate reactive oxygen species (ROS) generation. Accordingly, the treatment of cells for 3hr with cytotoxic doses of DPDS increased TBARS levels, and sensitized cells to oxidative challenge, indicating a pro-oxidant effect. The measurement of total, reduced, and oxidized glutathione showed that DPDS can lead to lower intracellular glutathione depletion, with no increase in the oxidation rate in a dose- and time-dependent manner. At the higher doses, DPDS generates DNA strand breaks, as observed using the comet assay. The treatment also induced an increase in the number of binucleated cells in the micronucleus test, showing mutagenic risk by this molecule at high concentrations. In addition, the pre-incubation with N-acetylcysteine, this restored GSH to normal levels, annulled DPDS pro-oxidant and genotoxic effects. These findings show that DPDS-induced oxidative stress and toxicity are closely related to intracellular level of reduced glutathione.

In the clonal survival assay, at concentrations ranging from 1.62-12.5 μ M, DPDS was not cytotoxic, while at concentrations up to 25 μ M, it significantly decreased the survival of V79 cells. In this respect, the treatment with this organoselenium compound at non-cytotoxic dose range increased cell survival after challenge with hydrogen peroxide, methyl-methanesulphonate, and UVC radiation, but did not protect against 8-methoxypsoralen plus UVA-induced cytotoxicity. Moreover, the treatment prevented induced DNA damage, as verified in the comet assay. The mutagenic effect of these genotoxins, as measured by the micronucleus test, similarly attenuated or prevented cytotoxicity and DNA damage. Treatment with DPDS also decreased lipid peroxidation levels after exposure to hydrogen peroxide MMS, and UVC radiation, and increased glutathione peroxidase activity in the extracts. In this manner, the results clearly demonstrate that DPDS at low concentrations presents antimutagenic properties, which are most probably due to its antioxidant properties.

The genotoxic effects of DPDS in multiple organs (brain, kidney, liver, spleen, testes and urinary bladder) and tissues (bone marrow, lymphocytes) of mice using in vivo comet assay, was used to determine the threshold of dose at which it has beneficial or toxic effects in animals. DPDS induced DNA damage in brain, liver, kidney and testes in a dose response manner, in a broad dose range at 75-200 μ mol/Kg with the brain showing the highest level of damage. Overall, our analysis demonstrated a high correlation among decreased levels of GSH content and an increase in lipid peroxidation and DNA damage. This finding establishes an interrelationship between pro-oxidant and genotoxic effects. In addition, DPDS was not genotoxic and did not increase lipid peroxidation levels in any organs at doses < 50 μ mol/kg. Finally, pre-treatment with N-acetyl-cysteine completely prevented DPDS-induced oxidative damage by the maintenance of cellular GSH levels, reinforcing the positive relationship of DPDS-induced GSH depletion and DNA damage. In summary,

DPDS induces systemic genotoxicity in mammals as it causes DNA damage in vital organs like brain, liver, kidney and testes.

In view of its genotoxic properties, we investigated whether DPDS might be inducing DNA damage in MCF7 cells, a mammary adenocarcinoma cell line, using the *in vitro* alkaline comet assay. DPDS did not generate significant DNA damage in a dose response manner but the pre-treatment with DPDS potentiates the DNA damage induced by hydrogen peroxide, reinforcing a clear pro-oxidant ability. This finding supports the genotoxic effects of DPDS in mammalian tumor cells and suggests its potential in antiproliferative therapy.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMP	monofosfato de adenosina
AOM	azoximetano
DMBA	7,12-dimetilbenzilantraceno
DNA	ácido desoxirribonucléico
FAD	flavina adenina dinucleotídeo oxidado
Gly	glicina
GPX	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
MNU	metilnitrosouréia
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
ppm	unidade de concentração partes por milhão
RNA	ácido ribonucléico
ROH	forma alcoólica após redução de algum hidroperóxido orgânico
ROOH	hidroperóxido orgânico
SeCys	selenocisteína
SeMet	selenometionina
SePP	selenoproteína P
tRNA	RNA de transferência
TRx	tioredoxina peroxidase



INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Breve história dos efeitos biológicos do selênio

O elemento químico selênio, nomeado em homenagem à deusa grega da lua, Selene, foi descoberto pelo químico suíço Jöns Jakob Berzelius em 1817. O paradoxo de selênio como micronutriente essencial e um mineral extremamente tóxico está perfeitamente incluído na observação de Paracelso (1493-1541): “... a dose faz o veneno...”. O primeiro interesse em relação a atividade biológica deste elemento sempre esteve ligado a sua toxicidade. A conflitante história do papel biológico do selênio inicia muito antes da sua identificação, em meados do século 13, provavelmente no período entre 1271-1295. Marco Polo, enquanto viajava pela rota da seda no oeste da China, fez importantes relatos sobre uma planta venenosa, abundante nas montanhas da região de Sucidir, que afetava qualquer animal de carga que dela se alimentasse. Em seus relatos, essa planta tóxica foi responsável pela intoxicação de dezenas de cavalos de mercadores que atravessavam a região. Mais de 1500 espécies de vegetais do gênero *Astragalus* são conhecidas e estão distribuídas pelo oeste da China, oeste dos Estados Unidos e outras regiões áridas e semiáridas do mundo. Reconhece-se hoje que a observação de Marco Polo seja o primeiro relato da toxicidade do selênio; hipótese reforçada pelo fato de 25 espécies deste gênero possuírem habilidade de captar elevados níveis desse metalóide do solo, aliado à constatação do solo da região apresentar altíssimas concentrações do elemento (Spallholz 1994).

Em 1842, a primeira evidência de toxicidade do selênio foi relatada, mas aparentemente o primeiro envenenamento autêntico ocorreu realmente por volta de 1856 em Madison, descrito por um cirurgião residente no forte Randall, território de Nebraska. Nesse relato está descrita uma doença fatal entre cavalos que pastavam em certas áreas perto do forte. Somente em 1929 investigações foram iniciadas e em 1933, uma conexão entre selênio e a chamada “Doença Alcalina”, que assolou animais que alimentaram-se de forrageiras em fazendas da região, foi descoberta e descrita em um relatório confidencial da Estação Experimental da Faculdade de Agricultura de Dakota do Sul. Um ano depois, estudos dessa estação mostraram níveis de selênio em valores acima de 1000 ppm na vegetação nativa. A doença alcalina e um segundo estágio patológico verificados em bovinos e ovelhas da região foram atribuídos à ingesta crônica de plantas com altos níveis de selênio. Interessantemente, a doença que assolava os animais de carga, descrita por Marco Polo possuía as mesmas características da doença alcalina descrita no oeste

americano: perda de pêlo, deformação de articulações e atonia (Flohe *et al.* 2000; Spallholz 1994).

A imagem inicial deste intrigante elemento químico nunca foi boa. Em 1935, o selenito, forma inorgânica do elemento, foi determinado como componente tóxico em um cultivar de trigo. Muitos estudos foram realizados com cavalos, mulas e bois da região, mostrando uma alta quantidade de selênio acumulada nos animais mortos. Em 1943, o selênio era descrito como um poderoso carcinógeno (Vernie 1984).

Após o incidente americano em 1933, uma pergunta sem resposta desde o século 13 tornou-se o objetivo de muitos pesquisadores: “Por que o selênio é tóxico?”

Painter, em 1941, foi o primeiro a propor uma explicação para a toxicidade do selênio, estudado na forma de selenito. Segundo ele, essa toxicidade devia-se à interação com os tióis biológicos. Em 1947, Feigl e West mostraram que selenito era capaz de oxidar sulfidrilas e reduzir uma variedade de aceptores de elétrons, como o azul de metileno. Apenas em 1958, Tsen e Tappel, provaram uma interação efetiva entre selênio inorgânico, na forma de selenito, e um tiol biológico, a glutatona, formando um produto estável de interação denominado selenodiglutaciona. Howard Ganther, seguindo na mesma linha mecanística proposta por Painter e comprovada por Feigl e West, Tsen e Tappel, em 1968 sugeriu que a toxicidade do selênio era produto da interação de selênio com grupamentos disulfetos de proteínas e conseqüentemente formação de selenotrisulfetos estáveis. Estes selenotrisulfetos ainda poderiam ser reduzidos por excesso de tióis ou pela enzima glutatona redutase celular, formando selenopersulfetos altamente reativos (Ganther 1968; Spallholz 1994). Levander e seus colaboradores, em 1973, apresentaram a redução do citocromo c catalisada por compostos selenados em presença de glutatona. E também mostraram que selenito e selenocisteína eram catalisadores mais efetivos que selenometionina. Iniciava-se então uma nova direção nos estudos da toxicidade do selênio: “Selênio e moléculas contendo selênio como catalisadores biológicos e tióis celulares como mecanismos de desintoxicação” (Levander *et al.* 1973; 1974).

Em 1983, Spallholz utilizando microscopia eletrônica de varredura observou danos em membranas celulares de eritrócitos de ratos causados por selenito e selenocisteína em presença de glutatona *in vitro* (Hu e Spallholz 1983). Na Alemanha, em 1988, durante o encontro “Selênio na Biologia e Medicina”, Seko revelou que selenito poderia reagir com glutatona e então formar seleneto de hidrogênio, produzindo o ânion superóxido (Figura 1). Essa informação pode ser considerada uma das mais importantes na resposta da questão de toxicidade do metalóide (Spallholz 1994). Em 1993, usando um sistema de amplificação com lucigenina, verificou-se

formação de ânion superóxido durante a reação de selenito e glutatona, mercaptoetanol e cisteína (Yan e Spallholz 1993).



Figura 1. Reação entre o íon selenito e glutatona com formação de seleneto de hidrogênio e geração de ânion superóxido (Adaptado de Spallholz 1994).

O perfil tóxico de várias moléculas organoselenadas, de origem natural e sintética tem sido estudado ao longo dos anos, sempre fundamentando-se na interação com tióis biológicos, em reação direta ou por outros processos (Drake 2006; Moreira Rosa *et al.* 2005; Sarma e Mugesh 2005; Shen *et al.* 2000; Yang *et al.* 2000c).

Embora, a história da toxicidade do selênio seja extensa e fantástica, da mesma maneira, o papel essencial deste elemento para a saúde animal e o seu uso na medicina evoluíram, paralelamente, na mesma ordem de grandeza e velocidade.

Em 1954, Pinsent notou que certas culturas bacterianas apresentavam um melhor crescimento quando em meios ricos em selênio. Em 1957, o médico alemão Klaus Schwarz, especialista em doenças hepáticas, pesquisador do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, observou que ratos alimentados com extrato de levedura, sacarose e mínimas quantidades de α -tocoferol desenvolviam uma necrose hepática fatal. Schwarz verificou que selênio, até agora conhecido como um mineral tóxico, estava presente no fator 3 - uma fração isolada do extrato de rim murino - o qual preveniu a necrose hepática nesses animais. Esse foi o primeiro relato do papel do selênio, na forma de compostos orgânicos e inorgânicos solúveis, como fator de crescimento para bactérias e micronutriente essencial para muitas espécies de mamíferos. Em 1960, veterinários comprovaram que várias síndromes como distrofia muscular em gado ou doenças cardíacas em suínos deviam-se à suplementação insuficiente do elemento. Iniciava-se uma era em que o selênio passava a ser considerado nutriente essencial para mamíferos (Birringer *et al.* 2002; Flohe *et al.* 2000; Kohrle 1999).

Em 1969, Shamberger e Frost divulgaram um estudo epidemiológico mostrando uma associação inversa entre pessoas residentes em regiões com rica distribuição geográfica de selênio e incidência de câncer (Shamberger 1970; Shamberger e Frost 1969). A partir dos anos 70, a humanidade aprendeu que a deficiência severa de selênio causava, ou ao menos gerava predisposição para

diversas doenças. Na região de Keshan, na China, uma epidemia de cardiomiopatia congênita com insuficiência miocárdica foi observada exclusivamente em moradores das zonas montanhosas desta área, patologia denominada Síndrome de Keshan. Nesse sentido, um estudo mostrou que a soja cultivada nestas montanhas apresentava níveis baixíssimos de selênio. No mesmo ano, uma forma de artrite crônica e deformante que atingia crianças e mulheres em período de menopausa, a Doença de Kaschin-Beck, foi descrita nessa mesma população (Flohe *et al.* 2000). Em 1994, selênio foi considerado essencial para a função tireoidiana normal e para a fertilidade masculina (Kohrle 1999; Rayman 2000).

Não se pode ser negar que esse intrigante elemento químico parece ter completado sua metamorfose nos campos da biologia e medicina. Ao contrário do que se pensava, as faces farmacológica e toxicológica das moléculas dotadas de selênio ainda estariam longe da elucidação completa. A partir dos resultados de Shamberger e Frost, uma verdadeira corrida por estudos epidemiológicos entre ingestão de selênio e incidência de câncer foi disparada, bem como a investigação da ação anticarcinogênica deste elemento e seus derivados (Soriano-Garcia 2004).

Os únicos fatos conhecidos desde 1970 e realmente aceitos como verdadeiros no contexto científico são: (i) uma dieta adequada de selênio é necessária para um envelhecimento saudável, prevenção do câncer e doenças cardiovasculares, para promover o perfeito funcionamento do sistema imunológico e da função endócrina, em especial na fertilidade masculina; (ii) a suplementação com selênio acima dos valores encontrados numa dieta balanceada constitui-se numa ação controversa e muito perigosa (Ip 1998; Rayman 2000; Reilly 1998).

Em 1973, uma luz foi lançada na tentativa de explicar os efeitos benéficos do selênio verificados nos estudos epidemiológicos. Dois grupos de pesquisa mostraram a existência de selênio no centro ativo das enzimas formato desidrogenase bacteriana e glutatona peroxidase de mamíferos, as primeiras selenoproteínas com função catalítica descrita (Birringer *et al.* 2002; Flohe *et al.* 2000). A base metabólica da requisição nutricional deste elemento começou a ser esclarecida a partir desta descoberta: o selênio participa do balanço do estado redox da célula. Em 1993, um composto orgânico contendo selênio, denominado ebselen, não-tóxico para mamíferos, apresentou atividades antiinflamatória, antiaterosclerótica e citoprotetora em função de sua capacidade antioxidante (Schewe 1995).

A presença de selênio no centro ativo da glutatona peroxidase foi apenas o início da longa trilha de esclarecimento do mecanismo molecular de seus efeitos biológicos. Em 1990, diversas selenoproteínas de mamíferos haviam sido caracterizadas estrutural e funcionalmente. Em mamíferos, as selenoproteínas

possuem uma importância vital, pois camundongos geneticamente modificados sem o gene codificados do t-RNA selenocisteinil não são viáveis (Papp *et al.* 2007).

A importância das selenoproteínas em mamíferos sempre esteve baseada no papel fundamental da glutathione peroxidase na defesa contra as espécies reativas de oxigênio. Entretanto, em 1997, lições provenientes de estudos com camundongos geneticamente modificados vieram a expandir nossos conhecimentos: animais homocigotos geneticamente modificados sem o gene da glutathione peroxidase citosólica eram viáveis e entre as selenoproteínas estudadas, até o momento, apenas a deleção da tioredoxina redutase não era possível. Desse modo, essa enzima tornou-se a única selenoproteína vital conhecida e a verdadeira razão para a requisição de selênio como micronutriente essencial para mamíferos. Considerando a função delicada do sistema tioredoxina na regulação do ciclo celular, mais uma importante face do selênio acabava de ser descoberta: selênio está envolvido diretamente no controle da proliferação celular em mamíferos (Birringer *et al.* 2002).

A química dos compostos organoselenados desenvolveu-se rapidamente a partir de 1980 assim como a bioquímica deste elemento. A importância da participação do selênio na glutathione peroxidase em mamíferos e o papel dessa enzima na proteção antioxidante inspirou o desenvolvimento dos compostos miméticos da ação dessa enzima bem como a ação do elemento na tioredoxina redutase promoveu, em grande parte, a investigação do efeito antitumoral e quimiopreventivo em animais. Compostos orgânicos contendo selênio constituem, nos interesses farmacológicos dos nossos dias, fontes apreciáveis de moléculas antioxidantes, anticarcinogênicas, antihipertensivas, antiinflamatórias, neuroprotetoras e miméticas de insulina. Dentro dos contextos de farmacologia e toxicologia de compostos contendo selênio, inúmeros são os trabalhos que relatam as estruturas químicas avaliadas biologicamente e os mecanismos moleculares envolvidos nessas ações. Esses consistentes trabalhos de revisão oferecem-nos uma idéia da importância desse elemento químico para a saúde humana (Mugesh *et al.* 2001a; Nogueira *et al.* 2004; Parnham e Graf 1991).

2. Selenoproteínas

Os diversos efeitos biológicos do selênio não podem ser explicados pelas características químicas do elemento por si ou pela pequena quantidade de compostos inorgânicos a que os organismos vivos estão comumente expostos. Na verdade, o selênio inorgânico é assimilado e incorporado em uma variedade de compostos orgânicos com distintos potenciais tóxicos e farmacodinâmicos (Birringer *et al.* 2002). A síntese da maior parte de compostos organoselenados naturais segue vias metabólicas semelhantes às vias de compostos sulfurados. Entretanto, rotas mais

complexas e altamente específicas para selênio foram descobertas na última década (Behne e Kyriakopoulos 2001; Flohe *et al.* 2000; Papp *et al.* 2007).

Desde a descoberta do papel essencial do selênio em 1957, a questão a respeito das formas químicas nas quais esse elemento seria biologicamente ativo atraiu grande interesse. Essa pergunta começou a ser respondida na descoberta das primeiras proteínas contendo selênio. As primeiras selenoproteínas descobertas foram a proteína A do sistema glicina redutase, a formato desidrogenase de *Clostridium* sp. e a enzima de mamíferos glutathione peroxidase (Birringer *et al.* 2002). Desde então, o número de selenoproteínas cresceu substancialmente, ocorrendo em todos os domínios da vida e exercendo inúmeras funções biológicas. Experimentos *in vivo* usando ratos e camundongos alimentados com selenito de sódio contendo um isótopo radioativo do elemento mostrou-nos a existência de inúmeras selenoproteínas com diferentes distribuições teciduais e sub-celulares (Behne e Kyriakopoulos 2001). A descoberta de uma hierarquia na distribuição preferencial do elemento entre as selenoproteínas em situações de redução da ingesta de selênio confirma a importância fisiológicas dessas proteínas. Interessantemente, nessa classificação, a glutathione peroxidase citosólica não ocupa as primeiras posições, desfazendo a idéia errônea de considerar essa enzima como a principal selenoproteína em mamíferos. Um dos primeiros lugares é ocupado pela glutathione peroxidase-4 e os tecidos que recebem preferencialmente o selênio em caso de redução da ingesta são cérebro, medula óssea, hipófise, tireóide, ovários e glândulas supra-renais (Behne e Kyriakopoulos 2001).

Na maioria das selenoproteínas descobertas até hoje, selênio está incorporado sob forma de selenocisteína, o vigésimo primeiro aminoácido essencial (Birringer *et al.* 2002; Papp *et al.* 2007). A selenocisteína possui estrutura similar a cisteína, porém contém um átomo de selênio em lugar do enxofre. O mecanismo pelo qual a selenocisteína é incorporada especificamente nas proteínas ocorre durante a tradução, não sendo um processo de modificação pós-traducional, como imaginava-se antigamente. Esse processo utiliza a maquinaria microssomal da síntese protéica e de maneira geral, em todos domínios da vida, segue alguns passos comuns. Esse refinado mecanismo molecular foi revisado detalhadamente por Birringer e colaboradores (Birringer *et al.* 2002).

Muitas selenoproteínas são óxido-redutases dotadas de similar reatividade entre compostos selenados e sulfurados; uma das razões da intimidade da relação entre selênio e tióis no meio biológico. É notável o fato que todas selenoproteínas identificadas até hoje possuam função catalítica, sendo o resíduo de selenocisteína responsável por essa função. A importância metabólica da selenocisteína está

baseada na elevada ionização do grupo selenol em pH fisiológico, que o torna, em condições de comparação, dotado de uma reatividade muito maior que o grupamento tiol das enzimas contendo cisteína em seu sítio catalítico (Behne e Kyriakopoulos 2001; Schweizer *et al.* 2004).

Em eucariotos, quatro grandes famílias de selenoproteínas podem ser encontradas: as glutathiona peroxidases (GPx), as tioredoxina redutases (TRx), as deiodinases e as selenofosfato sintetases. Além disso, existem várias selenoproteínas não agrupadas em famílias e com função ainda não totalmente conhecida. É interessante notar que selenoproteínas procarióticas não são encontradas em eucariotos e vice-versa, com exceção da selenofosfato sintetase. Outro fato interessante é a alternância entre cisteína e selenocisteína entre essas proteínas; por exemplo, GPx e TRx possuem selenocisteína em mamíferos enquanto os homólogos bacterianos e em protozoários possuem resíduo de cisteína na posição correspondente. Inversamente, selenoperoxiredoxina de *Eubacterium acidaminophilum* possui selenocisteína no centro catalítico enquanto as peroxiredoxinas de mamíferos apresentam cisteína (Flohe *et al.* 2000). Torna-se importante salientar que até alguns anos não existiam evidências de selenoproteínas em leveduras e vegetais. Contudo, como a história biológica do selênio está sempre em constante mudança, descobriu-se que a GPx da alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* possui selenocisteína no centro catalítico (Birringer *et al.* 2002).

2.1. Glutathiona peroxidases

As GPx em mamíferos apresentam selênio no seu sítio catalítico, incorporado na forma de selenocisteína na porção amino terminal, onde reside o pequeno domínio funcional da enzima. Até o momento, apenas quatro GPx contendo selenocisteína não foram descobertas em mamíferos: em vírus fowlpox, no vírus patogênico *Molluscum contagiosum*, no parasito *Schistosoma mansoni* e em *C.reinhardtii* (Birringer *et al.* 2002).

A principal função fisiológica da GPx é a ação antioxidante, reduzindo o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos, com objetivo de manter níveis apropriadamente baixos de peróxidos intracelulares, diminuindo o potencial lesivo dos radicais livres (Behne e Kyriakopoulos 2001; Valko *et al.* 2004; Valko *et al.* 2007).

No centro ativo das GPx de mamíferos, o grupamento selenol é forçado a uma dissociação e polarização pelo grupamento amino de uma glutamina, o qual doa prótons, e pelo resíduo de triptofano. A polarização promovida por essa tríade catalítica faz com que esse grupamento possa reagir de forma extremamente rápida

com qualquer grupo hidroperóxido acessível espacialmente. Em seqüência, o grupamento selenolato é oxidado por hidroperóxidos a ácido selenínico, que por sua vez reage com a glutathiona reduzida (GSH), o agente doador de elétrons, formando o aduto selenenil sulfeto. Uma segunda molécula de glutathiona então regenera a forma ativa da enzima, atacando o aduto selenenil sulfeto para formar glutathiona oxidada (GSSG). Dessa maneira, duas moléculas de GSH são consumidas para formação de GSSG e água enquanto o hidroperóxido é convertido no álcool correspondente. O mecanismo catalítico proposto para GPx está mostrado na figura 2. A estrutura cristalográfica da GPx do plasma humano foi determinada de forma refinada a 2,9 Å de resolução. Ao contrário da enzima de bovinos, em que o átomo de selênio existe como grupamento selenol, selênio está presente na forma de ácido selenínico nos cristais de GPx plasmática humana (Mugesh *et al.* 2001b). A GPx “clássica”, conhecida como GPx-1 ou GPx-citosólica (cGPx) está enormemente ligada à defesa antioxidante; encontra-se presente também no núcleo celular e distribuídas em todos tecidos, embora os maiores níveis sejam encontrados em fígado e eritrócitos. Possui quatro subunidades idênticas de 22 kDa (Flohe *et al.* 2000; Mugesh *et al.* 2001b; Papp *et al.* 2007).

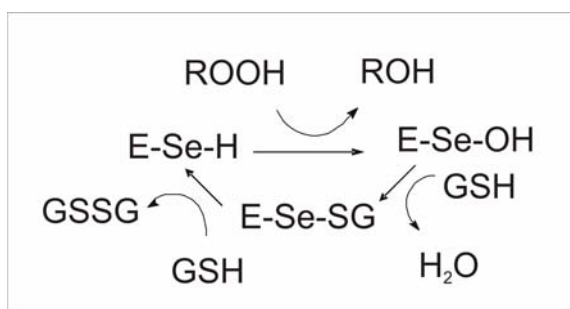


Figura 2. Mecanismo catalítico proposto para glutathiona peroxidase (Adaptado de Mugesh *et al.*, 2001)

Camundongos geneticamente modificados GPx-1 (-/-) não apresentam nenhum fenótipo patológico, mas mostram-se sensíveis a condições geradoras de estresse oxidativo e seus tecidos são incapazes de disparar a via apoptótica em resposta nessas situações (Behne e Kyriakopoulos 2001; Birringer *et al.* 2002).

Existe um estudo muito interessante e bem desenhado experimentalmente a sobre o papel da GPx-1 em camundongos. Beck e alguns colegas mostraram que em animais com deficiência selênio, alguns vírus pouco perigosos poderiam tornar-se virulentos, uma situação relevante para o desenvolvimento da doença de Keshan. Quando camundongos com deficiência de selênio foram inoculados com uma cepa benigna do vírus Coxsackie, encontrado no sangue de pessoas com a doença de Keshan, mutações ocorridas no genoma viral tornaram-o virulento e verificou-se o desenvolvimento de uma cardiomiopatia extremamente semelhante àquela observada na síndrome de Keshan em humanos. Além disso, quando esse vírus isolado de

camundongos doentes foi inoculado em animais com ingesta adequada de selênio, ocorreu dano cardíaco, comprovando a irreversibilidade da mutação. O sequenciamento do genoma viral mostrou a existência de seis mutações pontuais nessa cepa. Em experimento idêntico, realizado em camundongos GPx-1 (-/-), verificou-se que os animais desenvolveram a doença quando infectados com a cepa não virulenta de Coxsackie; o vírus tornou-se ativo nesses animais em função de uma mutação causada pela falta de um sistema de desintoxicação de hidroperóxidos (Birringer *et al.* 2002). Dessa maneira, pensa-se que a redução da ingesta de selênio e consequente redução da atividade da GPx-1 é um fator crucial para o desenvolvimento da síndrome de Keshan em pessoas portadoras do vírus Coxsackie.

Os estudos com camundongos geneticamente modificados também foram reveladores para o papel neurológico desse elemento químico. Há alguns anos sabe-se que a restrição de selênio na dieta conduz ao aumento da sensibilidade a neurotoxinas, em razão do decréscimo da atividade da GPx cerebral. Na mesma direção, em animais GPx-1 (-/-) existe uma sensibilidade muito aumentada a episódios isquêmicos, enfatizando a importância da Gpx-1 na proteção do tecido nervoso contra os insultos oxidativos diretos e indiretos (Schweizer *et al.* 2004).

A enzima GPx-2, também conhecida como GPx gastrointestinal (GPx-GI), protege o organismo contra peróxidos formados pela digestão de alimentos, o que lhe atribui importante colaboração na prevenção do câncer coloretal, embora não exista uma evidência convincente dessa ação. É semelhante à GPx-1 em termos estruturais e funcionais. Entretanto, sua distribuição celular e subcelular aponta para funções mais específicas, tais como a regulação da proliferação e apoptose no epitélio gastrointestinal. Ensaios com camundongos GPx-2 (-/-) não auxiliaram na elucidação das funções dessa enzima, mas camundongos deficientes nos genes para as enzimas GPx-1 e GPx-2 ofereceram achados histopatológicos consistentes com a doença inflamatória de Bowel (Behne e Kyriakopoulos 2001; Birringer *et al.* 2002).

A GPx-3 ou GPx plasmática é uma glicoproteína tetramérica composta por unidades de 23 KDa, produzida por vários tecidos, notadamente pelos rins, e secretada nos fluidos extracelulares. Considerando que a distribuição extracelular do conteúdo tiólico é limitada, o papel específico da GPx-3 parece atuar como uma eficiente peroxidase em compartimentos com capacidade limitada de substratos redutores. Dessa maneira, pode também agir como um interessante regulador da resposta inflamatória por meio da inativação de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos. Acredita-se que essa enzima seja incapaz de contrabalançar um ataque oxidativo severo no plasma, como poderia ocorrer em uma doença infecciosa sistêmica. Todavia, qualquer oxidação disparada por um estímulo

irrelevante, tal como uma pequena população de leucócitos polimorfonucleares ou macrófagos, inevitavelmente seria amplificada para o desencadeamento de uma resposta inflamatória tecidual se não existisse a ação rápida dessa peroxidase no espaço extracelular. Assim sendo, GPx-3 previne a resposta inflamatória sistêmica em situações desnecessárias, exercendo um papel regulador da resposta imunológica. Um fato interessante, que ainda pode estimular de forma importante as pesquisas a respeito dessa função enzimática, é observado pela preferência catalítica de GPx-3 por tioredoxina e glutaredoxina como substratos doadores de elétrons, quando comparados com GSH (Behne e Kyriakopoulos 2001; Birringer *et al.* 2002; Flohe *et al.* 2000; Papp *et al.* 2007).

A fosfolípídeo hidroperóxido GPx, também conhecida como GPx-4, foi a segunda selenoenzima identificada e está envolvida diretamente na proteção da membrana plasmática contra o ataque dos radicais livres. Ao contrário das outras GPx conhecidas, GPx-4 é um monômero de 19,7 KDa encontrada no citosol, núcleo e mitocôndria, com especificidade por substratos hidroperóxidos lipídicos, inclusive de colesterol, podendo reduzir grupamentos hidroperoxil integrados nas membranas celulares. Além disso, atividades mais específicas são atribuídas a essa importante peroxidase, tais como a regulação da biosíntese de leucotrienos, supressão da ativação do fator de transcrição NF- κ B por interleucina-1, inibição da apoptose induzida por vários estímulos, regulação da condensação da cromatina e principalmente atuação como peroxidase ativa durante a espermatogênese. Na verdade, a GPx-4 é a principal selenoproteína da membrana mitocondrial do espermatozóide. Os diversos papéis desempenhados por essa enzima explicam a existência de algumas variantes: nos testículos, por exemplo, o gene da GPx-4 é expresso em, no mínimo, três diferentes formas, por alternância do ponto de início de transcrição e processamento alternativo de RNA (Behne e Kyriakopoulos 2001; Birringer *et al.* 2002; Drevet 2006; Flohe *et al.* 2000; Papp *et al.* 2007).

No epidídimo de camundongo e no epitélio olfatório foram detectadas as GPx-5 e -6 respectivamente (Abdulah *et al.* 2005). A GPx-7 é uma fosfolípídeo hidroperóxido GPx que não possui selenocisteína no sítio ativo (Papp *et al.* 2007). A última integrante dessa família é a GPx do núcleo espermático, uma isoforma peculiar de GPx-4, -snGPx- uma proteína de 34 KDa presente somente em testículos e espermatozóides. Essa proteína está localizada no núcleo das espermátides e seu aparecimento acontece no início da puberdade. Durante a espermatogênese muitas mudanças ocorrem no núcleo, em função da troca de algumas histonas por protaminas e reorganização dos estados de condensação da cromatina, resultando em um material nuclear extremamente compactado e estabilizado por ligações

cruzadas entre protaminas e tióis. A snGPx difere da GPx-4 na porção amino-terminal e pode-se ligar ao DNA em razão de uma região rica em poliarginina e então, participar ativamente da condensação da cromatina. Sua atuação principal deve-se à atividade enzimática protamina tiol peroxidásica, responsável pelas ligações dissulfeto envolvidas na compactação da cromatina e na formação de pontes dissulfeto importantes para o batimento flagelar do espermatozóide, sendo portanto, necessária para maturação espermática e fertilidade masculina (Behne e Kyriakopoulos 2001).

A proteção oferecida pelo selênio contra doenças cardiovasculares está amparada pela proteção antioxidante conferida pela família GPx. Nesse âmbito, GPx-4, reduzindo hidroperóxidos de fosfolípidos e ésteres de colesterol, reduz o acúmulo de lipoproteína de baixa densidade oxidada na parede arterial, retardando ou prevenindo o processo aterosclerótico. Além disso, o combate aos hidroperóxidos formados durante o metabolismo dos eicosanóides impede a inibição da prostaciclina sintetase, embora estimule a produção de tromboxanos relacionados com a agregação plaquetária, constituindo mais um exemplo do delicado e paradoxal equilíbrio mantido por esse elemento químico (Papp *et al.* 2007).

A ação anticarcinogênica do selênio também está intimamente ligada a eventos que alterem o funcionamento perfeito das selenoproteínas. No contexto da carcinogênese, GPx-1 é a melhor candidata para exemplificar o envolvimento de selenoproteínas no desenvolvimento tumoral. A perda da heteroziguidade nesse locus, especialmente em mutações que afetam o éxon 1 da enzima é encontrada em uma série de tumores de cabeça e pescoço, pulmão e mama (Kryukov *et al.* 2003). A redução da atividade GPx-1 tem influência considerável no processo carcinogênico em razão do seu papel como antioxidante e possivelmente por meio da modulação dos processos de reparação de DNA. Novamente, camundongos GPx-1 (-/-) GPx-2 (-/-) desenvolveram tumores de intestino delgado em resposta a inflamação intestinal bacteriana (Diwadkar-Navsariwala *et al.* 2006). A análise de pacientes com tumores de cólon evidenciaram mutações no gene codificador de GPx-1 em um estudo avaliando marcadores moleculares altamente polimórficos, tais como a repetição de alaninas e o polimorfismo prolina-leucina (Hu *et al.* 2005b). Embora GPx-1 seja importante nesses processos, as outras GPx não podem ser ignoradas; GPx-2 é um alvo para o fator de transcrição Nrf2 e apresenta alteração em sua expressão gênica em tumores de cólon e de pele; GPx-4 pode proteger contra o processo tumoral por interferir nas vias de resposta inflamatória (Flohe *et al.* 2000)

2.2. Tioredoxina redutases

As TRx são flavoenzimas homodiméricas amplamente distribuídas entre as proteínas que regulam vários processos intracelulares dependentes do estado redox, estimulando a proliferação de células normais e tumorais. Esse sistema enzimático compreende NADPH, tioredoxina e a enzima TRx. A tioredoxina é uma pequena proteína contendo 104 aminoácidos com uma ponte dissulfeto, dois grupamentos tiólicos e um sítio ativo Trp-Cys-Gly-Pro-Cys conservado, distribuída entre as proteínas redox com função regulatória, como algumas enzimas e fatores de transcrição (Powis *et al.* 1998). O grupo das TRx é caracterizado pela presença da selenocisteína na porção carboxi-terminal (Abdulah *et al.* 2005; Eckenroth *et al.* 2006; Gromer e Gross 2002). Três TRx de mamíferos e uma de *Caenorhabditis elegans* são selenoproteínas enquanto os homólogos bacterianos e de *Plasmodium falciparum* não são. Apesar de sua estrutura bastante conhecida, desde 1996 muita atenção tem sido dada para as TRx, pois a selenocisteína é o penúltimo resíduo da cadeia polipeptídica e o códon UGA correspondente realmente representa o códon de terminação (Birringer *et al.* 2002). Nas TRx de mamíferos, o resíduo selenocisteína participa da catálise; de fato essas proteínas possuem dois centros redox, um homólogo ao encontrado em dissulfetos redutases –(59)CysXXXXCys(64)-, localizado no domínio óxido-redutase da enzima, o qual também contém o sítio de ligação de FAD, e o segundo compreendendo a sequência Gly-Cys-SeCys-Gly, localizado após o domínio de dimerização. Estudos cristalográficos mostram que no interior dessa enzima dimérica, as subunidades são rearranjadas de maneira a permitir a comunicação entre esses centros de reação (Birringer *et al.* 2002; Eckenroth *et al.* 2006).

As Trx reduzem tioredoxina às custas de NADPH. Basicamente, os equivalentes de redução são transferidos do NADPH ao FAD para as cisteínas do motivo central CysXXXXCys, o qual é conservado nessa família. A porção carboxi-terminal, que encontra-se em sua forma oxidada, liga-se ao centro redox central da subunidade oposta por meio de uma ponte selenodissulfeto, assim transferindo os equivalentes de redução para o motivo CysGlyProCys da tioredoxina. Esse mecanismo também é operante se a selenocisteína na porção carboxi-terminal for substituída por cisteína, embora atue com baixa eficiência (Birringer *et al.* 2002). Na figura 3, está mostrado um esquema para a redução da tioredoxina as custas de NADPH (Birringer *et al.* 2002). As TRx de mamíferos também são capazes de utilizar outros substratos, tais como hidroperóxidos, deidroascorbatos, várias enzimas e proteínas (Behne e Kyriakopoulos 2001; Papp *et al.* 2007). Esse sistema enzimático também é capaz de metabolizar selenenil iodetos, possibilitando um ponto de intersecção entre TRx e função tireoidiana (Gromer *et al.* 2004; Mugesh *et al.* 2003).

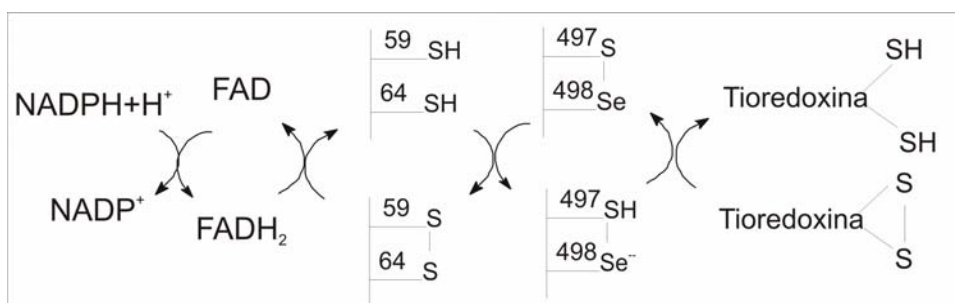


Figura 3. Esquema de redução de tioredoxina com uso de NADPH pela selenoproteína tioredoxina redutase (Adaptado de Birringer et al., 2002).

Fisiologicamente, TRx é um doador de prótons para a enzima ribonucleotídeo redutase, um ponto crucial na biossíntese de nucleotídeos e portanto, todo metabolismo de ácidos nucléicos. Outra função do sistema TRx está relacionada à reparação de DNA e conseqüentemente na fidelidade do fluxo da informação genômica. Em razão desses efeitos, não é admirável que a disrupção genética do sistema TRx inviabilize o embrião (Birringer *et al.* 2002). Das três isoformas presentes em mamíferos, TRx-1 encontra-se no citosol, TRx-2 localiza-se na mitocôndria e TRx-3 parece ser expressa preferencialmente em testículos (Arner e Holmgren 2006; Gromer *et al.* 2004).

Em 2005, uma TRx com habilidade de utilizar tanto GSH como tioredoxina como substrato foi descrita em vários tecidos, acumulando-se nos testículos após a puberdade. Essa proteína possui um domínio glutaredoxina na porção amino-terminal, o qual está ausente nas demais TRx. Assim como GPx-4 e snGPx, essa é mais uma evidência do papel fundamental do selênio na fertilidade masculina (Su *et al.* 2005).

A TRx-1 foi a primeira TRx identificada em mamíferos, sendo um homodímero de 56 kDa (cada subunidade). Interessantemente, a seqüência de cDNA de TRx-1 humana possui maior identidade com GPx eucarióticas e procarióticas que com TRx procarióticas. TRx-1 também possui um alta heterogeneidade, assim como GPx-4, em função de processamento alternativo de RNA nos primeiros éxons, sendo detectada mais de 3 isoformas em ratos. Da mesma maneira, a expressão de vários tipos de mRNA para TRx-2 em humanos foi observada. Assim, imagina-se que ainda existam muitas TRx com diferentes distribuições teciduais e subcelulares agindo no organismo com funções biológicas diversificadas (Behne e Kyriakopoulos 2001; Gromer *et al.* 2004; Papp *et al.* 2007).

2.3. Deiodinases

As iodotironinas deiodinases possuem um enorme papel fisiológico, uma vez que catalisam a ativação e inativação dos hormônios da tireóide. A síntese de

hormônios tireoidianos ocorre por iodinação de resíduos de tirosina da tireoglobulina através de uma heme peroxidase dependente de peróxido de hidrogênio. Em razão disso, a glândula tireóide também está equipada com GPx-1 e GPx-4 para regular o conteúdo de peróxido de hidrogênio presente, o qual é necessário mas potencialmente perigoso (Duntas 2006; Flohe *et al.* 2000; Kohrle 1999). Além disso, o processamento do pró-hormônio, tetraiodotironina (T4) para a forma ativa, triiodotironina (T3), é catalisada por selenoproteínas 5'-deiodinase I e 5'-deiodinase II, duas enzimas distribuídas de forma complementar para regular o suprimento de T3 em tecidos alvos, como fígado, rins e na própria tireóide (Flohe *et al.* 2000). Em função disso, o elemento selênio é essencial para a função normal da tireóide. Situações que causam deficiência de selênio e iodo constituem uma das causas do cretinismo mixedematoso (Beckett e Arthur 2005; Birringer *et al.* 2002; Duntas 2006; Flohe *et al.* 2000; Kohrle 1999).

2.4. Selenofosfato sintetases

Essas enzimas catalisam a reação entre seleneto e AMP, produzindo selenofosfato. Esse composto serve como doador de selênio para a biosíntese de selenocisteína. A selenofosfato sintetase 2 humana possui uma selenocisteína no seu centro ativo enquanto a enzima tipo 1 possui uma treonina; mas a razão dessa diferença permanece desconhecida. A detecção de selenoenzimas envolvidas na produção de selenoproteínas é importante para o entendimento da regulação do metabolismo desse elemento em mamíferos (Papp *et al.* 2007).

2.5. Outras selenoproteínas

Algumas selenoproteínas eucarióticas ainda permanecem pouco estudadas. Algumas foram apenas descobertas por análises *in silico* usando a seqüência consenso SECIS e mostraram-se realmente possuir a natureza selenoprotéica em estudos de expressão (Biringier *et al.* 2002).

2.5.1. Selenoproteína P

A selenoproteína P, uma glicoproteína de 43 kDa, é a segunda maior selenoproteína do plasma e contém 12 resíduos de selenocisteínas, bastante sugestivos de seu envolvimento em função antioxidante, transporte de selênio no sangue e atuação como queladora de metais pesados. Até a descoberta dessa proteína, conheciam-se apenas selenoproteínas contendo um resíduo de selenocisteína por subunidade (Burk *et al.* 2003; Papp *et al.* 2007; Saito e Takahashi 2002). A selenoproteína P mostrou possuir a capacidade de reduzir peroxinitrito em

forma similar a outras selenoproteínas, selenóis e selenoéteres de baixa massa molecular. Posteriormente verificou-se uma ação protetora conferida por essa enzima contra o dano oxidativo causado pelo hidroperóxido de tert-butila em hepatócitos de camundongo, assim como pelo herbicida diquat, um gerador de ânion superóxido (Steinbrenner *et al.* 2006b). Essa proteína é produzida no fígado e lançada na circulação intra-hepática e sistêmica em uma forma glicosilada, em que liga-se a proteoglicanos da superfície celular com função de proteger o endotélio vascular contra a produção local de oxidantes (Birringer *et al.* 2002). Estudos recentes sugerem que essa proteína realmente desempenhe funções antioxidantes e confirmam sua intensa expressão em alguns grupos de células neurais, nos quais é responsável pela liberação de selênio para os neurônios (Papp *et al.* 2007; Scharpf *et al.* 2007; Steinbrenner *et al.* 2006a). O papel da selenoproteína P no cérebro parece realmente fundamental, uma vez que camundongos GPx-1 (-/-) não mostram déficits neurológicos espontâneos enquanto camundongos SePP (-/-) apresentam convulsões espontâneas, distúrbios do movimento e uma grande redução da atividade da GPx e TRx no cérebro (Burk *et al.* 2003; Hill *et al.* 2004; Papp *et al.* 2007).

2.5.2. Selenoproteína W

A selenoproteína W é uma proteína de baixa massa molecular (menor que 10 kDa) predominantemente distribuída no citoplasma, embora uma pequena parcela seja encontrada ligada à membrana celular, relacionada principalmente com a função muscular. É altamente expressa no músculo esquelético e miocárdio de primatas e ovelhas, mas não no miocárdio de ratos, o que é intrigante. Também é expressa no cérebro, testículos e baço, entre outros tecidos e em especial durante a implantação e gastrulação no desenvolvimento embrionário (Papp *et al.* 2007). Uma de suas isoformas possui alta afinidade pela ligação de GSH, indicando uma possível função antioxidante. Reforçando essa idéia, a proteína é expressa em altos níveis em mioblastos durante a proliferação, conferindo uma resposta imediata ao tratamento com agentes oxidantes, protegendo o músculo em crescimento e diferenciação contra o estresse oxidativo (Jeong *et al.* 2002; Loflin *et al.* 2006; Whanger 2000). Outros estudos mostram que essa proteína é o alvo molecular para toxicidade do metilmercúrio em neurônios (Kim *et al.* 2005). Além disso, também é encontrada no cérebro, onde atua na homeostase metálica, indicando que sua função não deve restringir-se a atividade muscular, dado que células gliais com superexpressão dessa proteína tornam-se fortemente resistentes a peroxidação lipídica (Behne e Kyriakopoulos 2001; Birringer *et al.* 2002; Papp *et al.* 2007).

2.5.3. Selenoproteína de 15 kDa

A selenoproteína de 15 kDa é membro de uma superfamília de proteínas semelhantes a tioredoxina com função de dobramento protéico, altamente homóloga a disulfeto isomerase do retículo endoplasmático. É expressa em diversos tecidos em resposta aos níveis plasmáticos de selênio, mas sua grande quantidade encontrada na próstata é notável (Papp *et al.* 2007). Além disso, alguns estudos mostram que pacientes com câncer de próstata apresentam mutações no gene *Sel15* localizado no cromossomo 1 (Behne e Kyriakopoulos 2001).

2.5.4. Selenoproteína de 18 kDa

É uma proteína encontrada em vários tecidos de ratos, contém um resíduo de selenocisteína e está presente em alta concentração na membrana mitocondrial. Embora seu papel biológico ainda não seja conhecido, na hierarquia de proteínas prioritárias em caso de redução do selênio corpóreo, a selenoproteína 18 kDa ocupa o primeiro lugar (Behne e Kyriakopoulos 2001).

2.5.5. Selenoproteína N

A selenoproteína N é uma glicoproteína transmembrana de 65 kDa, localizada no retículo endoplasmático, encontrada em vários tecidos tais como pâncreas, ovário, próstata e baço, descoberta inicialmente por análise *in silico*. Sua função ainda não está esclarecida e por ser encontrada em praticamente todos tecidos, torna-se mais complicado elucidar um papel específico. Na verdade, mutações no gene codificante dessa proteína são responsáveis pela distrofia muscular da espinha rígida e mais três distúrbios da função muscular, agrupados recentemente como miopatias ligadas ao gene *Sepr1*. Embora em humanos a expressão dessa selenoproteína esteja reduzida durante a diferenciação para células musculares, em peixe-zebra sua expressão está aumentada durante as miogênese (Behne e Kyriakopoulos 2001; Deniziak *et al.* 2007; Papp *et al.* 2007). É altamente expressa durante o desenvolvimento embrionário de camundongos e seus níveis estão consideravelmente aumentados em linhagens de tumores de próstata humano e murino (Papp *et al.* 2007).

2.5.6. Selenoproteínas menos conhecidas

A selenoproteína M possui um resíduo de selenocisteína na porção aminoterminal, sugestivo de envolvimento em função redox. É expressa em altas quantidades no cérebro humano e sua localização subcelular situa-se na região perinuclear. A selenoproteína R é uma R-metionina sulfóxido redutase requisitada para o reparo de proteínas oxidadas, bastante encontrada em neurônios cerebelares e na

região CA1 do hipocampo, com função importante no envelhecimento e no controle do fluxo de potássio, em razão da regulação dos canais de potássio por oxidação de resíduos de metionina. A selenoproteína K é uma proteína expressa predominantemente no músculo esquelético e miocárdio, onde está envolvida na proteção dos cardiomiócitos contra o estresse oxidativo. A selenoproteína S foi inicialmente clonada a partir de ratos diabéticos e está envolvida em processos inflamatórios e doenças cardiovasculares. Ainda figuram entre as futuras contribuições na área, as selenoproteínas T, X, Z, H, O, I, K, V (Behne e Kyriakopoulos 2001; Dikiy *et al.* 2007; Flohe *et al.* 2000; Novoselov *et al.* 2007; Papp *et al.* 2007).

2.6. Selenoproteínas e a síntese de compostos organoselenados de interesse terapêutico.

As atividades biológicas do selênio são inúmeras, complexas e apresentam uma regulação extremamente delicada. As funções fisiológicas exercidas por esse elemento não poderiam ocorrer de forma tão harmoniosa se fossem desempenhadas simplesmente pelo elemento por si ou por compostos organoselenados de baixa massa molecular. Desse modo, a função endócrina, a manutenção da imunidade normal, os efeitos cardiovasculares, a ação anticâncer, a essencialidade do selênio para a fertilidade e a regulação da proliferação celular são desempenhados por selenoproteínas. Em razão disso, a farmacologia sempre inspirou-se na ação das selenoproteínas com o objetivo de desenvolver compostos que pudessem mimetizar a ação dessas proteínas, notadamente a propriedade catalítica, ou agentes que pudessem interferir na regulação dessas enzimas.

Um dos mais proeminentes interesses dos farmacologistas sempre foi o desenvolvimentos de moléculas contendo selênio com ação antioxidante capazes de mimetizar a ação do selênio no ciclo catalítico da GPx, uma vez que os compostos organoselenados são agentes nucleofílicos mais potentes que as moléculas antioxidantes clássicas (Sies 1993). Até hoje, centenas de estruturas organoselenadas foram desenvolvidas para tornarem-se agentes miméticos da GPx (Nogueira *et al.* 2004). Uma vez que o estresse oxidativo está envolvido nos processos inflamatórios, na resposta viral, nas doenças neurodegenerativas e na carcinogênese, essas moléculas com ação antioxidante também foram avaliadas quanto a esses efeitos farmacodinâmicos (Mugesh *et al.* 2001a; Parnham e Graf 1991; Sakurai *et al.* 2006; Valko *et al.* 2007).

Além de mimetizar a ação das selenoproteínas, agentes sintéticos que possam modular a ação desses mediadores biológicos da ação do selênio são candidatos a potenciais fármacos. Exemplificando, a relação entre TRx e a progressão da

proliferação celular é alvo para o planejamento de compostos organoselenados com ação antiproliferativa. A molécula organoselenada mais promissora nesse âmbito é o composto (1,2-[bis(1,2-Benzisoselenazolona-3(2H)-cetona)]etano, conhecido como BBSKE, o qual é ativo contra uma série de tumores in vitro (Lan *et al.* 2007; Shi *et al.* 2003; Urig e Becker 2006; Zhao *et al.* 2006).

3. Biodisponibilidade e metabolismo do selênio

3.1. Biodisponibilidade

O selênio tem sua entrada na cadeia alimentar por meio das plantas, as quais captam esse elemento químico do solo e o fixam-se na forma de compostos inorgânicos e orgânicos. Sendo o solo, a fonte primária de selênio nos alimentos, os níveis do elemento em plantas e animais variam muito e respondem principalmente a mudanças na distribuição geográfica (Birringer *et al.* 2002; Reilly 1998; Whanger 2002). Ao redor do mundo, existem regiões em que a concentração de selênio é extremamente baixa, como o deserto australiano, nordeste da China, norte da Coréia do Norte, região central sul da China, Nepal e Tibet (Abdulah *et al.* 2005; Rayman 2000). A população residente em localidades de solo pobre em selênio possuem uma aporte extremamente reduzido desse elemento. Por exemplo, nepaleses apresentam uma ingesta diária de 23 µg do elemento, os chineses apresentam 26 µg/dia e em algumas regiões a ingesta é menor que 10 µg/dia. É importante notar que nas regiões de baixo conteúdo de selênio na dieta existe uma incidência elevada da doença de Keshan, doença de Kashin-Beck e câncer (Abdulah *et al.* 2005; Rayman 2000; Whanger 1989; 2004). Em contrapartida, na Rússia, Venezuela e nos Estados Unidos encontramos solos com concentrações muito elevadas do elemento (Letavayova *et al.* 2006; Rayman 2000; 2005).

O conteúdo de selênio das plantas é função do solo e metabolismo vegetal. Por exemplo, as espécies do gênero *Astragalus* podem acumular quantidades extremamente elevadas, variando de 1000 a 10000µg Se/g, enquanto tomates e pepinos contêm 6µg Se/g mesmo quando crescidos em solos seleníferos (Spallholz 1994; Whanger 1989). No Brasil, a castanha do Pará e as nozes constituem uma boa fonte de selênio, podendo conter até 50 mg/Kg, cerca de 100000 vezes os níveis encontrados na maioria dos outros alimentos (Longtin 2003; Reilly 1998).

A recomendação de ingesta diária nos Estados Unidos, em 1989, sugeriu 70 e 55 µg/dia para homens e mulheres, respectivamente, sendo 350 µg/dia o limite máximo aceitável. Posteriormente, a recomendação diária foi reduzida para 55 µg/dia para adultos saudáveis. Efeitos da intoxicação por selênio, notadamente na função pulmonar, renal e na epiderme, podem ser observados com 1540-1600 µg diários. Na

faixa de 3200-5000 µg/dia o quadro é definido como selenose. Por outro lado, a quantidade mínima requerida está situada em 40 µg/dia e em níveis abaixo de 11 µg/dia tornam-se evidentes os sintomas da deficiência de selênio (Flohe *et al.* 2000; Reilly 1998; Whanger 2002; 2004).

O mais fascinante em relação aos efeitos biológicos do selênio refere-se a sua potência. As concentrações relacionadas com a deficiência e intoxicação desse micronutriente são muito próximas, diferindo entre si numa proporção menor que 100 vezes. Na forma de selenito ou selenometionina, funções de nutriente essencial são compatíveis com níveis em torno de 0,1 ppm na dieta enquanto níveis tóxicos são atingidos a 8 ppm (Rayman 2005; Whanger 2002).

Dessa forma, o mais importante na investigação da atividade biológica do selênio é avaliar a expressão do metalóide em uma grande variedade de compostos químicos (Vadhanavikit *et al.* 1987). Assim sendo, em diversas formas químicas, inorgânicas ou orgânicas, de ocorrência natural ou sintéticas, estruturas dotadas de selênio foram avaliadas para diversas atividades farmacológicas. Interesse especial foi destinado para as formas orgânicas dotadas deste elemento ligado covalentemente, pois não disponibilizam este átomo e portanto não aumentam os níveis intracelulares do elemento, afastando o risco de intoxicação (Mugesh *et al.* 2001a).

3.2. Ocorrência e metabolismo em animais

Em 1970, Klaus Schwarz e Arne Fredga, estudaram uma série de compostos orgânicos de selênio não tóxicos e nutricionalmente eficazes na prevenção da necrose hepática dietária, modelo animal pelo qual o papel essencial do selênio foi demonstrado em 1957. O “fator 3”, isolado a partir de extrato de rim murino, foi mais eficaz que selenito na prevenção da necrose dietária hepática. Esse fator 3 permitiu a identificação de um forma orgânica de baixo peso molecular de selênio, o primeiro selenocomposto de mamífero a ser identificado: a selenocisteína (Flohe *et al.* 2000; Spallholz 1994).

Os animais podem sintetizar diversos metabólitos durante a conversão de selênio inorgânico em formas orgânicas e vice-versa, através de duas rotas metabólicas distintas: a via de metilação e via de redução.

As formas inorgânicas, como o selenito e selenato são reduzidos em reação com tióis intracelulares, principalmente glutatona, e redutases dependentes de NADPH e independentes de oxigênio. O produto final destas reações, a selenodiglutatona é convertida em persulfeto de selenoglutatona, o qual sofre ação das TRx para produzir um composto central nesse metabolismo, o seleneto de hidrogênio (ou íon seleneto). A redução do selenito de sódio para produção de

seleneto de hidrogênio e/ou selênio elementar por meio de reação redutora está intimamente ligada à geração de ânion superóxido. É importante salientar que os rins realizam a eliminação do excesso de selenato plasmático do organismo pela urina (Abdulah *et al.* 2005; Ganther e Lawrence 1997; Gromer e Gross 2002).

A selenometionina proveniente da dieta é a principal forma orgânica de entrada do selênio no organismo. As células não conseguem distinguir entre metionina e selenometionina no momento da síntese protéica. Em razão disso, o selenoaminoácido pode ser incorporado erroneamente em uma série de proteínas corpóreas, como a albumina, por exemplo. A selenometionina pode originar selenocisteína por meio de uma reação de transulfuração, a qual pode originar seleneto de hidrogênio. Além disso, a selenocisteína, outra molécula organoselenada que pode ser obtida da alimentação, pode ser transformada em selenometilselenocisteína e seu selenóxido correspondente por meio de uma reação enzimática catalisada pela α,γ -metionina liase, também conhecida como metioninase. Essa selenometilselenocisteína não é incorporada em proteínas sendo portanto convertida diretamente em metilselenol por meio de uma β -liase. Além da dieta, os processos de proteólise também são consideráveis fontes de aminoácidos selenados. A selenocisteína pode ser sintetizada no organismo a partir de selenofosfato, uma molécula produzida a partir de seleneto de hidrogênio por ação da enzima selenofosfato sintetase (Gromer e Gross 2002; Suzuki *et al.* 2007).

Outro ponto chave no metabolismo do selênio em mamíferos é o metilselenol. Esse composto pode ser metilado por tiol-S-metiltransferases e produzir diferentes formas químicas. O metilselenenato e seu produto de oxidação, metilseleninato, são eliminados na urina em situações de elevação do conteúdo de selênio no organismo. A medida que a concentração de selênio eleva-se, a formação de seleneto de dimetila, uma forma contendo dois grupamentos metil, aumenta para promover a eliminação de selênio pela ventilação pulmonar, a qual é responsável pelo forte hálito de alho durante a selenose. Em situações de concentrações extremamente elevadas, ou quando a ventilação pulmonar torna-se insuficiente na desintoxicação do organismo, a forma trimetilada- o trimetil-selenônio- é eliminado na urina ou oxidado a selênio elementar com concomitante geração de ânion superóxido. O metilselenol também pode ser formado pela metilação do seleneto de hidrogênio como parte da via excretora de selênio do organismo. Outras formas de eliminação urinária são representadas pelos selenoaçúcares, notadamente a 1- β -metilseleno-N-acetil-D-galactosamina, as formas mais promissoras de diagnóstico da intoxicação por selênio (Gromer e Gross 2002; Kuehnelt *et al.* 2007; Letavayova *et al.* 2006; Rikiishi 2007; Suzuki *et al.* 2007; Yan e Spallholz 1993).

Alguns compostos organoselenados são conhecidos precursores de formas monometiladas contendo selênio. A selenobetaína pode perder um grupamento metil e formar metilselenol. O éster de metilselenobetaína transforma-se em seleneto de dimetila diretamente, assim como o selenóxido de dimetila (Abdulah *et al.* 2005; Ganther e Lawrence 1997; Ip 1998).

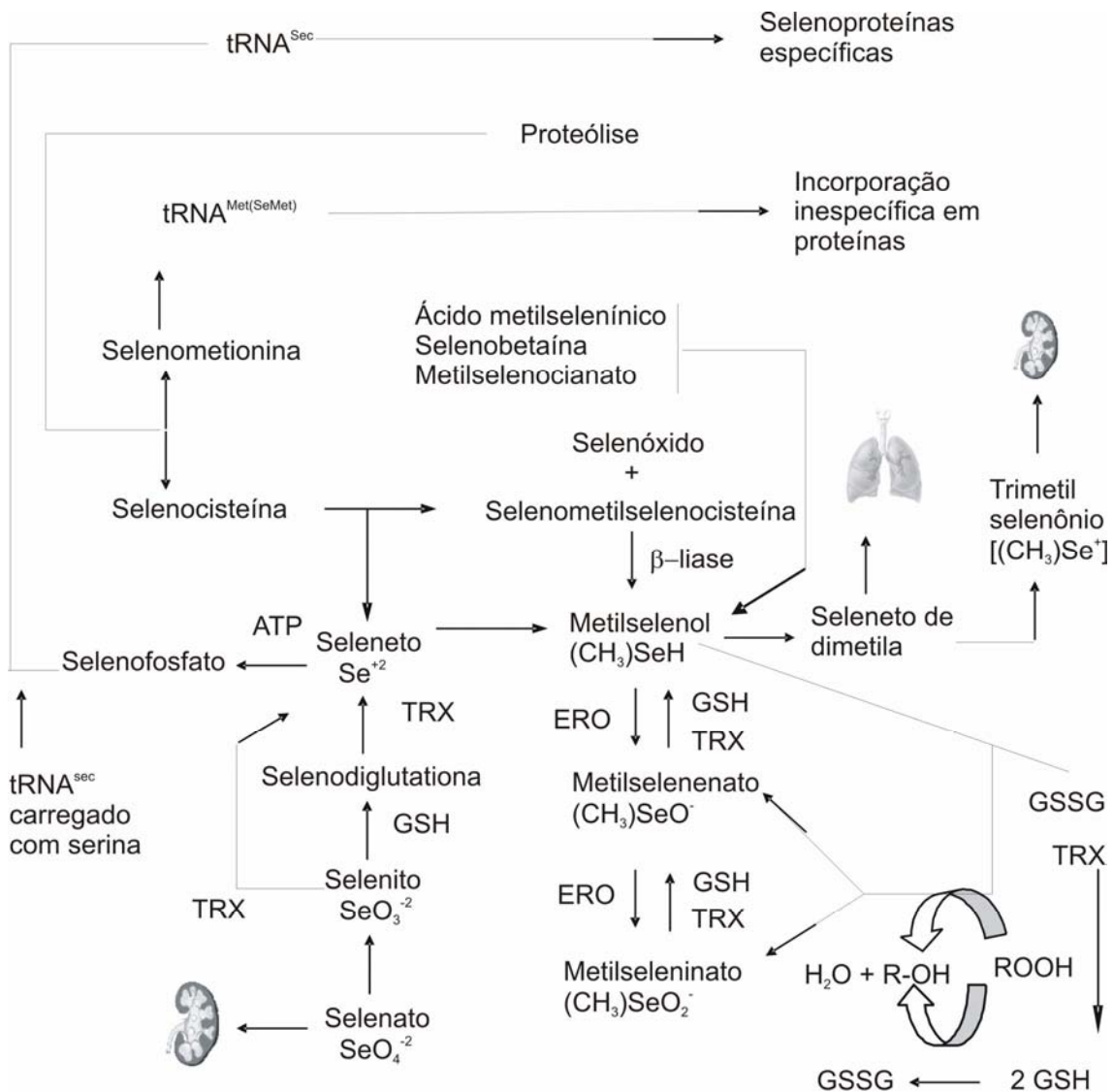


Figura 4. Principais rotas do metabolismo de selênio em mamíferos (Adaptado de Gromer e Gross, 2002).

4. Desenvolvimento da farmacologia dos compostos organoselenados: moléculas com ação antioxidante.

Alguns estudos epidemiológicos a respeito da correlação entre saúde e conteúdo de selênio da dieta de diversas populações, associados ao papel central do selênio em diversas enzimas com ação antioxidante e reguladora de ciclo celular inspiraram o desenvolvimento de compostos organoselenados, com objetivo de produzir estruturas químicas estáveis e menos tóxicas que as formas inorgânicas. A idéia do desenvolvimento dos compostos organoselenados baseou-se nos efeitos biológicos desempenhados por moléculas endógenas contendo esse elemento, como o aminoácido selenometionina e seus metabólitos, em associação com a ação das selenoproteínas (Mugesh *et al.* 2001a).

O primeiro composto sintético contendo selênio, o diseleneto de dietila, foi sintetizado em 1836 por Lowig. A natureza mal cheirosa do selênio, as dificuldades na purificação e a instabilidade de muitas estruturas derivadas, atrasou consideravelmente o desenvolvimento da bioquímica dos compostos organoselenados. As pesquisas na área intensificaram-se durante a década de 1970, em razão da descoberta de novas rotas de síntese. Desde então, tem havido um interesse crescente na síntese dessas moléculas bem como na investigação de suas ações biológicas. Nos últimos anos, um grande número de compostos foram estudados quanto a sua ação antioxidante, antitumoral, anti-infecciosa, anti-hipertensiva, cardiotônica, antiinflamatória, antinociceptiva, neuroprotetora, imunomoduladora, indutora de citocinas e como inibidores enzimáticos (Mugesh *et al.* 2001a; Nogueira *et al.* 2004; Parnham e Graf 1991; Soriano-Garcia 2004). Entre as ações mais investigadas nos últimos cinco anos, a ação antiproliferativa por indução de mecanismos de apoptose ou lesões nos ácidos nucléicos, a quimioproteção e a correlação entre essas atividades e a modulação do estado redox celular tem ocupado lugar de destaque.

A presença dos compostos organoselenados na farmacologia experimental dos dias atuais é marcante e tem sido elegantemente revisada por diversos autores (Mugesh *et al.* 2001a; Nogueira *et al.* 2004; Parnham e Graf 1991). A seguir, serão mostrados aspectos gerais da ação antioxidante, a qual é uma ação de especial interesse para o composto organoselenado estudado nesse trabalho, o diseleneto de difenila.

Várias moléculas contendo selênio foram estudadas em relação a seu potencial antioxidante, uma vez que alta massa molecular, instabilidade e baixa biodisponibilidade da GPx limitam o seu uso terapêutico. A molécula mais promissora nesse contexto é o composto heterocíclico ebselen (2-fenil -1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona), sintetizado em 1984, o qual desempenha ação antioxidante por diversos mecanismos, como a ação GPx-mimética, o seqüestro de espécies altamente reativas

de nitrogênio e a inativação de radicais livres gerados por enzimas como lipoxigenase, cicloxigenase e NADPH-oxidase (Parnham e Sies 2000; Sakurai *et al.* 2006; Sies 1993; Zhao e Holmgren 2002). Em razão de seus efeitos na manutenção do estado redox celular, essa molécula possui ação citoprotetora, neuroprotetora e antiinflamatória (Chang *et al.* 2003; Delanty e Dichter 2000; Kil *et al.* 2007; Nogueira *et al.* 2004; Schewe 1995). Em ensaios clínicos para tratamento de pacientes com déficits neurológicos secundários a hemorragia subaracnóidea e na isquemia cerebral aguda, ebselen mostrou resultados excelentes na prevenção do dano e morte neuronal (Imai *et al.* 2003; Saito *et al.* 1998; Yamaguchi *et al.* 1998). Além disso, nos últimos anos, verificou-se que essa molécula possui ação anticarcinogênica, sendo capaz de proteger o DNA contra danos oxidativos e induzir a morte celular em diversos tumores (Yang *et al.* 1999; 2000b). Posteriormente, descobriu-se que esse composto não possui apenas ação antioxidante, mas também um grande potencial pró-oxidante. Ebselen poder submeter a célula a um estado de estresse oxidativo por depleção de glutathiona sem reação de oxidação em presença de oxigênio (Yang *et al.* 2000c). O seu ciclo catalítico é bastante controverso, provavelmente devido a diferenças nas condições experimentais, como solventes, pH e a natureza dos hidroperóxidos empregados. Dessa forma, muitos grupos de pesquisa caracterizaram vários intermediários catalíticos em potencial (Mugesh *et al.* 2001b). Sabe-se também que as concentrações de tióis e de peróxido determinam o ciclo catalítico de ebselen (Back e Moussa 2003; Sarma e Mugesh 2005).

Ebselen serviu como protótipo para o desenvolvimento de análogos com maior atividade GPx-mimética e estudos de relação estrutura-atividade (Mugesh *et al.* 2001a; Mugesh *et al.* 2001b). A substituição de um hidrogênio por um grupamento nitro na posição orto em relação ao átomo de selênio aumenta a ação GPx *in vitro*, assim como a incorporação de um carbono tetraédrico no anel heterocíclico ou a inserção de pontes selênio-nitrogênio, formando um derivado selenamida. Em sentido contrário, a aromatização do anel homocíclico ou a inserção de grupo nitro na posição para em relação ao átomo de selênio inibe a ação antioxidante (Mugesh *et al.* 2001a). Dezenas de derivados do ebselen, incluindo derivados selenazolínicos, conjugados porfirínicos e moléculas contendo grupamentos N-acetil e N-etil, foram sintetizados e avaliados (Mugesh *et al.* 2001b; Nogueira *et al.* 2004; Xue *et al.* 2007).

Além de ebselen e seus análogos, algumas benzoselenazolinonas, fenilselenilcetonas, selenenamidas cíclicas, derivados selenofenólicos, selenamidias, fenilaminoetil-selenetos, fenilaminoetil-selenóxidos, derivados selenazonas, selenouréias, a enzima artificial selenosubtilisina e selenopeptídeos com atividade antioxidante foram desenvolvidos (Back e Moussa 2003; De Silva *et al.* 2004; Kumar *et*

al. 2007; Metanis *et al.* 2006; Mugesh *et al.* 2001a; Nogueira *et al.* 2004; Park *et al.* 2003; Ren *et al.* 2001; Savegnago *et al.* 2006a; Sekiguchi *et al.* 2006; Sun *et al.* 2005; Takahashi *et al.* 2005). A selenocistina possui uma atividade antioxidante importante, sendo capaz de proteger contra o dano oxidativo ao DNA *in vitro* (Aykin-Burns e Ercal 2006). Entretanto, essa molécula é bastante instável, fato que conduziu ao desenvolvimento de derivados selenazolidínicos capazes de liberar selenocistina no interior da célula (Short *et al.* 2003).

5. Selênio e formas organoselenadas na prevenção e tratamento do câncer

O envolvimento do selênio com o câncer é uma relação antiga e complicada. Em 1943, foi publicado um estudo mostrando um aumento na incidência de adenomas hepáticos em ratos alimentados com dieta selenífera. Esse experimento foi repetido em 1949 por Clayton e Baumann e posteriormente em 1972 por Harr. Nessas tentativas posteriores, não se verificou o mesmo resultado e além disso, selênio atuou como agente protetor no fígado. Uma re-avaliação dos resultados mostrou que no estudo de 1943 não existiam lesões neoplásicas verdadeiras, mas sim nódulos regenerativos em razão da hepatotoxicidade de altas concentrações de selênio inorgânico empregado. Dessa maneira, primeiramente, considerado um carcinógeno em potencial, o selênio pôde ser considerado um agente quimiopreventivo importante alguns anos depois (El-Bayoumy e Sinha 2004; Vernie 1984). A ação anticarcinogênica dos compostos organoselenados atua em dois níveis distintos: na quimioprevenção e no efeito citotóxico antiproliferativo.

A quimioprevenção refere-se a administração de agentes químicos, sintéticos ou de ocorrência natural, capazes de reduzir ou prevenir os eventos de iniciação (em nível de mutação) e/ou promoção que ocorrem durante o processo de desenvolvimento neoplásico. Os mecanismos da quimioprevenção dependem de diversas variáveis, como por exemplo, doses, via de administração, captação celular, interações químicas e biotransformação. A maioria dos agentes quimiopreventivos possuem muito mais que um simples alvo, sendo dotados de propriedades pleiotrópicas e atuando sobre múltiplos mecanismos. No último consenso, os mecanismos envolvidos nesses efeitos foram agrupados em 71 tipos (Ferguson *et al.* 2005).

A ação antiproliferativa, também conhecida como ação antitumoral, refere-se a erradicação das células malignas em função da inibição no desenvolvimento celular. Esse efeito é desempenhado por vários mecanismos atuantes em processos de sinalização intracelular, na homeostase tiólica, alteração na permeabilidade da membrana plasmática e mitocondrial e geração de lesões ao DNA. Esses fenômenos

são capazes de ativar os mecanismos de morte celular programada, em seus mais diversos tipos (Rikiishi 2007).

5.1. Evidências de estudos epidemiológicos

Após experimentos em que selenito de sódio foi capaz de reduzir o desenvolvimento de tumores de pele em ratos, Shamberger e Frost hipotetizaram que se selênio tem algum efeito na saúde da população, então áreas com ingesta adequada ou deficiente desse micronutriente deverão apresentar diferenças na incidência de doenças e no tipo de patologias mais freqüentes (Vernie 1984). As primeiras investigações em humanos foram realizadas na China, avaliando a incidência de carcinoma hepatocelular (Combs e Gray 1998). Os resultados desses estudos epidemiológicos mostraram que populações com uma baixa ingesta de selênio e reduzidos níveis plasmáticos desse elemento possuíam realmente uma incidência elevada de diversos tipos de câncer (Sinha e El-Bayoumy 2004; Vernie 1984). Os ensaios clínicos subsequentes, realizados na China, Índia, Itália e Estados Unidos, utilizaram diferentes formas químicas inorgânicas e orgânicas do elemento (El-Bayoumy e Sinha 2004; Mark *et al.* 2000). Um dos ensaios mais importantes foi realizado nos Estados Unidos, conduzido por Larry Clark, mostrando um efeito protetor de selênio contra câncer de próstata- redução de 63% na incidência - colon e pulmão (Clark *et al.* 1998; Duffield-Lillico *et al.* 2003; El-Bayoumy e Sinha 2004; El-Bayoumy *et al.* 2006). Os estudos de Clark estimularam estudos posteriores em relação a diversos tumores (Karp 2005; Klein *et al.* 2000; Meuliet *et al.* 2004; Rikiishi 2007). Além disso, vários estudos focalizaram-se no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na prevenção do câncer de próstata por selênio, avaliando marcadores de danos oxidativos, metabolismo de androgênios e níveis do antígeno prostático específico em indivíduos saudáveis. Os resultados positivos a respeito da redução dos danos oxidativos e níveis de antígeno prostático específico conduziram a três estudos maiores: o SELECT (*Selenium e Vitamin E Cancer Prevention Trial*) nos Estados Unidos, o PRECISE (*Prevention of Cancer by Intervention with Selenium*) na Europa e o APPOSE (*Australian Prostate Cancer Prevention Trial Using Selenium*) (El-Bayoumy *et al.* 2006; Hoque *et al.* 2001; Rayman 2000; Rikiishi 2007). Em todos estudos, comprovou-se: a suplementação com formas orgânicas do selênio tem ação quimiopreventiva contra tumores de próstata.

5.2. Visão geral dos mecanismos da ação anticarcinogênica

A história do efeito anticarcinogênico do selênio também é antiga; em 1915, Walker e Klein trataram pacientes com tumores de língua usando injeções localizadas

de selenito de sódio (Combs e Gray 1998). Em 1949, Clayton e Baunmann realizaram o primeiro estudo em modelos experimentais, mostrando que selênio era capaz de reduzir a incidência de tumores induzidos quimicamente em ratos (Vernie 1984). No entanto, por um longo período, o assunto não mereceu atenção dos pesquisadores. Somente em 1966, Shamberger e Rudolph investigaram o efeito do selenito de sódio aplicado topicamente em tumores de pele induzidos quimicamente em ratos. O resultado positivo estimulou a investigação posterior em numerosos modelos animais (Combs e Gray 1998; El-Bayoumy e Sinha 2004; Rikiishi 2007; Soriano-Garcia 2004)

Vários mecanismos tem sido propostos para explicar os efeitos quimiopreventivos e antitumorais dos compostos organoselenados. Algumas revisões críticas da literatura discutem-os exaustivamente (El-Bayoumy 2001; El-Bayoumy e Sinha 2004; El-Bayoumy *et al.* 2006; Flohe *et al.* 2000; Ganther 1999; Ip 1998; Rikiishi 2007; Soriano-Garcia 2004). Os mecanismos propostos devem explicar uma série de características, tais como: (i) selênio pode inibir tanto a carcinogênese química quanto viral; (ii) a inibição parece envolver tanto a iniciação tumoral quanto os eventos pós-iniciação; (iii) os efeitos parecem ser reversíveis. Claramente, um somatório de eventos moleculares deve ser considerado para explicar ações tão complexas.

Uma vez que o dano oxidativo ao DNA está comprometido com o efeito mutagênico e carcinogênico dos radicais livres, a ação antioxidante do selênio mediada pelas selenoproteínas, é um evento fundamental na quimioprevenção (Nakabeppu *et al.* 2006; Tsuzuki *et al.* 2007; Valko *et al.* 2004; Valko *et al.* 2007; Valko *et al.* 2006). Em contrapartida, em muitos estudos, as doses de selênio com efeito anticarcinogênico foram bem menores que as doses que induziram um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes. Outros estudos revelaram que a atividade das GPx possui níveis máximos em animais alimentados com as quantidades nutricionais de selênio e não sofre alteração quando a ingesta do micronutriente é aumentada em 10 vezes, quantidade necessária para a ação anticarcinogênica em modelos animais. Além disso, outras selenoproteínas também mostram níveis máximos em condições de ingesta normal e a atividade pode até ser reduzida com o aumento do aporte de selênio (Behne *et al.* 1992; Yang *et al.* 1989). O efeito anticarcinogênico das espécies selenadas é verificado também em animais com níveis plasmáticos normais do elemento, ou seja, com nível ótimo de expressão de selenoproteínas. De tal maneira, esses fatos indicam o envolvimento de outros mecanismos. E por fim, alguns compostos sintéticos, como o íon trifenilselenônio, não estimulam a síntese de selenoproteínas mas possuem efeito anticarcinogênico (Birringer *et al.* 2002).

As selenoproteínas também estão envolvidas na função imunológica, como mostrado pelo papel das GPx na sinalização inflamatória e pela diminuição da imunidade celular na deficiência desse elemento. Nesse mesmo sentido, os aumentos dos níveis plasmáticos de selênio estimulam a formação de anticorpos, a atividade dos linfócitos T citotóxicos e células matadoras naturais, assim como a indução da expressão do receptor de interleucina-2, aumentando a resposta inibitória à perpetuação de células transformadas (Birringer *et al.* 2002; Combs e Gray 1998).

A interferência de selênio e moléculas selenadas no metabolismo de uma série de carcinógenos foi amplamente estudada, a partir da observação da alta eficiência da ação anticâncer em modelos animais que empregavam carcinógenos requerentes de ativação metabólica (Combs e Gray 1998). Foram realizados experimentos utilizando tumores quimicamente induzidos por azoximetano (AOM), 7,12-dimetil-benzantraceno (DMBA), aflatoxina B1, 1,2-dimetilhidrazina, metilnitrosouréia (MNU), 2-acetilaminofluoreno, 3-metil-4-dimetil-aminobenzeno e bis-(2-oxipropil)-nitrosamina. Por exemplo, em ratos com dieta suplementada em selênio, a taxa de oxidação de AOM encontra-se bastante aumentada (Birringer *et al.* 2002). O tratamento com selênio também é capaz de reduzir a formação de adutos de DNA causado por aflatoxina B1 em galinhas (Chen *et al.* 1982). Em ratos, o metabolismo do 2-acetaminofluoreno é modificado de hidroxilação no anel aromático para N-hidroxilação pelo tratamento com o micronutriente (Combs e Gray 1998). A modulação do metabolismo de xenobióticos, por meio das enzimas de fase I e fase II do sistema do citocromo P-450 hepático e outras oxidases, modifica a resposta a carcinógenos em estudos experimentais, acelerando a desintoxicação e excreção da substância e assim contribuindo para o efeito anticâncer (El-Bayoumy e Sinha 2004).

Nos últimos anos, as investigações de natureza molecular permitiram razoáveis avanços no entendimento desses efeitos. Estudos a respeito de genes cuja expressão é modulada por tratamento com compostos selenados, usando a metodologia de microarranjos de DNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real, sugeriram genes e proteínas candidatos, especialmente aqueles envolvidos na regulação do ciclo celular e vias de sinalização, a serem estudados para a elucidação dos mecanismos moleculares e celulares de ação do selênio (Dong *et al.* 2003; El-Bayoumy *et al.* 2003; El-Bayoumy e Sinha 2005; Rikiishi 2007). Em especial interesse, a expressão de todas as selenoproteínas, o selenoproteoma, tem sido avaliada em diferentes condições biológicas (Hoffmann *et al.* 2007; Kryukov *et al.* 2003).

O aumento dos níveis plasmáticos do micronutriente propicia um aumento proporcional na atividade das TRx, as principais reguladoras do ciclo celular em mamíferos (Birringer *et al.* 2002). De fato, TRx é uma enzima superexpressa em

muitas formas de câncer, secretada pelas células malignas, estimulando o crescimento tumoral. Em muitas linhagens tumorais verifica-se a redução da expressão da GPx com paralelo aumento do nível de TRx (Powis *et al.* 1998). Alguns estudos *in vitro* provaram a inibição do sistema tioredoxina por compostos selenados, por diferentes mecanismos (Ganther 1999; Lan *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2006). Outros alvos moleculares incluem a proteína cinase C, os genes regulados pelos fatores de transcrição Gadd, Nfκ-B e AP-1, DNA citosina metiltransferase, além da ribonuclease, ribonucleotídeo redutase e a modulação da biosíntese de eicosanóides (Birringer *et al.* 2002; El-Bayoumy e Sinha 2004; Ip 1998; McKenzie *et al.* 2002; Rayman 2005).

A ingestão de selênio em nível pouco acima do normal previne a indução de apoptose por aumentar a atividade das GPx, enquanto níveis mais elevados são claramente pró-apoptóticos (Sinha e El-Bayoumy 2004). O efeito apoptótico está, ao menos em parte, ligado ao efeito pró-oxidante dos compostos dotados desse elemento. Além da perturbação da homeostase tiólica, a indução de morte celular ocorre por diversos processos. Por exemplo, selenometionina e selenocisteína são capazes de induzir apoptose em células tumorais em baixas concentrações por meio da redução da síntese de poliaminas e modulação da expressão de ciclinas (Chigbrow e Nelson 2001; Redman *et al.* 1998; Redman *et al.* 1997). O tratamento com selenometilselenocisteína conduz à ativação da caspase 3 em tumores epiteliais de camundongo *in vitro* enquanto o ácido metilselenínico ativa as caspases 1,3, 6-8, 10 e 12. Em células DU145, uma linhagem de câncer de próstata, a apoptose induzida por ácido metilselenínico é disparada principalmente pela caspase 8 (Zu e Ip 2003). Entretanto, compostos selenados também induzem morte celular independente da ativação de caspases, tal como o selenito de sódio em células de tumores de próstata (Rikiishi 2007). Além disso, determinadas formas orgânicas do selênio ativam a caspase 12, enzima residente no retículo endoplasmático. É imprescindível mencionar a redução dos níveis da selenoproteína de 15 kDa em tumores de fígado e próstata, desde que essa proteína está localizada no retículo endoplasmático, local onde atua no controle de qualidade do dobramento protéico (Labunskyy *et al.* 2005). Dessa maneira pode-se notar a participação de diversos mecanismos na morte celular induzida pelos compostos selenados, desde as vias mais abrangentes até a disrupção do microambiente do retículo endoplasmático participando na ação anticâncer dessas moléculas (Rikiishi 2007). Outros componentes importantes nesses processos são a modulação da expressão de receptores hormonais e ação a nível de sinalização por NF-κB e TNF-α (Hu *et al.* 2005a; Jiang *et al.* 2001; Rikiishi 2007; Sinha e El-Bayoumy 2004).

Desde 2004, a correlação entre a suplementação de selênio e o estímulo a sistemas de reparação de DNA vem sendo estudada. A primeira evidência concreta na literatura refere-se a ativação de p53 por selenometionina e conseqüente estímulo de algumas vias de reparação de DNA ou morte celular programada (Smith *et al.* 2004).

Os efeitos na angiogênese também devem ser considerados, pois são promissores e bem estudados. O metabólito metilselenol pode suprimir a expressão do fator de crescimento vascular VEGF e assim inibir a progressão tumoral (Jiang *et al.* 1999).

É importante também observar a alteração do estado redox de várias proteínas causada por moléculas organoselenadas, comprometendo sua função biológica. Altos níveis de selênio podem conduzir à formação de selenotrisulfeto envolvendo grupamento sulfidril de proteínas, inibindo assim a atividade de uma série de enzimas. Através deste mecanismo, selenito inibe a ação da ribonuclease pancreática bovina, do complexo da ácido graxo sintase e especialmente da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (El-Bayoumy e Sinha 2004).

Indiscutivelmente, as selenoproteínas são executoras biológicas importantes das funções do selênio para a saúde humana. Entretanto, o Dr. Dietrich Behne, cientista alemão, claramente mostrou que as concentrações das selenoproteínas são controladas de forma homeostática e não podem ser elevadas além de um certo valor máximo, mesmo com suplementação de selênio na dieta.

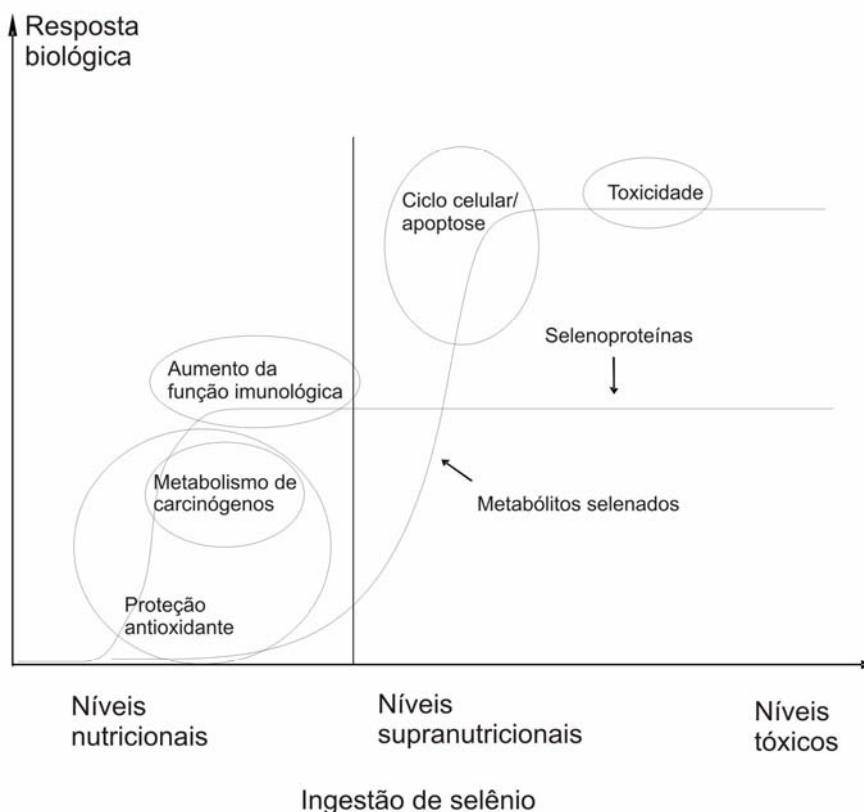


Figura 5. Mecanismos dos efeitos anticarcinogênicos do selênio (Adaptada de Combs e Grey 1998).

Dessa maneira, os efeitos quimiopreventivos, os quais são observados em concentrações supranutricionais desse elemento, não devem estar relacionados somente à ação das selenoenzimas. Esse efeito protetor está ligado a outras formas químicas do elemento e seus metabólitos. Em termos de doses e mecanismos envolvidos, a figura 5, elaborada por Dr. Gerald Coombs e Dr. William Gray resume os conhecimentos no assunto (Combs e Gray 1998).

5.2.3. Organoselenados sintéticos aromáticos

Karam El-Bayoumy foi o primeiro pesquisador a sintetizar compostos aromáticos contendo selênio com fins de prevenção do câncer, na década de 80. O primeiro produto foi o p-metóxi-benzenoselenol, o qual foi capaz de inibir tumores de fígado, cólon e rins de ratos tratados com AOM. No entanto, mesmo sendo menos tóxico, esse composto foi rapidamente abandonado e as atenções voltaram-se para o benzilselenocianato, em razão da sua potência em inibir tumores de estômago, colón e mama em modelos animais tratados com benzo[a]pireno, AOM e DMBA (Soriano-Garcia 2004). Embora o benzilselenocianato fosse menos tóxico e mais efetivo que o selenito de sódio, o seu odor extremamente forte e mal-cheiroso reduzia o consumo pelos animais, levando a uma considerável depressão no desenvolvimento em razão de desnutrição. Com fins de reduzir a volatilidade dessa molécula, um segundo grupo metileno-selenocianato foi introduzido, obtendo-se o 1,4-fenilenobis(metileno)selenocianato, comumente chamado de p-xililselenocianato ou simplesmente pXSC (el-Bayoumy *et al.* 1995).

O pXSC é o composto organoselenado com ação quimiopreventiva mais estudado no mundo. O tratamento com essa molécula inibe totalmente a ligação de DMBA ao DNA no tecido mamário, diminuindo a formação de adutos e consequentemente bloqueando o processo carcinogênico (el-Bayoumy *et al.* 1992). A administração de pXSC na dieta de camundongos também foi capaz de suprimir metástases pulmonares disseminadas a partir de melanomas. Além disso, esse composto é eficaz na prevenção de tumores experimentais de cólon, mama, pulmão e cavidade oral, tanto na fase de iniciação quanto pós-iniciação (El-Bayoumy 2001; el-Bayoumy *et al.* 2001; el-Bayoumy *et al.* 1995). Essa interessante molécula também inibe a carcinogênese induzida pela 4-(metilnitrosoamino)-(3-piridil)-1-bilitanona específica do tabaco em pulmões de camundongos (Fleming *et al.* 2001).

A eficácia do pXSC estende-se além dos tumores induzidos quimicamente; estudos recentes mostraram que esse composto suprime a formação de tumores

intestinais em camundongos geneticamente predispostos com polipose adenomatosa (Rao *et al.* 2000). Ainda não sabe-se se a ação anticarcinogênica depende unicamente da molécula ou de algum de seus metabólitos. Para realizar essa investigação, um conjugado de pXSC com glutatona foi desenvolvido: a N,N-[1,4-fenilenobis(metileno-selenotiol-1R-1-(carboximetil)aminocarbonil)]-2,1-etanedil]-bis-L-glutamina. Essa molécula é estável, apresenta menor toxicidade e mostra resultados excelentes em modelo experimental de tumores de cólon (Rao *et al.* 2001).

O pXSC é capaz de induzir apoptose em células em cultura por meio da indução de Fas, ativação da heme oxigenase e das vias de cinases envolvidas na resposta a estresse, tais como cinase aminoterminal de Jun, cinase de p38 e proteína cinase B (Fleming *et al.* 2001; Rikiishi 2007; Soriano-Garcia 2004).

Os compostos organoselenados aromáticos são menos tóxicos que as formas inorgânicas do elemento e possuem uma eficácia quimiopreventiva maior que os compostos organoselenados naturais, sendo portanto, excelentes candidatos para a prevenção de tumores em humanos (Abdulah *et al.* 2005). A forma orgânica contendo o elemento selênio é importante para a determinação da toxicidade e eficácia em estudos pré-clínicos. Uma investigação de relação estrutura atividade encontrou que o 1,2-fenilenobis(metileno)selenocianato tem uma potência em inibir a formação de adutos DMBA-DNA no tecido mamário murino maior que o 1,3-fenilenobis(metileno)selenocianato e pXSC, embora pXSC seja o menos tóxico da série.

5.2.4. Oxaseleninas, selenazinas e selenazolidinas

Três representantes dessa classe: 2,6-difenil-1,4-oxaselenina, 2-fenil-6-(4-metoxifenil)-1,4-oxaselenina e 2-fenil-6-(4-clorofenil)-1,4-oxoselenina possuem atividade citotóxica em células de câncer da cérvix uterina e ovário humanos em cultura. Os compostos 4-etil-4-hidroxi-2-p-toluil-5,6-dihidro-4H-1,3-selenazina e 4-hidroxi-4-metil-6-propil-2-p-toluil-5,6-dihidro-4H-1,3-selenazina apresentam forte atividade inibitória em diversas linhagens tumorais humanas (Soriano-Garcia 2004; Wu *et al.* 1999). As selenazolidinas contendo ácidos carboxílicos são pró-drogas capazes de liberar selenocisteína no meio intracelular após a abertura não-enzimática do seu anel com subsequente hidrólise. Uma série de 2-aril e 2-alkil selenazolidinas apresentam atividade quimiopreventiva contra tumores de pulmão induzidos quimicamente, tanto na fase pré-iniciação quanto pós-iniciação (Franklin *et al.* 2007).

5.2.5. Ebselen

O antioxidante ebselen, composto organoselenado mais estudado mundialmente, possui uma ação quimiopreventiva *in vitro* e *in vivo* em contra tumores hepáticos, por reduzir a formação de adutos entre alguns carcinógenos e o DNA e exercer uma forte ação antioxidante (Sinha e El-Bayoumy 2004; Yang *et al.* 2000a; Yang *et al.* 1999). Além disso, esse composto organoselenado heterocíclico tem forte ação antiproliferativa em cultura de hepatoma humano desempenhada pela depleção da glutatona intracelular (Yang *et al.* 2000b).

6. Por que estudar a genotoxicidade dos compostos organoselenados?

As células estão em constante interação com o meio externo (ambiente) e o meio interno, representado pelo fluido intersticial e tecidos adjacentes. As interações químicas entre as diversas substâncias exógenas e endógenas e lipídios, proteínas e ácidos nucleicos podem conduzir alterações da estrutura física dessas biomoléculas. Entre as biomoléculas, somente os ácidos nucleicos não são passíveis de substituição quando danificados, mas podem ser reparados. A fidelidade do processo de reparação de DNA é requisito fundamental para evitar que uma lesão física na estrutura da fita fixe-se no genoma na forma de mutação (Marnett e Plastaras 2001; Wogan *et al.* 2004).

Uma lesão a um ácido nucleico, denominada lesão genotóxica, corresponde a uma alteração na estrutura física da dupla hélice, perturbando as funções que necessitam da integridade conformacional do polímero, tais como a replicação e transcrição. Essas lesões são variadas e incluem quebras simples, quebras duplas, ligações cruzadas entre as fitas de DNA de moléculas diferentes, ligações cruzadas entre DNA e proteínas e DNA e lipídios, distorções na hélice, formação de dímeros, pontes intercadeias, alquilações das bases, perda de bases, desaminações, depurinações (comum nas altas temperaturas que ocorrem durante a inflamação sistêmica) e oxidações das bases, entre outras (Houtgraaf *et al.* 2006; Luch 2005; Marnett e Plastaras 2001; Pages e Fuchs 2002; Roos e Kaina 2006).

Imediatamente após o estresse genotóxico, as vias de sinalização ativadas pela presença do dano reduzem a velocidade de progressão do ciclo celular, com o intuito de favorecer a reparação do material lesado (Bartek e Lukas 2007; Houtgraaf *et al.* 2006). Quando a lesão é muito complexa e/ou muito numerosa, as vias de indução de morte celular programada eliminam a célula danificada da população (Houtgraaf *et al.* 2006). No entanto, algumas vezes, um sistema de reparação de DNA permite que a célula tolere o dano – síntese translesão de DNA - e embora não consiga corrigir a lesão eficientemente, garante a sobrevivência celular - ; desse modo, as lesões removidas de forma ineficiente acabam gerando a restauração imperfeita da

seqüência de nucleotídeos original, causando mutação gênica (Jeggo e Lobrich 2006). Em verdade, quando uma lesão genotóxica não é reparada antes da divisão celular, tem-se uma situação muito delicada, que frequentemente acarreta eventos recombinacionais, aberrações cromossômicas e instabilidade genômica como conseqüência da ação das DNA polimerases atuantes na síntese translesão. É importante considerar que os tecidos do organismo possuem diferentes capacidades de reparação das lesões ao DNA bem como graus diferenciados de suscetibilidade a agentes genotóxicos, fato que é uma conseqüência da capacidade de proliferação celular de cada tecido, do conteúdo hídrico e lipídico, da ploidia e do metabolismo (Bartek e Lukas 2007; Hanahan e Weinberg 2000; Houtgraaf *et al.* 2006; Karpinets e Foy 2005; Pages e Fuchs 2002).

Essas mutações gênicas podem atingir alvos críticos, como proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes envolvidos na reparação de DNA ou indução de apoptose, acarretando alterações no ciclo celular, acúmulo de mutações, mutações a nível de estrutura física dos cromossomos - mutação cromossômica - configurando um quadro de extrema instabilidade genômica, o qual desencadeia a transformação celular maligna, o primeiro evento do processo carcinogênico. As estratégias para erradicar as células tumorais são diversas, mas o postulado mais antigo da quimioterapia baseia-se nos mesmos mecanismos que atuaram como geradores do problema. Uma vez que as lesões genotóxicas podem perturbar a manutenção da integridade genômica e causar uma transformação maligna, o uso de drogas (e radiações) que causem lesões extensas ao DNA dessas células, as quais proliferam em maior ritmo que células sadias, pode induzir a morte celular programada e bloquear o desenvolvimento tumoral (Hanahan e Weinberg 2000; Hoang *et al.* 2007; Karpinets e Foy 2005; Leonetti e Zupi 2007; Marnett e Plasteras 2001; Roos e Kaina 2006; Williams 2001).

A prevenção à exposição a agentes genotóxicos e mutagênicos é o primeiro evento na proteção contra o câncer (Bolt 2003; Luch 2005; Williams 2001). Eis o primeiro objetivo em avaliar o potencial genotóxico de compostos organoselenados a que as populações estão expostas: segurança. Nas indústrias de síntese química, essas substâncias são utilizadas amplamente como reagentes nucleofílicos; nas indústrias de tintas e em processos eletroquímicos e principalmente no uso como suplementos alimentares sem estudos toxicológicos prévios.

No entanto, nas últimas décadas, a genotoxicidade de várias moléculas tem sido vista por um outro enfoque: agentes genotóxicos são capazes de inibir a proliferação celular por meio da indução de apoptose em resposta aos danos ao DNA. (Pages e Fuchs 2002; Tsao *et al.* 2004). A indução de morte celular na população

portadora de uma lesão ao DNA não é um fenômeno simples e casual, consequente da inativação do genoma. Pelo contrário, esse evento é mediado por complexas reações enzimáticas, que podem conduzir aos vários tipos de morte celular, como necrose, apoptose, catástrofe mitótica entre outras (Roos e Kaina 2006). Obviamente, o DNA não é o único alvo na morte celular induzida por agentes genotóxicos, mas o dano genotóxico é uma das principais causas do processo (Aubrecht *et al.* 1999; Kaina 2003).

A ação genotóxica e desencadeadora do processo apoptótico por drogas organoselenadas estão baseadas na perturbação do estado redox celular, das seguintes maneiras: (i) geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) por meio de reação com tióis biológicos; (ii) depleção do conteúdo tiólico sem aumento da taxa de oxidação, ou seja, depleção por formação de adutos. Dessa maneira, a célula fica predisposta a um estado pró-oxidante, e radicais livres, notadamente as ERO, ativam a via apoptótica por instabilizar a membrana mitocondrial (Kim *et al.* 2003; Shen *et al.* 2000; Stewart *et al.* 1999). Além disso, no núcleo, esses radicais livres lesam os ácidos nucleicos, oxidando bases e gerando quebras nas fitas de DNA. O acúmulo de quebras duplas das fitas de DNA é um estímulo sinalizador importante para a morte celular (Drake 2006; Roos e Kaina 2006; Zhou *et al.* 2003).

O selenito de sódio causa quebras no DNA em presença de oxigênio em vários tipos celulares, desempenhando um efeito antiproliferativo (Sinha e El-Bayoumy 2004). Em altas concentrações, o efeito pró-oxidante desse composto inorgânico de selênio induz considerável dano oxidativo ao DNA, o que causa apoptose em algumas linhagens tumorais (Chung *et al.* 2006; Nilsonne *et al.* 2006; Sinha e El-Bayoumy 2004; Zhou *et al.* 2003). De tal forma, o efeito quimiopreventivo do selenito está ligado, ao menos em parte, ao seu efeito pró-oxidante e genotóxico.

O efeito pró-oxidante também participa da ação antiproliferativa da selenodiglutationa, que reage com glutathione e gera peróxido de hidrogênio nessas condições. Em 1992, Kralick patenteou a injeção de selenodiglutationa como tratamento terapêutico (Sinha e El-Bayoumy 2004; Spallholz 1994).

Os diselenetos, aromáticos ou não, podem produzir espécies reativas de oxigênio, principalmente ânion superóxido, em reação com glutathione através de um ciclo redox conhecido como ciclagem redox dos diselenetos, descrito por Claudière e colaboradores (Spallholz 1994). Na realidade, esse ciclo aplica-se a todos compostos que possam gerar o ânion selenil por reação com tióis biológicos. O seleneto de hidrogênio, quando produzido em elevadas concentrações, pode gerar radicais livres nesse mecanismo de ciclagem redox com selenito, dióxido de selênio, selenocistina, selenocistamina, ácido metilselenínico, ácido diselenopropiônico, diseleneto de

dibenzila, diseleneto de simetila, 6-propil-selenouracil e vários diselenetos sintéticos, mas não reage dessa maneira com selenato, selenometionina, selenometilselenocisteína, selenobetaína, selenopiridina, selenocianato, selênio elementar e o íon trifenilselenônio .

A selenoalquilselenocisteína também causa quebras de DNA, detectadas como sítios álcali-lábeis, em células epiteliais mamárias de camundongo nas concentrações em que induz apoptose (Zhu *et al.* 2000). O ácido metilselenínico também é capaz de reagir com a glutathione e aumentar a produção intracelular de ânion superóxido, responsáveis pelas lesões observadas ao material nuclear em cultura de hepatoma humano (Shen *et al.* 2002). Reforçando as observações descritas, em queratinócitos de camundongos, selenocistamina é capaz de aumentar as lesões oxidativas ao DNA nas mesmas concentrações com efeito antiproliferativo (Sinha e El-Bayoumy 2004).

Alguns compostos organoselenados não geram radicais livres por si no interior celular, mas são fortes indutores de apoptose por diminuírem os níveis de glutathione reduzida, predispondo a célula ao estado pró-oxidante, como mencionado anteriormente. O exemplo mais conhecido é o tratamento com ebselen em elevadas concentrações em culturas de hepatoma humano (Yang *et al.* 2000b; 2000c).

Muitos dos efeitos em nível de ciclo celular podem ser explicados pelas características pró-oxidantes dessas moléculas, desde que o aumento da oxidação de GSH produz altos níveis de GSSG, o qual ativa a proteína cinase que inativa o fator 2 de iniciação da tradução, causando um prejuízo na síntese de proteínas em eucariotos. Além disso, o metabólito altamente reativo selenodiglutathione é capaz de inibir diretamente fatores de alongação do processo de tradução no ribossomo eucarioto (Combs e Gray 1998).

Um mecanismo refinado para a ação antiproliferativa dos compostos dessa natureza é considerar a sua influência nos processos de reparação de DNA, os quais estão amplamente ligados a progressão do ciclo celular. Nesse campo, pouco sabe-se ainda, mas é fato que selênio e seus derivados influenciam no estado redox de uma série de proteínas envolvidas na sinalização celular dos danos ao DNA, tais como p53, p21, AP-1 e NF- κ B (Abul-Hassan *et al.* 2004; El-Bayoumy e Sinha 2005; Sinha e El-Bayoumy 2004; Soriano-Garcia 2004).

A primeira evidência a respeito da interferência na reparação de DNA por compostos contendo selênio é de 1980, quando Russel e colaboradores observaram que selenito de sódio, selenato de sódio e selenometionina induziam síntese e reparo de DNA em hepatócitos (Russell *et al.* 1980). Em 1983, um interessante estudo avaliou a reparação de quebras simples ao DNA induzidas por N-nitrobis-(2-

oxopropil)amina no pâncreas, fígado e cólon de camundongos alimentados com uma dieta enriquecida com selenito de sódio. Os resultados indicaram uma reparação mais rápida e eficaz em animais com suplementação de selênio na dieta, mostrando assim que os compostos contendo esse metalóide poderiam modular a genotoxicidade de diferentes mutágenos (Lawson 1989; Lawson e Birt 1983). A participação da glutathiona nos efeitos dos selenocompostos em nível de metabolismo de DNA também é importante: o potencial genotóxico do selenito de sódio em fibroblastos em cultivo é aumentando quando a exposição é realizada concomitantemente com glutathiona reduzida, indicando que esse tripeptídeo pode ser necessário para a ativação do selenito de sódio para sua forma genotóxica. No entanto, o selenito de sódio não modula, nem aumentando nem inibindo, as lesões ao DNA induzidas por metilmetanosulfonato (MMS), radiação ultravioleta de 254 nm (UVC) nem bleomicina (Snyder 1987). Ensaios com linfócitos humanos e células de osteosarcoma tratados com selenito de sódio e posteriormente submetidos a um estresse genotóxico com radiação ionizante evidenciaram uma redução na capacidade de reparo pelas vias recombinacional e reparo acoplado a transcrição. Alguns outros estudos mostraram que a apoptose induzida por selenito de sódio envolve a ação das proteínas ATM/ATR e topoisomerase II, estando portanto intimamente ligada a lesão genotóxica (Zhou *et al.* 2003).

Ao contrário das formas inorgânicas, as quais induzem quebras simples e duplas na fita de DNA, selenometionina não é tóxica nem genotóxica. Além disso, em fibroblastos humanos normais em cultura, o tratamento com selenometionina protege contra lesões ao DNA, aumentando a formação e estabelecimento de complexos de reparação de DNA (Seo *et al.* 2002a). O mecanismo desse efeito quimiopreventivo começou a ser esclarecido recentemente (Fischer *et al.* 2006). Esse aminoácido contendo selênio é capaz de ativar a reparação de DNA pelo produto do gene p53 independentemente de estresse genotóxico, por meio de uma modulação redox em que p53 seria convertido a uma nova conformação pela reação de redução das cisteínas adjacentes nas posições 275 e 277 e rompimento de uma ponte dissulfeto, catalisada por Ref-1 (Fischer *et al.* 2006; Seo *et al.* 2002a; Seo *et al.* 2002b). Nessa forma, p53 não induziria morte celular e modularia os processos de reparação. Pelo fato desse composto organoselenado desempenhar um efeito na reparação gênica sem eventos tóxicos ou indução de danos aos ácidos nucléicos, a selenometionina passou a ser considerada um potencial agente terapêutico (Schwartz e Kmiec 2007). O ácido metilselenínico, uma fonte importante de selênio da dieta, é capaz de fosforilar três resíduos de treonina de p53, ao contrário das modificações observadas pelo tratamento com selenometionina. Dessa maneira, embora a modulação de p53 seja

um fator comum entre a ação biológica dos compostos organoselenados, existem mecanismos específicos para as diversas formas químicas contendo o elemento (Smith *et al.* 2004).

Embora ainda pouco estudada, a modulação de compostos contendo selênio na função biológica de proteínas contendo zinco oferece-nos importantes elucidações a respeito da ação do selênio em proteínas de reparação de DNA, uma vez que essa classe possui diversos representantes contendo o motivo dedos de zinco para ligação ao DNA. Alguns compostos selenados podem causar a oxidação e inclusive, a liberação do zinco dos motivos dedos de zinco (Witkiewicz-Kucharczyk e Bal 2006). Esse fenômeno foi observado primeiramente *in vitro* usando metalotioneína como proteína de experimentação enquanto para proteínas envolvidas na reparação de DNA, o fenômeno foi investigado utilizando-se a DNA formamidopirimidina glicosilase bacteriana, envolvida na reparo por excisão de bases, a qual teve sua atividade inibida pelo tratamento com ácido fenilselenínico, cloreto de fenilselenato, selenocistina, ebselen e 2-nitrofenilselenocianato (Hartwig *et al.* 2003). Os sítios contendo zinco apresentam alta reatividade para compostos redutores contendo selênio. Nesse sentido, o tratamento *in vitro* com drogas organoselenadas provoca a liberação do zinco da proteína do grupo A de xeroderma pigmentoso, essencial para o reparo por excisão de nucleotídeos em mamíferos (Hartwig *et al.* 2003).

O estudo da interação de compostos organoselenados com o material genético e os sistemas de manutenção da integridade genômica permite a avaliação do risco de exposição a essas moléculas, a descoberta de compostos com ação antiproliferativa e quimiopreventiva bem como contribuem para o entendimento, em nível molecular e celular, a respeito dos efeitos biológicos do selênio. As ações benéficas dos compostos organoselenados baseiam-se em alguns mecanismos primários: a ação antioxidante, prevenindo as lesões genotóxicas; a ação estimuladora em nível de sistemas de reparo de DNA, as quais evitam que a lesão genotóxica fixe-se no genoma como mutação; e por fim a indução de morte celular desencadeada pela lesão genotóxica, evitando a perpetuação de célula com alteração na fidelidade da informação genética.

7. O diseleneto de difenila, objeto desse estudo

O diseleneto de difenila (DPDS) é um composto organoselenado estável, importante intermediário em reações de síntese orgânica, em especial de drogas contendo selênio. Dessa maneira, essa molécula representa um potencial risco ocupacional para trabalhadores da indústria química (Rosa *et al.* 2004). Esse composto tem sido extensivamente estudado com intuito de desenvolvimento de

novos fármacos organoselenados e possui interessantes atividades farmacológicas e propriedades toxicológicas, as quais estão mostradas no capítulo I.

DPDS possui propriedades tóxicas, afetando uma série de processos neurais; recentemente mostrou-se que a administração subcutânea maternal em ratas durante o desenvolvimento pós-natal foi capaz de causar alterações comportamentais nas tarefas de labirinto em cruz elevado e habituação em campo aberto. Essas alterações indicam alterações em parâmetros de desenvolvimento físico e reflexológico em ratas e na prole, uma vez que o conteúdo de selênio no cérebro da prole foi aumentado pela amamentação (Favero *et al.* 2006). Essa molécula organoselenada também interage com o sistema gabaérgico no sistema nervoso central, evidenciada pela potencialização da ação convulsivante do pentilenotetrazol em camundongos (Brito *et al.* 2006; Prigol *et al.* 2007). No último ano, verificou-se que a ação pró-oxidante do DPDS está envolvida nas convulsões induzidas por esse composto organoselenado em ratos (Prigol *et al.* 2007).

Como exaustivamente exposto, as moléculas contendo selênio possuem um comportamento paradoxal em relação ao efeito no estado redox celular. Sendo assim, DPDS também apresenta importantes efeitos antioxidantes, com especial interesse em intoxicações exógenas. Resultados de estudos *in vitro* mostraram que DPDS é capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida por elevadas concentrações de oxalato em homogenatos de cérebro, fígado e rins murinos e pela intoxicação por cloreto de mercúrio, avaliada em homogenatos de fígado e rins de ratos (Perottoni *et al.* 2004; Puntel *et al.* 2007). Interessantemente, a administração de DPDS também protege contra o dano oxidativo induzido pela fumaça do cigarro em pulmão de ratos (Luchese *et al.* 2007b). Nessa direção, a administração oral desse composto também foi capaz de prevenir o dano oxidativo induzido por cádmio em pulmão, fígado e cérebro de camundongos (Borges *et al.* 2007; Luchese *et al.* 2007a). A ação antioxidante desse diseleneto previne a toxicidade induzida pela estreptozotocina, utilizada para indução de diabetes em ratos (Barbosa *et al.* 2007; Barbosa *et al.* 2006).

O conhecimento a respeito do mecanismo da ação antinociceptiva dessa molécula aumentou em 2007. As evidências mais recentes indicam que a modulação redox dos receptores e transportadores glutamatérgicos é parte importante do efeito, além da ação em nível de sistema monoaminérgico e nitrérgico. Esse efeito é bastante interessante, pois é capaz de atenuar a dor neuropática em camundongos em diversos modelos biológicos (Savegnago *et al.* 2007b; Savegnago *et al.* 2007c; Savegnago *et al.* 2007d; Savegnago *et al.* 2007e). Além disso, a ação antidepressiva dessa substância em ratos envolve a via da L-arginina-óxido nítrico-guanilato ciclase como principal sistema de sinalização celular (Savegnago *et al.* 2007a). A administração

intraperitoneal desse composto também previne as lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina em ratos, provavelmente como consequência da atividade antissecreatória por inibição da K^+ -ATPase (Savegnago *et al.* 2006b).

Em um estudo realizado usando suplementação com essa molécula organoselenada por via oral em concentrações 0,3, 3,0 e 30 ppm durante oito meses em coelhos, não detectou-se alterações em níveis de peroxidação lipídica em diversos órgãos assim como na atividade enzimática das defesas antioxidantes (de Bem *et al.* 2007). Em ratos, a toxicidade do DPDS avaliada durante uma administração subcrônica é mínima (Meotti *et al.* 2007).

8. Estratégias para estudo dos compostos organoselenados empregadas nesse estudo

8.1. Células V79

O cultivo de células constitui uma ferramenta de valor inestimável para pesquisa em diversos campos da área biomédica, facilitando a análise de propriedades biológicas e processos que não seriam facilmente realizados em nível de organismo intacto. A manutenção de células em cultura, sejam linhagens primárias ou imortalizadas, que cresçam aderidas a um substrato plástico ou em suspensão, requer conhecimento e prática de algumas poucas técnicas essenciais, ou seja, é um procedimento relativamente simples. Devido a essa praticidade, segurança e efetividade de ensaios, milhares de trabalhos utilizam esses sistemas experimentais (Doyle e Griffiths 1999; Helgason e Miller 2004; Zucco *et al.* 2004).

Até a metade dos anos 80, a tecnologia da cultura de células não era extensivamente empregada em toxicologia. Grisham e Smith, em 1984, em um estudo financiado pela comissão europeia fizeram uma interessante observação: “*Todo o potencial do sistema de cultivo de células de mamíferos para análise de toxicidade química ainda não está sendo executado na prática*”. Em verdade, somente após a segunda metade da década de 80, a toxicologia *in vitro*, como área científica, desenvolveu-se, com a criação e apoio da Sociedade Europeia de Toxicologia *In Vitro*, cujas atribuições eram regular as pesquisas na área, delimitar as normas éticas desses processos e desenvolver novas metodologias. A toxicologia *in vitro* investiga o efeito tóxico e os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos usando células em cultura. Essa área do conhecimento desenvolveu diversas estratégias para abordagem mecanística do efeito de drogas em células cultivadas, o que melhorou consideravelmente testes e procedimentos de validação toxicológicos de diversas substâncias, explorando a base celular e molecular da toxicidade e estudando as

modificações dos xenobióticos no ambiente celular. (Debnath e Brugge 2005; Doyle e Griffiths 1999; Helgason e Miller 2004; O'Brien *et al.* 2002; Zucco *et al.* 2004).

Nos últimos anos, sistemas *in vitro* para avaliação de toxicidade em órgãos, com fins de determinação de nefro-, hemato-, neuro- e hepatotoxicidade, foram desenvolvidos com o apoio da engenharia genética e biologia molecular, para aprimorar as investigações, facilitar a elucidação de mecanismos e minimizar a necessidade de estudos em animais (Ahuja *et al.* 2007; Bowtell 1999; Feng 2002; Le Ferrec *et al.* 2001; Mueller-Klieser 1997; Sambroy *et al.* 2001; Sanderson *et al.* 1996; Tiffany-Castiglioni *et al.* 1999; Wise 2002; Yeager e Reddel 1999; Zucco *et al.* 2004)

No campo da genética toxicológica, os ensaios em células em cultura permitem avaliar as lesões ao DNA assim como o potencial mutagênico e recombinogênico de qualquer substância com facilidade, rapidez, segurança e boa correlação aos resultados em estudos *in vivo*. De fato, os resultados obtidos nesses sistemas *in vitro* direcionam os ensaios *in vivo*, gerando bases racionais para a avaliação da necessidade da investigação, escolha modelo animal mais adequado e o teste a ser empregado, para predição teórica dos resultados e o mecanismo envolvido. No entanto, o alto nível de diferenças inter-espécies em processos metabólicos, não permite que os dados obtidos em animais possam ser extrapolados para humanos com certeza absoluta. Para isso, a comparação entre os resultados obtidos em animais e os resultados em células humanas em cultura, cuja disponibilidade aumentou consideravelmente na última década, pode providenciar bases para a seleção do ensaio em modelo animal mais adequado para testes de toxicidade de longa duração (Walmsley 2005; Zucco *et al.* 2004).

Os ensaios de mutagênese empregando células de mamíferos em cultura datam de 1968 e as primeiras linhagens celulares utilizadas para esse propósito foram os fibroblastos de pulmão de hamster chinês, conhecida como V79, e as células de ovário de hamster chinês (Bradley *et al.* 1981).

As células V79 possuem interessantes propriedades para ensaios de toxicologia genética: fácil cultivo e manutenção; crescimento rápido e curto período de adaptação; tempo de geração entre 12 e 16 horas e capacidade de iniciar um rápido crescimento exponencial a partir um pequeno inóculo. Além disso, possuem uma elevada eficiência de clonagem, em torno de 75-95%, pertencem ao gênero masculino e apresentam cariótipo estável (22 ± 1) (Bradley *et al.* 1981). Essas células recuperam-se rapidamente após estoque em nitrogênio líquido, o que permite criopreservação sem afetar suas características, e possuem uma baixa frequência de mutação espontânea (Bradley *et al.* 1981).

De tal forma, o emprego das células V79 em estudos de genotoxicidade é indiscutível. Para avaliação de lesões ao DNA utiliza-se principalmente o ensaio cometa enquanto para avaliação de potencial mutagênico, utilizam-se os ensaios de mutação empregando o locus da hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase ou da bomba de sódio e potássio. Uma pequena porcentagem de trabalhos avalia mutação utilizando marcas auxotróficas e prototróficas, mutações que conferem sensibilidade a temperatura e mutações medidas pela resistência a várias drogas. O ensaio de micronúcleo é empregado para avaliar quebras cromossômicas e essas células também são primeira escolha para o teste de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs (Kalweit *et al.* 1999; von der Hude *et al.* 2000).

Os elementos básicos de estrutura e reparação de DNA nas células V79 são similares, mas não idênticos, aos de células humanas. De tal maneira, as conseqüências da interação química de xenobióticos com o DNA seja de células humanas seja de células V79, é similar. Portanto, os resultados obtidos nessa linhagem são extremamente relevantes para humanos, sendo inclusive mais importantes que a extrapolação dos dados obtidos em procariotos (Bradley *et al.* 1981). Além disso, essas células podem ser adaptadas para uso com sistemas de ativação metabólica, simulando o metabolismo *in vivo* para detecção de pró-mutágenos (Scheuenpflug *et al.* 2005). Novas metodologias para ensaios de transformação celular tem sido desenvolvidas para permitir ensaios de promoção tumoral, com especial atenção para detecção de carcinógenos não-genotóxicos (Sakai *et al.* 2002).

As células V79 tem sido amplamente empregadas em estudos de diversas áreas, como estresse oxidativo (Kang *et al.* 2005; Kim *et al.* 2007), mutagênese e reparação de DNA (Baum *et al.* 2005; Campa *et al.* 2004; Deng *et al.* 2006; Gu *et al.* 2005; Hu *et al.* 2006; Jagetia *et al.* 2007; Ochi *et al.* 2004; Osada *et al.* 2005; Pathak *et al.* 2007; Rao *et al.* 2006; Schumacher *et al.* 2005; Slamenova *et al.* 2007; Snyder e Gillies 2002; Speit *et al.* 2007; Thielen *et al.* 2006), mecanismos da morte celular programada (Grosicka *et al.* 2005; Wang *et al.* 2007) e metabolismo (Bose Girigoswami *et al.* 2005; Bose *et al.* 2003; Miyagoshi e Fujikawa-Yamamoto 2006; Oda 2006).

8.2. Teste de micronúcleos

As anormalidades na estrutura do cromossomo são uma conseqüência direta do dano em nível de DNA. Por exemplo, as quebras cromossômicas podem resultar de quebras duplas de DNA não reparadas e os rearranjos cromossômicos, do reparo incorreto de quebras na fita de DNA. A perda de cromossomos e os erros de

segregação são eventos importantes na carcinogênese, causados principalmente por defeitos na formação do fuso, centrômero e alterações na condensação da cromatina antes da metáfase (Fenech 2000). Nas técnicas citogenéticas clássicas, os cromossomos são estudados diretamente pela observação de aberrações nas metáfases. Entretanto, essa abordagem, embora mais detalhista, é bastante complexa e trabalhosa. Desse modo, o desenvolvimento de um sistema simples para avaliação do dano cromossômico foi necessário. A resposta para o problema foi proposta independentemente por Schmid e Heddle: acessar o dano cromossômico in vivo pela medida do micronúcleo, também conhecido pelos hematologistas como corpos de Howell-Jolly em linfócitos, em populações de células em divisão. O ensaio de micronúcleo é hoje um dos testes citogenéticos in vivo mais bem estabelecidos, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (Fenech 2000).

As quebras cromossômicas que não possuem centrômero não podem ligar-se às fibras cinetocóricas e conseqüentemente, não podem migrar para os pólos opostos da célula juntamente com os demais cromossomos durante a anáfase. Na telófase, tanto da mitose quanto meiose, a membrana nuclear é refeita ao redor do conjunto de cromossomos. Os fragmentos acêntricos ou até mesmo um cromossomo inteiro que não estava ligado ao fuso mitótico é incapaz de integrar-se aos novos núcleos. Em razão disso, esses fragmentos formam um pequeno núcleo individual, denominado micronúcleo, o qual é detectado em células interfásicas como um pequeno corpúsculo arredondado de cromatina, separado do núcleo principal (Fenech 2000; 2006; 2007).

O micronúcleo constitui um índice de quebras cromossômicas permanentes e perda cromossomal que ser detectado em células que tenham completado ao menos uma divisão celular, sendo desejável a avaliação no estágio de células binucleadas (Fenech 2000). Ocasionalmente, pontes nucleoplásmicas entre os núcleos também podem ser observadas e frequentemente correspondem a cromossomos dicêntricos em que os centrômeros foram puxados para pólos opostos da célula, constituindo assim em um indicativo de rearranjo cromossômico. O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica do tipo clastogênese, aneugênese, danos no fuso mitótico, aberrações numéricas e cromossômicas. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes. Em razão disso, as células precisam ter passado por um ciclo mitótico (Fenech 2000; 2006).

Para a execução da técnica, a população celular deve dividir-se e a cinética dessa divisão celular deve ser bem estabelecida. Considerando que as células de uma

população não dividem-se ao mesmo tempo, várias abordagens foram desenvolvidas para facilitar a execução do teste. Uma das mais conhecidas é o teste de micronúcleo com bloqueio na citocinese. Nessa variação do teste, as células que completaram uma divisão nuclear são tratadas com citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina, necessária para formação dos microfilamentos que constriem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese, permitindo que as células em divisão sejam rapidamente identificadas pelo aspecto binucleado (Fenech 2000). O uso da citocalasina B possibilita o acúmulo das células em divisão no estágio binucleado na população, independente da sincronização e proporção de células em divisão (Fenech 2006).

Algumas inovações foram realizadas na técnica ao longo desses 20 anos, e atualmente o teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese é um método útil para medida de quebras cromossômicas, perda cromossômica, não disjunção cromossômica, necrose, apoptose e efeito citostático (Fenech 2006).

Em combinação com uso de sondas para a região do centrômero ou anticorpos contra o cinetócoro é possível distinguir entre quebra cromossômica e perda como mecanismo de formação do micronúcleo e assim medir defeitos na segregação dos cromossomos entre os núcleos na célula binucleada. A amplificação gênica também pode ser determinada por meio da visualização de brotos de material nuclear (Fenech 2007). Em razão dessas características, o conceito desse teste como um ensaio “citoma” de determinação de instabilidade cromossomal é sugerido. O conceito “citoma” deve-se ao fato de cada célula do sistema estudado ser avaliada em relação ao seu estado de viabilidade (necrose, apoptose), seu estado mitótico (mononucleada, metáfase, anáfase, binucleada ou multinucleada) e instabilidade cromossomal ou danos (presença de micronúcleo, pontes nucleoplásmicas entre as células binucleadas, broto nuclear e inclusive o número de sinais de sondas centroméricas entre os núcleos da célula binucleada) (Fenech 2006; 2007).

8.3. Ensaio cometa

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese de célula única em gel, é amplamente empregado para avaliar dano ao DNA e reparação em células eucarióticas. A popularidade desse teste deve-se a sua sensibilidade, custo relativamente baixo e simplicidade. Além disso, o teste pode ser realizado em uma suspensão celular contendo uma população pequena de células, em proliferação ou não, e corresponde a um teste citogenético (Collins *et al.* 1997; Collins 2004; Hartmann *et al.* 2001; Tice e Strauss 1995).

O princípio desse ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. Para a realização do ensaio, as células são embebidas em agarose, suas membranas são rompidas com uso de detergentes em pH alcalino e as proteínas nucleares são removidas com uso de altas concentrações salinas. Dessa maneira, em lâmina permanece apenas o nucleóide íntegro. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do nucleóide migra no gel de acordo com seu tamanho. Os fragmentos pequenos migram com um velocidade maior que a matriz nuclear. Assim sendo, células com DNA danificado formam, após a migração, o aspecto de um cometa e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano ocorrido (Burlinson *et al.* 2007; Collins 2004; Lee e Steinert 2003; Tice *et al.* 2000).

Esse teste é uma avaliação de genotoxicidade, o qual detecta danos primários ao DNA induzidos por uma série de substâncias químicas, como agentes intercalantes, alquilantes e oxidantes (Collins 2004). Os danos detectados são principalmente quebras simples e duplas na fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompletos, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas entre moléculas de DNA, entre DNA e proteínas e entre DNA e xenobióticos (Bolognesi *et al.* 2004; Tice *et al.* 2000). Embora seja possível quantificar o dano, não é possível identificar com clareza qual desses eventos foi responsável pela indução da lesão. Basicamente existem dois protocolos principais para a execução do teste: a versão neutra, conforme o método original aprimorado por Ostling e Johanson em 1984, utiliza eletroforese em tampão de pH entre 7,0 e 8,0 para detecção quebras duplas nas fitas de DNA e ligações cruzadas DNA-DNA, DNA-proteína, DNA-xenobiótico (Ostling e Johanson 1984); a versão alcalina realiza eletroforese em pH maior que 13,0, desnaturando o DNA, podendo detectar quebras simples e duplas, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletos e as ligações cruzadas. A versão alcalina é mais empregada por ser mais abrangente, pois além de detectar danos diretos, torna possível a avaliação de danos indiretos como lesões por metilação e adutos, os quais sendo álcali-lábeis, expressam-se com quebras simples frente ao tratamento alcalino. Além disso, pode-se ainda utilizar o protocolo levemente alcalino, cuja eletroforese acontece em pH 12,1 e assim não detecta danos álcali-lábeis (Tice *et al.* 2000).

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas por esse teste podem ser reparadas (Collins *et al.* 1997; Tice *et al.* 2000). A análise dos resultados pode ser realizada visualmente em microscópio ótico quando as células forem coradas com nitrato de prata ou em microscópio de fluorescência, quando coradas com brometo de etídeo, laranja de

acridina ou iodeto de propídeo. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação a cabeça (núcleo) em 4 classes de danos: classe 0: sem cauda (sem dano); classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda longa, superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 4: cauda longa e espalhada em forma de leque. O teste ainda permite inferir fragmentação apoptótica de DNA, em células cujo nucleóide não mostra-se denso e apresenta-se difuso, ao contrário da célula sem dano, em que o material nuclear está compacto (Olive e Banath 2006).

Esse teste pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo*, em diversos tipos celulares, incluindo fungos, vegetais e células animais; existe um grande interesse no cometa *in vivo* em animais com fins de detecção de lesões ao DNA em diferentes órgãos (Brendler-Schwaab *et al.* 2005; Juchimiuk *et al.* 2006). Algumas metodologias ainda permitem avaliar as lesões em tecidos incluídos em parafina, criopreservados e de forma *ex vivo* (Plazar *et al.* 2007). Dessa maneira, o ensaio cometa também é amplamente empregado em biomonitoramento humano e ambiental utilizando diversos organismos (Brendler-Schwaab *et al.* 2005; Collins *et al.* 1997; Guecheva *et al.* 2001; Szeto *et al.* 2005). Em termos de terapêutica, o ensaio é bastante utilizado na avaliação da formação de pontes intercadeias em linfócitos de pacientes em tratamento com quimioterápicos e pacientes portadores de síndromes genéticas e na determinação da capacidade de reparo de DNA em pacientes com diversos tumores (Almeida *et al.* 2006; Cheng *et al.* 2006; Iwakawa *et al.* 2005). Além disso, programas de computador foram desenvolvidos para aperfeiçoar a análise de resultados e permitir a quantificação exata do conteúdo de DNA na cabeça e cauda, tanto em protocolos empregando corantes fluorescentes como em experimentos utilizando coloração com prata. Atualmente a análise automatizada tem sido utilizada exponencialmente em trabalhos empregando o ensaio cometa, embora a análise visual seja extremamente válida (Burlinson *et al.* 2007; Garcia *et al.* 2007).



OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

A proposta desse trabalho é ampliar os conhecimentos a respeito dos efeitos biológicos do diseleneto de difenila em células de mamíferos e em diferentes órgãos e tecidos de camundongos em relação aos níveis de glutathiona reduzida e predisposição ao dano oxidativo, com ênfase em lesões ao DNA e suas repercussões na integridade genômica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Considerando o papel pró-oxidante e mutagênico do composto em microrganismos, um dos objetivos desse trabalho é o seguimento ao estudo de toxicologia genética avaliando o seu potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de mamíferos em cultura. Além disso, o esclarecimento a respeito do envolvimento da propriedade pró-oxidante do composto nesses efeitos biológicos também foi investigada.
2. Durante a investigação do perfil citotóxico do DPDS em células em cultura, uma ação antioxidante foi verificada. O segundo objetivo desse trabalho é avaliar a ação antioxidante desse composto organoselenado, discriminando as concentrações tóxicas e de interesse farmacológico, o mecanismo envolvido na ação antioxidante e sua participação na modulação da genotoxicidade de mutágenos que lesam os ácidos nucleicos com envolvimento da ação de radicais livres em células V79 em cultura.
3. Realizar a avaliação do potencial genotóxico desse diseleneto em camundongos, determinando os órgãos-alvo de toxicidade, e estudar os mecanismos envolvidos.
4. Sumarizar e analisar criticamente os dados a respeito das atividades farmacológicas e toxicológicas da molécula em estudo.



CAPÍTULO – I

***Pharmacology and toxicology of
diphenyl diselenide in several
biological models***

***Brazilian Journal of Medical and
Biological Research, 40:1287-1304,
2007.***

Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models

R.M. Rosa¹, R. Roesler²,
A.L. Braga⁴, J. Saffi^{1,3}
and J.A.P. Henriques^{1,3}

¹Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências,
²Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil
³Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil,
Canoas, RS, Brasil
⁴Instituto de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria,
RS, Brasil

Abstract

Correspondence

J.A.P. Henriques
Agronomia, UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500
Ed. 43422, Laboratório 210
91501-970 Porto Alegre, RS
Brasil
Fax: +55-51-3316-7309
E-mail: pegas@cblot.ufrgs.br

Research supported by CNPq,
CAPES, and GENOTOX (Genotoxicity
Laboratory, Instituto Royal,
Brazil). R.M. Rosa is the
recipient of a doctoral grant
from CAPES.

Received January 18, 2007
Accepted May 21, 2007

The pharmacology of synthetic organoselenium compounds indicates that they can be used as antioxidants, enzyme inhibitors, neuroprotectors, anti-tumor and anti-infectious agents, and immunomodulators. In this review, we focus on the effects of diphenyl diselenide (DPDS) in various biological model organisms. DPDS possesses antioxidant activity, confirmed in several *in vitro* and *in vivo* systems, and thus has a protective effect against hepatic, renal and gastric injuries, in addition to its neuroprotective activity. The activity of the compound on the central nervous system has been studied since DPDS has lipophilic characteristics, increasing adenylyl cyclase activity and inhibiting glutamate and MK-801 binding to rat synaptic membranes. Systemic administration facilitates the formation of long-term object recognition memory in mice and has a protective effect against brain ischemia and on reserpine-induced orofacial dyskinesia in rats. On the other hand, DPDS may be toxic, mainly because of its interaction with thiol groups. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the molecule acts as a pro-oxidant by depleting free glutathione. Administration to mice during cadmium intoxication has the opposite effect, reducing oxidative stress in various tissues. DPDS is a potent inhibitor of δ -aminolevulinic acid dehydratase and chronic exposure to high doses of this compound has central effects on mouse brain, as well as liver and renal toxicity. Genotoxicity of this compound has been assessed in bacteria, haploid and diploid yeast and in a tumor cell line.

Key words

- Diphenyl diselenide
- Organoselenium
- Antioxidants
- Neuroprotection
- *Saccharomyces cerevisiae*
- Mutagenesis

Introduction

The element selenium was discovered in 1818 by the Swedish chemist Berzelius and was named after the Greek goddess of the

moon, Selene. First reports were related to its toxicity. Although evidence was obtained as early as 1842 for the toxicity of selenium, the first authentic written record of selenium poisoning was reported in 1856 by Madison,

an army surgeon stationed at Fort Randall, then in the Nebraska territory (1). He described a fatal disease among horses grazing certain areas near the fort. In 1929, investigations started to study toxic grains at the South Dakota Experimental Station and in 1933 the toxic principle in these grains was suggested to be selenium, which was confirmed a year later. The element was reported to be a potent carcinogen in 1943 (2, 3). Selenium was thus considered to be an absolute poison until Schwarz and Foltz identified it as a micronutrient for bacteria, mammals and birds (1). After years of empirical studies on selenium deficiency syndromes in animal models, selenium biochemistry emerged in 1973, when the bacterial enzymes formate dehydrogenase and glycine reductase were reported to contain selenium. At the same time, this atom was found in the active site of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPX) in mammals (1). The number of selenoproteins identified has grown substantially in recent years and molecular mechanisms and regulatory pathways of seleno amino acid incorporation have been elucidated (2).

The biological importance of selenium and its inorganic forms led to the development of pharmacologically active organoselenium (OS) compounds with low toxicity, since the selenium atom was not delivered to the intracellular selenium pool. Although the first synthetic OS compound, diethyl diselenide, was prepared by Lowig as early as in 1836, the highly malodorous nature of selenium compounds, difficulties in purification, and the instability of many of the derivatives hampered further developments. The discovery of several useful new reactions and a variety of novel structures with unusual properties led to further OS development. Interest in the use of these molecules in biochemistry started with the findings that they are much less toxic than inor-

ganic selenium species (1).

Diphenyl diselenide (DPDS; Figure 1) (4) is a simple and stable OS compound. It is an electrophilic reagent used in the synthesis of a variety of pharmacologically active OS compounds (4). Recently, the biological activities of DPDS have been studied and this compound has become a good candidate for therapeutic purposes. In this review we provide a comprehensive coverage of the toxicology and pharmacology of this molecule.

Toxicology

Although the molecular mechanisms underlying selenium toxicity are still poorly understood, Painter (see Ref. 1) proposed that it could be related to the oxidation of thiols of biological importance. The interaction of inorganic selenium with thiols was demonstrated experimentally by Tsen and Tappel (5), who showed that selenite catalytically increased the oxidation of glutathione. Subsequently, the effectiveness of OS compounds as catalytic oxidants of thiols was reported (5-9). Inorganic and organic forms of selenium can also increase thiol oxidation by accelerating electron transfer from thiols to oxidized acceptors such as cytochrome c and methylene blue (8).

The mechanism of oxidation of thiol groups in low- and high-molecular weight molecules by selenium varies with the chemical structure of the compounds and can involve the formation of selenoxides, selenotrisulfides and selenylsulfide (10,11). OS compounds such as selenocystine and a variety of diselenides can react with thiols such as cysteine, dithiothreitol (DTT) and reduced glutathione (GSH) to produce selenocysteine and selenols, respectively, and disulfides. The interaction between DPDS and thiol groups has been investigated in several biological models, such as the enzyme

δ -aminolevulinatase (ALA-D) from various sources, strains of *Saccharomyces cerevisiae* defective in GSH biosynthesis, and in *in vitro* systems.

Interaction with δ -aminolevulinatase dehydratase

ALA-D, or porphobilinogen synthase, is an enzyme sensitive to sulfhydryl (SH)-blocking agents that participates in the second step of heme, chlorophyll and corrin biosynthesis (11,12). It catalyzes the condensation of two molecules of 5-aminolevulinic acid to porphobilinogen, thus playing an essential role in animals and photosynthetic organisms (11,12). ALA-D inhibition inhibits heme biosynthesis, resulting in accumulation of aminolevulinic acid, which affects aerobic metabolism, and has some pro-oxidant activity (13). Inhibition of heme biosynthesis may disturb the production of cytochrome P450, fundamental to metabolism.

The investigation of the effects of DPDS treatment on ALA-D activity is of particular significance from an academic and toxicological point of view because of the importance of reduced thiol groups for ALA-D activity and the oxidant properties of organic and inorganic selenium compounds. Studies have indicated whether this enzyme is a potential target for DPDS and whether it can be considered a marker for OS exposure, as was found for lead intoxication.

The first study was carried out *in vitro* using ALA-D purified from liver, kidney and brain of adult rats. DPDS, as well as other diselenide bond-containing compounds, did indeed have an inhibitory potential on ALA-D, even without pre-incubation. However, after pre-incubation of the enzyme preparation with DPDS, inhibition was significantly stronger. The effect was reversed in a concentration-dependent manner by DTT treatment, which protects SH groups of the enzyme, and also by GSH, the

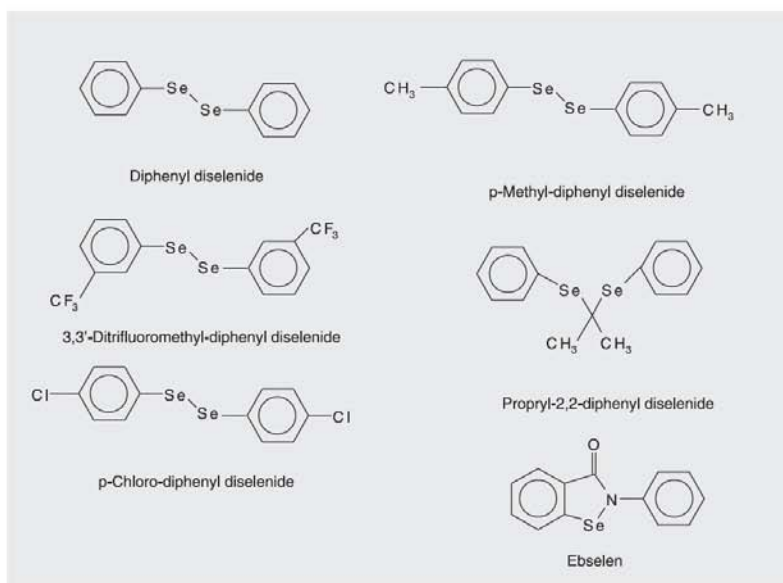


Figure 1. Chemical structure of diphenyl diselenide, some diphenyl diselenide derivatives and ebselen.

main cellular thiol (14). Moreover, the inhibitory action of propyl-2-methoxy-2-phenyl selenide and propyl-2,2-diphenyl diselenide (Figure 1) on ALA-D activity seems to be due to their decomposition to DPDS (14). Other OS compounds such as phenyl selenoacetylene inhibit ALA-D *in vitro* via conversion to DPDS (15).

The mechanism underlying the inhibitory effect of DPDS is related to oxidation of essential cysteinyl residues located at the active site of the enzyme. Since oxyradical scavengers do not interfere with the inhibitory effect of the tested compounds, DPDS apparently acts by oxidizing cysteinyl residues in a similar way to that described for low-molecular weight thiols (14). Based on this evidence, Maciel and co-workers (16) showed that DPDS inhibits ALA-D from liver, kidney and brain of mice *in vivo*. The effects were tissue-specific and dependent on exposure protocol (single dose or chronic treatment). The acute treatment of mice inhibited the activity of ALA-D from liver and brain but not kidney. After chronic exposure, brain and liver ALA-D were inhibited in a dose-dependent manner, with the effects being greater in liver than in brain. One interesting finding is that the treatment specifically affects enzyme activity without reducing the total content of non-protein SH groups. In contrast to *in vitro* results (8), DTT could not completely reactivate the inhibited enzyme, suggesting that the oxidation caused by organoselenium might have altered the enzyme conformation in such a way that DTT could no longer reactivate it (14,16).

DPDS inhibits mammalian ALA-D but not the plant enzyme. This is presumably related to differences in the primary structure of these enzymes, i.e., in the quantity and spatial proximity of cysteinyl residues within the protein. The mammalian enzyme possesses two distinct classes of zinc-bind-

ing sites, one containing a single cysteine residue and the other four cysteine residues, whereas the plant enzyme has no cysteine residues in these regions. This led Rocha and co-workers (17,18) to propose a mechanism for the differential action of DPDS. In the first step, enzyme reaction with DPDS gives an unstable intermediate of the enzyme-Cys-S-SePh and selenophenol type, probably due to a thiol nucleophilic attack in the selenium atom of DPDS. Subsequently, the other cysteinyl residue, due to its close spatial proximity to the more reactive residue, attacks the sulfur-selenium bond of the intermediate, producing the oxidized enzyme (inactive), and regenerates a second molecule of selenophenol. Support for this mechanism has been obtained using low-molecular weight thiol-containing molecules. The selenophenol molecules formed after reaction with the thiol group are oxidized back to DPDS by atmospheric O₂. The oxidation of selenophenol helps to explain the previous observation that the inhibitory effect on rat ALA-D decreases considerably in an anaerobic atmosphere (17,18).

In agreement with these observations, enzyme inhibition in human erythrocytes can be avoided by mercaptan DTT and the activity of inhibited ALA-D can be restored by treatment with this compound. However, the inhibitory effect was not reversed by GSH; even 3 mM GSH gave only a modest increase in ALA-D activity that had been inhibited by 40 and 100 μM DPDS (19). These results clearly reinforce the suggestion that DPDS inhibits ALA-D in human blood by interacting with cysteinyl residues that are important for enzyme activity. The importance of thiol groups for ALA-D catalysis is well known (20). In this case, DTT was more protective than GSH; only the more hydrophobic SH-reducing agent is able to reactivate SH groups localized in the deeper regions of the enzyme. Alternatively,

the oxidation caused by DPDS in ALA-D may modify enzyme conformation in such a way that GSH is unable to reactivate the enzyme. In this manner, *in vitro* DPDS inactivates human erythrocyte ALA-D by interacting with the SH groups essential to the enzyme (19).

As pointed out above, OS compounds can interact directly with low-molecular weight thiols, oxidizing them to disulfides that in turn oxidize cysteinyl residues in proteins. ALA-D is an SH-containing enzyme that is extremely sensitive to oxidizing agents and thus represents an excellent tool to study this type of interaction. DPDS, in oxidizing essential SH groups from ALA-D, is converted into a selenol and the results obtained with mammalian ALA-D and DPDS suggest that proteins containing cysteinyl residues in close spatial proximity in their three-dimensional structure will react more promptly with DPDS. Recently, it was pointed out that this OS compound does not inhibit mouse hepatic ALA-D by an oxidative stress-mediated mechanism, since the levels of thiobarbituric reactive substances (TBARS), a marker of oxidative damage, were not increased (20). The cellular toxicity of this compound may thus be related, at least in part, to the oxidation of vicinal SH groups of target proteins. In addition, ALA-D has been demonstrated to be a potential molecular target for selenium and OS intoxication.

Pro-oxidant activity in yeast

Since DPDS has high thiol peroxidase and GPX mimetic activities, we investigated its antioxidant properties using several *in vitro* assays and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in superoxide dismutase, GSH biosynthesis and the γ AP-1 transcription factor. Unexpectedly, DPDS *per se* had no cytotoxic effects on *S. cerevi-*

siae. However, it sensitized yeast cells to oxidative mutagens, hydrogen peroxide, paraquat, tert-butyl-hydroperoxide, and sodium nitrite, suggesting that it has an indirect pro-oxidant effect (21). In spite of this lack of antioxidant defense, the response of all strains of *S. cerevisiae* tested was identical, indicating the existence of a general, but not necessarily nonspecific, mechanism of indirect cytotoxicity. The GSH constitutes the common and main defense system against reactive oxygen species (ROS). This molecule also contributes to detoxification of electrophilic compounds, sequestration of toxic metals and modulation of the cellular redox and thiol-disulfide status of proteins (22).

Measurement of GSH in yeast cells treated with the OS molecule confirmed that this drug depleted cellular GSH without increasing GSH oxidation rate, explaining the pro-oxidant effect. Accordingly, the DPDS pro-oxidant activity could be lowered by N-acetylcysteine pre-treatment, increasing GSH levels in yeast (21).

We have frequently employed a set of mutant strains involved in GSH biosynthesis in our investigations. The yeast *gsh1* mutant is unable to synthesize the first dipeptide intermediate of GSH and, lacking endogenous GSH synthesis, requires exogenous glutathione to survive and grow in minimal media. When a second mutation, *hwg1-1*, is introduced into the *gsh1* mutant, the resulting double mutant does not require any exogenous glutathione since the *hwg1* missense mutation, affecting the *PRO2* gene and encoding an altered γ -glutamyl phosphate reductase, can synthesize a small amount of γ -glutamyl-cysteinyl dipeptide, thus allowing synthesis of a minimal amount of GSH. The differential response to DPDS of the *gsh1* mutant of low GSH content and of the double mutant *gsh1 hwg1-1* confirms the involvement of GSH in protection against this OS in

a dose-dependent manner (21).

The thiol moiety of GSH also has unique redox and strong nucleophilic properties, permitting its conjugation with electrophilic compounds, xenobiotics in particular (23). DPDS, an electrophilic molecule, is able to form an as yet undescribed GSH adduct, most probably by conjugating via nucleophilic attack to the thiol moiety of GSH; this reaction apparently occurs spontaneously *in vitro* and is predicted to result in a reduced state of one or both selenium moieties in DPDS. This reaction is more likely than a reduction of the diselenide bond by GSH, which is not favored since the redox potential of GSH is much higher than that of the diselenide bond (21,23). This phenomenon would explain the depletion of intracellular free GSH by DPDS that results in the observed pro-oxidant properties of the drug, i.e., sensitization of DPDS-pre-treated yeast cells, regardless of their genetic endowment with anti-oxidant defense mechanisms, to an oxidative mutagen challenge.

Maciel and co-workers (16) observed that DTT, GSH, and other thiols could be oxi-

dized by DPDS, but that oxidation of DTT is favored over oxidation of GSH and cysteine. In the interaction between ALA-D and DPDS, oxidation is the main mechanism by which DPDS indirectly acts as a pro-oxidant by enzyme inhibition. In yeast we could not show accumulation of extracellular oxidized glutathione (GSSG) after DPDS treatment, as would be expected after direct reduction of the diselenide bond. We suggest, therefore, that the DPDS-induced pro-oxidant effect in yeast is a direct result of GSH depletion via the production of DPDS-GSH adducts.

Genetic toxicology

Our group has also investigated the potential genotoxicity of DPDS. This was deemed important since DPDS is used as an intermediate and reagent in organic syntheses, which increases the risk of human exposure in the workplace. This information is also very important to evaluate the safety of possible future pharmacological applications of the compound. The genotoxicity of DPDS has been assayed in *Salmonella typhimurium* and in the simple eukaryote *S. cerevisiae*, whose mutagenesis and DNA repair mechanisms were assessed using haploid strains, whereas recombination was tested in a diploid strain (4).

We suggested also that the mutagenic effect of DPDS is an indirect effect mediated by free radicals. DPDS was able to strongly enhance the oxidative mutagenesis induced by hydrogen peroxide in *S. typhimurium* TA102, which has a proven ability to detect mutagens that generate ROS and cause oxidative DNA damage. A modulatory (enhancer) role in the effect of oxidative mutagens is suggested for DPDS (Figure 2). Moreover, it is known that DPDS acts as a pro-oxidant in yeast strains, causing GSH depletion without increasing the rate of GSH

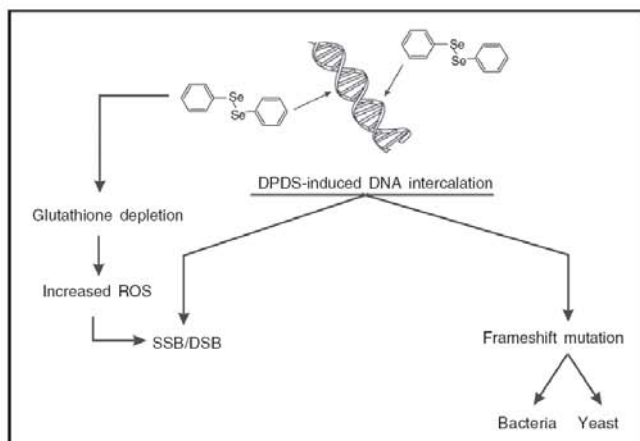


Figure 2. A possible model of the genotoxic mechanism of action of diphenyl diselenide (DPDS). ROS = reactive oxygen species; SSB = single-strand breaks; DSB = double-strand breaks.

oxidation (22). Thus, as expected, N-acetylcysteine, a GSH biosynthesis precursor, abolished the mutagenicity of DPDS in yeast, probably by conjugation with DPDS, blocking its DNA damaging potential.

To gain insight into the mechanisms of the genotoxic action of DPDS, we have studied the response of *S. cerevisiae* mutants defective in DNA repair to treatment with this OS compound. Mutants defective in excision-resynthesis repair (*rad3-e5*, *rad1Δ*), in error-prone repair (*rad6Δ*) and in recombinational repair (*rad52-1*) were used in this investigation. In this respect, the single mutants *rad3-e5* and *rad1Δ*, blocked in excision repair, and *rad6Δ*, defective in the mutagenic repair pathway, showed practically the same sensitivity as the wild-type strain. The hypersensitivity of the *rad52-1* mutant strain suggests that recombinational repair is critical for the processing of potentially lethal genetic lesions resulting from DPDS-induced DNA damage. Thus, it appears that the OS compound probably induces single (SSB)- and/or double-strand breaks (DSB) in DNA (4).

The cytotoxic responses of the single mutant *rad52-1* and double mutant *rad3-e5 rad52-1* to DPDS are identical, which is a consequence of the absence of the *RAD52* pathway. In *S. cerevisiae*, members of the *RAD52* epitasis group are indispensable for successful meiotic and mitotic recombination and survival after treatment with ionizing radiations, alkylating agents, some oxidative mutagens, and cross-linking agents (24). These results suggest that the DSB repair system is the main pathway required to overcome the induced lesions, whereas the excision repair and mutagenic systems are not primarily involved.

In order to examine the contribution of the base excision DNA repair pathway (BER) to DPDS-induced DNA damage, several single, double, triple and quadruple mutants

were evaluated regarding survival of their mutation rate following exposure to DPDS. Figure 3 shows that the recombination-deficient *rad52* mutant strain presents high sensitivity to DPDS, whereas the other mutants showed the same sensitivity as the wild-type strain. The quadruple mutant *ntg1 ntg2 apn1 rad52* had the same sensitivity as the single mutant *rad52*, supporting the participation of the recombination pathway in defense against genotoxic lesions generated by DPDS.

The results shown in Table 1 suggest that DPDS treatment increases the mutation rate in BER-deficient strains. The increase in the frequency of forward mutation induced by DPDS in the quadruple mutant blocked in both BER and nucleotide excision repair (NER) (*ntg1 ntg2 apn1 rad1*) suggests that an error-prone pathway repairs (some of) the DNA lesions. However, the quadruple mutant for BER and translesion synthesis (*ntg1 ntg2 apn1 rev3*), after DPDS exposure, shows induction of forward mutation. In this respect, the results of mutagenesis, also supported by the resistance of the single mutant *rev3Δ*, show that other translesion enzymes, like Rad30p (24), contribute to the cell's DPDS tolerance. Furthermore, the increase in the frequency of forward mutation induced by this molecule in the quadruple mutant for BER and recombinational repair (*ntg1 ntg2 apn1 rad52*) suggest an interaction of different DNA repair pathways related to the response to DPDS.

On this basis, our findings suggest that the N-glycosylases and AP-lyases of the BER pathway, which primarily involves the repair of small, helix non-distorting base lesions, abasic sites, and oxidative DNA damage, have a crucial role in preventing the oxidative mutagenesis induced by this molecule. However, the recombinational repair system is the main pathway required to overcome the lesions generated by the oxidative

Figure 3. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in several DNA repair pathways after treatment with different doses of diphenyl diselenide (DPDS) during exponential growth in liquid-rich medium.

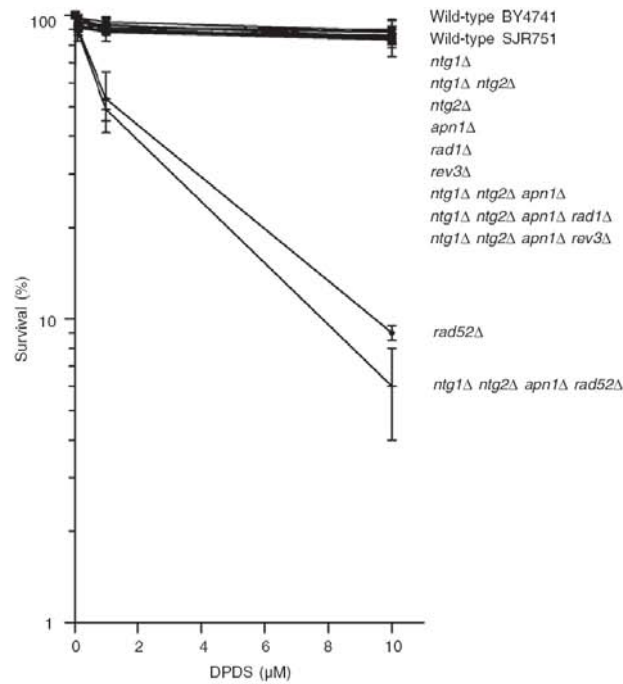


Table 1. Induction of forward mutation of the *CAN1* locus (*Can^r* mutants per 10^8 survivors) in haploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* defective in DNA repair pathways, after diphenyl diselenide (DPDS) treatment during exponential growth in liquid-rich medium containing DPDS at desired concentrations.

Relevant genotype/ DPDS exposure	Mutation rate (<i>Can^r</i> mutants per 10^8 survivors)				
	0	0.01 mM	0.1 mM	1 mM	10 mM
Wild-type BY4741	0.22 ± 0.09	0.32 ± 0.10	0.39 ± 0.11	0.16 ± 0.05	0.28 ± 0.09
<i>rad1Δ</i>	0.26 ± 0.12	0.34 ± 0.11	0.20 ± 0.05	0.29 ± 0.10	0.31 ± 0.06
<i>rev3Δ</i>	0.38 ± 0.02	0.41 ± 0.05	0.41 ± 0.08	0.45 ± 0.10	0.48 ± 0.10
<i>rad52Δ</i>	0.31 ± 0.08	0.53 ± 0.07*	0.85 ± 0.06*	1.12 ± 0.36*	1.52 ± 0.10*
Wild-type SJR751	3.8 ± 0.70	4.1 ± 1.10	2.9 ± 0.80	5.0 ± 2.10	4.8 ± 1.90
<i>ntg1Δ</i>	9.5 ± 1.34	8.0 ± 1.77	14.3 ± 2.85	24.3 ± 5.47*	31.5 ± 9.44*
<i>ntg2Δ</i>	11.2 ± 0.90	12.5 ± 0.70	10.9 ± 2.10	18.4 ± 1.80	26.9 ± 0.55*
<i>ntg1Δ ntg2Δ</i>	18.8 ± 2.44	21.5 ± 3.00	14.9 ± 1.20	52.4 ± 6.44*	72.0 ± 1.00*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ</i>	12.3 ± 0.50	18.8 ± 2.30	15.4 ± 2.47	32.9 ± 5.00*	55.8 ± 9.00*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad1Δ</i>	259.0 ± 21.30	312.2 ± 18.47*	405.8 ± 21.00*	667.1 ± 50.45*	730.0 ± 81.00*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad52Δ</i>	85.0 ± 14.70	159.8 ± 9.20*	232.9 ± 21.30*	389.8 ± 62.00*	400.7 ± 32.10*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rev3Δ</i>	168.4 ± 12.80	258.1 ± 22.00*	325.7 ± 6.47*	554.1 ± 18.00*	861.3 ± 14.80*

Data are reported as means ± SD for 4 independent experiments carried out in triplicate. The strains *rad1Δ*, *rev3Δ*, and *rad52Δ* are derivatives of the wild-type BY4741, whereas the other mutants are isogenic to strain SJR751.

*P < 0.05 compared to DPDS non-treated cells (ANOVA followed by the Tukey test).

damage - DNA DSB and closely located SSB - or by the SSB repair process that can, in turn, result in DSB - and rescue the survival after DPDS exposure.

Although oxidative damage can be the prime mechanism explaining the genotoxicity of this molecule in yeast, a possible intercalant effect may be also involved in the genotoxic effect. DPDS cytotoxicity may be linked to its ability to intercalate into DNA. As observed in the Ames test, DPDS clearly caused frame shift mutations only in exponentially growing cells of *S. cerevisiae*. Since chemical compounds with planar topologies and electrophilicity may intercalate between DNA bases, the mutagenic response is observed mainly as frame shift mutagenicity in microbial systems. DPDS is an electrophilic molecule with an aromatic planar structure, which induces frame shift mutation only during cellular growth, when the access to DNA is facilitated; we believe that this compound is a weak intercalator mutagen. Frame shift mutations induced by DNA-intercalating drugs have been correlated with DNA strand breaks induced by inhibition of DNA topoisomerases. Since DNA topoisomerase II inhibition induces breaks which are repaired almost exclusively by Rad52-dependent homologous recombination in yeast, the high sensitivity of the *rad52* mutant could involve, at least in part, the interference of DPDS with topoisomerase II activity (24). Thus, the putative intercalant effect of DPDS may involve strand break generation by the action of topoisomerases.

In view of its genotoxic properties in microorganisms, we investigated whether DPDS might be inducing DNA damage in MCF7 cells, a mammary adenocarcinoma cell line, using the *in vitro* alkaline comet assay. The alkaline version of the comet assay detects primary (repairable) DNA SSB and DSB and alkali-labile sites. DPDS did not generate significant DNA damage in a

dose-response manner (Figure 4). In addition, it can be seen that pre-treatment with DPDS potentiated the DNA damage induced by hydrogen peroxide, supporting the view of a clear pro-oxidant ability (Figure 5). This

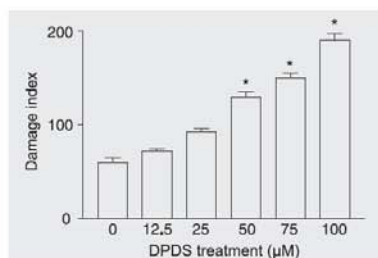


Figure 4. Genotoxicity of diphenyl diselenide (DPDS) treatment for 3 h in serum-free medium to the MCF7 cell line evaluated by the comet assay. Data are reported as means \pm SD for 6 independent experiments. * $P < 0.05$ compared to control (ANOVA followed by the Tukey test). Positive control: 40 μ M methylmethanesulfonate. Damage index is an arbitrary score calculated from cells in different damage classes, which are classified in the visual score by the measurement of DNA migration length and on the amount of DNA in the tail.

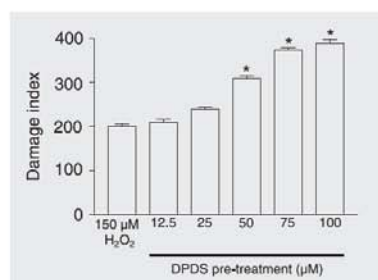


Figure 5. Pro-oxidant effect of treatment with diphenyl diselenide (DPDS) for 3 h in serum-free medium on the genotoxicity of 150 μ M H_2O_2 to the MCF7 cell line evaluated by the comet assay. Data are reported as means \pm SD for 6 independent experiments. * $P < 0.05$ compared to cells treated only with hydrogen peroxide (one-way ANOVA followed by the Tukey test). Damage index is an arbitrary score calculated from cells in different damage classes, which are classified in the visual score by the measurement of DNA migration length and on the amount of DNA in the tail.

finding supports the genotoxic effects of DPDS on mammalian tumor cells and suggests its potential in antiproliferative therapy.

Recently, we evaluated the cytotoxic, pro-oxidant, genotoxic, and mutagenic properties of this molecule in V79 Chinese lung fibroblast cells (25). When cells were treated with increasing concentrations of DPDS, its cytotoxic activity, as determined using four cell viability endpoints, occurred at doses up to 50 μM . The MTT reduction was stimulated, which may indicate ROS generation. Accordingly, the treatment of cells for 3 h with cytotoxic doses of DPDS increased TBARS levels and sensitized cells to oxidative challenge, indicating a pro-oxidant effect. The measurement of total, reduced, and oxidized GSH showed that DPDS can lead to intracellular GSH depletion, with no increase in the oxidation rate in a dose- and time-dependent manner. At the higher doses, DPDS generated DNA strand breaks, as observed using the comet assay. The treatment also induced an increase in the number of binucleated cells in the micronucleus test, showing the mutagenic risk of this molecule at high concentrations. Finally, pre-incubation with N-acetylcysteine, which restored GSH to normal levels, annulled the pro-oxidant and genotoxic effects of DPDS. These findings show that DPDS-induced oxidative stress and toxicity are closely related to intracellular level of reduced GSH, in agreement with our previous findings in yeast and bacteria.

Reproductive toxicology

The reproductive and teratogenic effects of DPDS have been evaluated. Favero et al. (26,27) showed that a single subcutaneous injection of 50 and 100 mg/kg DPDS led to an increased incidence of skeletal variations or anomalies in pregnant Wistar rats, but did not cause externally visible malformations

in rat fetuses and did not affect the progeny. DPDS administered either intraperitoneally (acute treatment) or subcutaneously (sub-chronic treatment) to adult rats also had no reproductive toxicology (27,28). However, recent studies on the effects on embryo-fetal development in dams that were treated subcutaneously with DPDS at 6 to 15 days of pregnancy have shown evidence of toxicity. A decrease in maternal body weight gain, a reduction in fetal weight and crown-rump length, and signs of delayed ossification in the skull, sternebrae and limbs were observed. Exposure of dams to DPDS also resulted in altered placental morphology that may have contributed to an adverse reproductive outcome. The teratogenic and potential reproductive toxicologic aspects of DPDS and the mechanisms involved remain unclear.

Neurotoxicology

Exposure for 2 months to high doses of DPDS (250 $\mu\text{mol/kg}$, subcutaneous administration) induced a 3-fold increase of the total selenium content of the brain, showing that DPDS crosses the blood-brain barrier and brain selenium levels increase in mice after acute and chronic exposure (29,30). This supports the hypothesis that the brain is a potential target for the toxicity of highly lipophilic OS compounds and possibly for their pharmacological and therapeutic actions. The mechanisms underlying the neurotoxicity of OS compounds and their derivatives have been investigated. When neurotoxicologic effects are considered, the toxicity of OS compounds depends on their chemical form, experimental model, age, physiological state, nutrition and dietary interactions, and the route of administration.

In terms of toxicity, the OS compound ebselen (Figure 1) (molecular weight = 274.2) was more toxic than DPDS (molecular weight

= 310.0) in rats acutely treated by the intraperitoneal route (with an LD₅₀ of 1200 µmol/kg for DPDS and of 400 µmol/kg for ebselen) (31,32). In addition, DPDS was more toxic in mice than rats when administered by the intraperitoneal route (LD₅₀ of 210 and 1200 µmol/kg, respectively) and had no acute toxic effects when administered by the subcutaneous route (32).

OS compounds have convulsing activity. Intraperitoneal, but not subcutaneous, administration of DPDS provoked seizures in mice but not in rats. In addition, GABAergic allosteric modulators such as diazepam, phenobarbital and muscimol, and a competitive muscarinic antagonist of the acetylcholine receptor, atropine, were able to consistently abolish or reduce the seizure episodes, suggesting that the modulation of one or more neuronal systems can account for the convulsive effect (33,34).

DPDS also affected several neuronal processes. It inhibited the binding of (³H)-glutamate, (³H)-MK-801, and unstable (³H)-guanylyl-iminodiphate (GMP-PNP) to rat synaptic membrane preparations after both *in vitro* and *ex vivo* exposure; these are important indicators of glutamatergic system functionality (18). An inhibitory effect on (³H)-glutamate and (³H)-MK-801 binding indicated that the toxicologic properties of DPDS may be related, at least in part, to the inhibition of the physiological excitatory neurotransmitter system. Experimental results from acute exposure (25 µmol/kg) showed that DPDS drastically reduced (³H)-GMP-PNP binding to G-proteins and the response of adenylate cyclase activity to GMP-PNP, and also increased basal adenylate cyclase activity, suggesting a direct effect on this enzyme. This study also revealed reduction of (³H)-glutamate uptake by brain synaptosomes (18). In human platelets this molecule caused a significant inhibition of Na⁺-independent glutamate binding to the membrane. In the same

study, it inhibited (³H)-glutamate uptake (18).

Calcium channels, mediating Ca²⁺ influx, play a central role in neurotransmission and chemical agents that potentially interfere with Ca²⁺ homeostasis are potential toxic agents. DPDS reduced ⁴⁵Ca influx into isolated nerve endings of rat synaptosomes when a non-depolarizing condition was used or when 4-aminopyridine was used as a depolarizing agent (35). However, the same effects were not observed on excitotoxicity induced by glutamate in an isolated chick retina model (36).

In summary, the neurotoxic effects of DPDS could result from its action at different levels of neural signal transduction pathways, certainly involving other neurotransmitters besides the glutamatergic system.

Pharmacological effects

The pharmacology of synthetic OS compounds that have been subjected to more than just a biological screening was critically evaluated in a review by Parnham and Graf (37, and see Refs. 1,6). During the past decade, a lot of effort has been directed toward the development of stable OS compounds that could be used as antioxidants, enzyme inhibitors, anti-tumor and anti-infectious agents, cytokine inducers, and immunomodulators (1). In addition, many compounds have been studied. In this section, we explore the potential pharmacological applications of DPDS.

Antioxidant effects

The essential dietary trace element selenium plays a crucial role in the catalytic center of GPX, an enzyme that catalyzes the reduction of various hydroperoxides by GSH and scavenges ROS, thus protecting cells against oxidative stress (3). However, GPX has some shortcomings, e.g., instability, poor

availability and high molecular weight. These drawbacks limit its therapeutic application and research has, therefore, centered on developing synthetic drugs with superior performance (6,38-40).

Research in recent years has provided solid evidence for the role of ROS in human disease and this knowledge has led to new ideas for the therapy of a variety of diseases. The concept that selenium-containing molecules may be better nucleophiles than classical antioxidants has led to the design of synthetic OS drugs. Intensive research in OS biochemistry during the last two decades has yielded a variety of compounds with potential antioxidant activity, including ebselen analogues, benzoselenazolinones, selenamide and related derivatives, diaryl diselenides, various tellurides and ditellurides, and the semi-synthetic enzyme selenosubtilisin (1,3,41). The promising compound ebselen is an example of such a molecule; it has antioxidant properties and is known as the most important glutathione peroxidase mimetic agent. Unlike inorganic selenium and selenomethionine, it is not toxic to mammals since it contains bound selenium and thus does not contribute to the cellular selenium pool (7,39,40).

The properties of some synthetic diselenides suggest that the cleavage and reduction of their diselenide bond produces the selenol group, and therefore the diselenides were successful in mimicking GPX (1). Diselenides are good candidates as antioxidant agents because they have some chemical and biochemical characteristics in common with ebselen (18). Of particular importance, DPDS has been shown to be even more active as a GPX mimetic and less toxic to rodents than ebselen (31,32).

The *in vitro* catalytic activity of DPDS in hydrogen peroxide decomposition was studied by the method that uses benzenethiol as an alternative to GSH. The initial rates of

hydrogen peroxide reduction by thiol in the presence of various catalysts were determined in methanol medium by monitoring the UV absorption at 305 nm due to the formation of DPDS. In this system, DPDS exhibits good initial rates of hydrogen peroxide reduction (0.55 against 0.15 $\mu\text{M}/\text{min}$ in the absence of catalysts). Indeed, DPDS exhibits GPX-like activity and low-GSH oxidase activity; in the presence of a 10-fold excess of GSH, the diselenide bond in DPDS is reduced to form selenol as the predominant species, which reacts very rapidly with 0.5 equivalents of t-butyl-hydroperoxide (23). The reduction of the diselenide bond in DPDS by GSH may not be an easy reaction, since the redox potential of GSH ($E_0 = -240 \text{ mV}$) is much higher than that of the bond ($E_0 = -380 \text{ mV}$) (1,18,23).

DPDS, as well as ebselen, reduced the spontaneous and quinolinic acid- and sodium nitroprusside-induced TBARS in rat brain homogenates to basal rates, demonstrating its antioxidant activity (41,42). The antioxidant potential, thiol peroxidase activity and rate of DTT and GSH oxidation have been evaluated in rats and mice. DPDS also efficiently reduced lipid peroxidation in mouse and rat brain, with similar results apart from species differences. It also exhibited high-thiol peroxidase activity and demonstrated better antioxidant potential than the other diselenide substitutes tested (41,42).

DPDS has been recently shown to be effective in restoring acute cadmium-induced oxidative damage in mouse testes, and more effective than the chelating compounds succimer and 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (43-46). Lipid peroxidation has long been considered to be the primary mechanism for cadmium toxicity despite its inability to generate free radicals under physiological conditions. Thus, it is believed that an antioxidant should be one of the important components of an effective treatment

for cadmium poisoning. Santos and co-workers (44) clearly showed the ability of DPDS therapy to restore enhancement of TBARS levels caused by sub-chronic cadmium exposure in liver and brain of mice. This indicates that the use of DPDS as an antioxidant might be useful in the treatment of cadmium poisoning since it has the capacity to alleviate many of the harmful effects of cadmium. Unexpectedly, DPDS treatment potentiated the testicular damage caused by cadmium in a model using sub-chronic cadmium exposure. This finding again indicated the pro-oxidant capacity of DPDS, and the two-face properties of OS compounds.

DPDS also protects against inhibition of liver ALA-D during paracetamol intoxication by its antioxidant GPX mimetic activity (18). Recently, an *in vitro* evaluation of the antioxidant effect of DPDS against sodium nitroprusside-induced lipid peroxidation was carried out. At 2 μM , this OS molecule significantly protected human platelets and restored GPX activity. These phenomena seem to be related to its thiol peroxidase-like activity (47). Hence DPDS is a promising antioxidant molecule.

However, although the peroxidase-like activity of diselenides may account for their antioxidant properties, the thiol-diselenide exchange catalyzed by chalcogenides may contribute to their toxicologic properties by oxidizing relevant thiol-containing metabolites and proteins without consuming toxic substances like peroxides. Selenides can react with -SH groups, forming selenosulfide or -SeH and metabolites.

In contrast, using assays such as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene complex formation and UV absorption, our group has recently shown that DPDS can spontaneously react with GSH, forming stable adducts. This property confers not an antioxidant but a pro-oxidant ability, a common paradox in the biological effects of OS. Thus, the main reactions be-

tween DPDS and thiols are oxidation and conjugation. These results have been obtained *in vivo* using ALA-D inhibition and the investigation of pro-oxidant activity in *S. cerevisiae*, as previously mentioned (21).

Liver and kidney

The hepatic toxicity of DPDS was the first of its biological properties to be studied. The acute toxicity of DPDS in the male Swiss mouse was enhanced by pre-treatment with phenobarbital, which induces the cytochrome P-450 system. In this study, DPDS decreased hepatic GSH content by 50% after 1 h and OS metabolites were found in urine but not in bile or feces (48). DPDS was more toxic to mice than rats when administered by the intraperitoneal route and had no toxic effects when administered subcutaneously (31). However, at higher doses DPDS did not alter hepatic enzyme activity and did not change urea or creatinine parameters, suggesting no renal toxicity (31). Several research groups have demonstrated that liver damage is a therapeutic target of OS compounds, as well as the various clinical conditions in which oxidative stress plays a main role (18).

Pre-treatment with DPDS prevented hepatotoxicity and cellular damage in the rat liver exposed to 2-nitropropane and suggested that the administration of 100 $\mu\text{mol/kg}$ could be effective in mitigating the hazards of 2-nitropropane exposure through its antioxidant properties, increasing superoxide dismutase and catalase activities (49,50). It has also been reported to act as a hepatoprotector in diabetic rats (51). In addition, DPDS protected against acute renal damage, as demonstrated by a decrease in urea levels in rats exposed to 2-nitropropan. The mechanism involved is the increase of catalase and superoxide dismutase activity and again it is correlated with the antioxidant potential

of DPDS (50). These studies provide practical indications of the benefits of DPDS administration in protecting humans against a variety of hazardous environmental toxicants that induce liver and kidney damage.

Gastric mucosa

The major side effect of all non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is damage to the gastric mucosa. In this respect, it is of considerable importance that OS compounds have no such irritant or damaging effect. DPDS has been recently reported to prevent ethanol- and indomethacin-induced ulcers, as well as to inhibit gastric acid secretion in pylorus-ligated rats. It also protects against mucosal damage by inhibiting the oxidation of the SH groups of H⁺-K⁺ ATPase. This effect on the enzyme responsible for acid secretion can counteract the undesirable side effects caused by NSAIDs. Thus, as anti-inflammatory drugs, OS compounds are versatile with regard to gastric ulcers because not only do they block the inflammatory cascade, which can impair gastric endogenous protective factors against HCl, but also inhibit HCl secretion. Since the therapeutic approach to a variety of diseases is changing from a single target to a multitarget one, it would be very useful to evaluate the possible synergism of the association of OS compounds with other NSAIDs with respect to the anti-inflammatory response and to the antagonism of gastric ulcer development (18).

Anti-inflammatory activity

The role of ROS in inflammatory disorders has been the subject of intensive investigation. Considerable effort has been expended in the search for low-toxicity scavengers and inhibitors of ROS. One of the approaches has been to investigate synthetic OS compounds that may be therapeutically beneficial for the treatment of inflammatory

diseases.

DPDS displayed the most promising profile against carragenin-induced paw edema; *p*-methoxyphenyl diselenide and *p*-chlorodiphenyl diselenide (Figure 1) were less efficient, *p*-methylidiphenyl diselenide (Figure 1) being the weakest. DPDS has also been demonstrated to be an anti-nociceptive compound, having an effective action in experimental models such as tail-flick, formalin, acetic acid-induced abdominal writhing, and capsaicin. Interestingly, the anti-nociceptive and anti-inflammatory potency of DPDS was higher than that of ebselen and was not related to opioid mechanisms (34,52). Indeed, the mechanisms underlying the analgesic action may be related to serotonergic pathways, but still remain unclear.

Neuroprotection

New drugs that preserve neuronal integrity, acting after an ischemic insult, are under investigation, including inducible nitric oxide synthase inhibitors, antioxidants, glutamate antagonists, and calcium channel blockers. Data from clinical trials have consistently demonstrated that the OS compound ebselen reduced brain damage in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and improved the outcome of acute ischemic stroke, suggesting that ebselen may be a promising neuroprotective agent (18,40).

In this context, reports on the neuroprotective effects of other GPX mimetics have appeared in the literature in recent years. DPDS has shown a neuroprotective role in an *in vitro* ischemia model using oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices. It simultaneously prevented two effects in this model: cell death and increase in inducible nitric oxide synthase immunoreactivity. These effects were dose-dependent and were stronger than those of ebselen (53).

The effects of systemic administration of DPDS on memory formation were studied using the novel object recognition task in mice. Novel object recognition is a type of non-aversive, non-spatial memory that requires glutamate receptor activation in the hippocampus. The results show that, in acute pre-training, systemic administration of DPDS facilitated novel object recognition in mice without affecting other behavioral parameters such as training performance, short-term memory or total time spent exploring both objects. In addition, ebselen was shown to induce memory-impairing effects in an inhibitory avoidance task in rats when infused post-training into the dorsal hippocampus (54). However, DPDS facilitated novel object recognition in mice (55).

In neurodegenerative diseases, the cytoskeleton is abnormally assembled and impairment of neurotransmission occurs. Cumulative evidence suggests that neurodegenerative diseases and psychiatric illness are associated with cytoskeleton and loss of sympathetic connectivity and of the ability to transmit incoming axonal information to the somatodendritic domain. DPDS prevented the inhibitory effects of the neurotoxicant methylmercury on the *in vitro* phosphorylation of intermediate filament cytoskeletal proteins in slices of cerebral cortex of rats, but did not prevent the hyperphosphorylation induced by diphenyl ditelluride (56,57).

Tardive dyskinesia is a motor side effect of long-term treatment with typical neuroleptics; it involves involuntary movements of the face, mouth and tongue, but different parts of the body may be affected. An animal model for tardive dyskinesia is obtained by the acute administration of reserpine to rats; this produces persistent oral dyskinesia. The pathophysiology of the syndrome is unclear, but the neurodegeneration is linked to oxidative stress. Burger and co-workers (58,59)

used this model to study the effect of DPDS on behavioral and neurochemical parameters after acute reserpine administration to old rats (15 months). The results showed that the antioxidant properties of DPDS, as well as its anti-inflammatory properties, had only a modest effect in this animal model (58). This OS molecule also reverses haloperidol-induced orofacial dyskinesia, another model for studying this extrapyramidal syndrome, possibly by its antioxidant properties (59).

Recently, using DPDS as a prototype compound, the diselenide-structural analog 3'3'-ditrifluoromethylidiphenyl diselenide (DFDD, Figure 4) was developed. DFDD has been shown to attenuate apomorphine-induced stereotypy at a dose which did not affect other behavioral parameters, clearly indicating an antipsychotic potential (60). In addition, this derivative is less toxic than DPDS and does not induce seizures in mice (30). As is the case for DPDS, DFDD decreased lipoperoxidation in mouse and rat brain (41).

Concluding remarks

Characteristically, all OS compounds (including DPDS) show interesting biological effects in different models and species (Table 2), but they also exhibit paradoxical pharmacological properties that cannot be easily explained by the current biochemical methodologies. DPDS has antioxidative properties both *in vitro* mammalian cell cultures and in murine models, despite the inhibition of ALA-D. On the other hand, DPDS shows pro-oxidative properties in yeast cells, which could be explained by the depletion of cellular glutathione. Another paradoxical effect of DPDS, observed in murine models, is its mechanism of action on the central nervous system. Although DPDS antagonizes the NMDA glutamatergic receptor, which impairs the formation of memory, this com-

Table 2. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models.

Pharmacology			Toxicology		
Effect	Model	References	Effect	Model	References
Antioxidative effects	Chemical systems: glutathione peroxidase and thiol peroxidase activities; protective against sodium nitroprusside-induced lipid peroxidation	1,18,23	Thiol group oxidation	Chemical systems	8
	Murine models: quinolinic acid- and sodium nitroprusside-induced TBARS in rat brain homogenates and against oxidative stress induced by cadmium chloride	18,41-46		Murine models Inhibition of ALA-D in several organs and tissues in mammals	14,16 17-19
Neuroprotective agent	<i>In vitro</i> ischemia model using oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices	53	GSH depletion	Chemical systems: CDNB complexation and GSH-DPDS interaction	16,21
	Protection against methylmercury effects on the <i>in vitro</i> phosphorylation of intermediate filament cytoskeletal proteins in slices of rat cerebral cortex	56,57		Yeast strains (wild-type and antioxidant defense defective strains)	21
Hepatoprotective effect	Hepatotoxicity induced by 2-nitropropane in rats	49,50		V79 cell culture	25
Gastric mucosal protection	Ethanol and indomethacin-induced ulcers in rats	18	Neurotoxic effects Genotoxic and mutagenic	Impairment of glutamatergic transmission in mice and rats	18,33,34
	Pylorus-ligated rats	18		Ames test	4
Cognitive enhancer	Novel object recognition task in mice	55		Mutagenesis and recombinogenesis in yeast	4
Anti-inflammatory	Carragenin-induced paw edema in mice	34,52		Comet assay and micronucleus evaluation in V79 cells	25
Antinociceptive properties	Tail-flick test in mice	34,52		Comet assay in MCF7 cells	Present study
	Acetic acid-induced abdominal writhing in mice	34,52	Teratogenic evidence	Murine models	26-28
	Formalin-induced abdominal writhing in mice	34,52			
	Capsaicin effects in mice	34,52			
Effect in animal models of tardive dyskinesia	Acute administration of reserpine to old rats	58			
	Haloperidol-induced orofacial dyskinesia in rats	59			

TBARS = thiobarbituric acid reactive substances; ALA-D = δ -aminolevulinatase; GSH = glutathione; CDNB = 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; DPDS = diphenyl diselenide.

compound is able to stimulate memory formation in mice. Unfortunately, the biochemical principles that drive this phenomenon are largely unknown and more empirical data are necessary to conclude how DPDS act on the nervous system.

Taking into account all the biological effects of DPDS and the other OS compounds reviewed here, more experiments are needed to elucidate how they act on eukaryotic cells. Once a clearer picture emerges, it might be possible to synthesize new OS substances specifically applicable

to clinically important metabolic routes.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Christine Gaylarde (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil), Dr. Martin Brendel (Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil) and Dr. Cristina Pungartnick (Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil) for critically reading the manuscript.

References

- Mugesh G, du Mont WW, Sies H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev* 2001; 101: 2125-2179.
- Birringer M, Pilawa S, Flohe L. Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* 2002; 19: 693-718.
- Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med* 2005; 26: 256-267.
- Rosa RM, Sulzbacher K, Picada JN, Roesler R, Saffi J, Brendel M, et al. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutat Res* 2004; 563: 107-115.
- Tsen CC, Tappel AL. Catalytic oxidation of glutathione and other sulfhydryl compounds by selenite. *J Biol Chem* 1958; 233: 1230-1232.
- Aboul-Fadi T. Selenium derivatives as cancer preventive agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005; 5: 637-652.
- Ganther HE. Selenium metabolism and mechanisms of cancer prevention. *Adv Exp Med Biol* 2001; 492: 119-130.
- Levander OA, Morris VC, Higgs DJ. Selenium as a catalyst for the reduction of cytochrome c by glutathione. *Biochemistry* 1973; 12: 4591-4595.
- Chen GP, Ziegler DM. Liver microsome and flavin-containing monooxygenase catalyzed oxidation of organic selenium compounds. *Arch Biochem Biophys* 1994; 312: 566-572.
- Ganther HE. Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochemistry* 1971; 10: 4089-4098.
- Jaffe EK. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J Bioenerg Biomembr* 1995; 27: 169-179.
- Markham GD, Myers CB, Harris KA Jr, Volin M, Jaffe EK. Spatial proximity and sequence localization of the reactive sulfhydryls of porphobilinogen synthase. *Protein Sci* 1993; 2: 71-79.
- Emanuelli T, Pagel FW, Alves LB, Regner A, Souza DO. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. *Neurochem Int* 2001; 38: 213-218.
- Barbosa NB, Rocha JB, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC, Braga AL. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 149: 243-253.
- Folmer V, Bolzan RC, Farina M, Zeni G, Nogueira CW, Emanuelli T, et al. Mechanism of delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition by phenyl selenoacetylene involves its conversion to diphenyl diselenide. *Toxicology* 2005; 206: 403-411.
- Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JB. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14: 310-319.
- Farina M, Barbosa NB, Nogueira CW, Folmer V, Zeni G, Andrade LH, et al. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase from rat liver and cucumber leaves. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 623-631.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104: 6255-6285.
- Nogueira CW, Borges VC, Zeni G, Rocha JB. Organochalcogens effects on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells *in vitro*. *Toxicology* 2003; 191: 169-178.
- Fachinetto R, Pivetta LA, Farina M, Pereira RP, Nogueira CW, Rocha JB. Effects of ethanol and diphenyl diselenide exposure on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver and brain. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 588-594.
- Moreira RR, de Oliveira RB, Saffi J, Braga AL, Roesler R, Dal-Pizzol F, et al. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sci* 2005; 77: 2398-2411.
- Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43: 143-181.
- Mugesh G, Panda A, Singh HB, Puneekar NS, Butcher RJ. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study. *J Am Chem Soc* 2001; 123: 839-850.
- Noll DM, Mason TM, Miller PS. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev* 2006; 106: 277-301.
- Rosa R, do Nascimento Picada J, Saffi J, Henriques J. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutat Res* 2006; 628: 87-98.

26. Favero AM, Weis SN, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 2005; 20: 561-568.
27. Favero AM, Weis SN, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. Adult male rats sub-chronically exposed to diphenyl diselenide: Effects on their progeny. *Reprod Toxicol* 2007; 23: 119-123.
28. Stangherlin EC, Favero AM, Weis SN, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. Assessment of reproductive toxicity in male rats following acute and sub-chronic exposures to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 662-669.
29. Maciel EN, Flores EM, Rocha JB, Folmer V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003; 70: 470-476.
30. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88: 119-125.
31. Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* 2003; 143: 9-16.
32. Nogueira CW, Meotti FC, Curte E, Pilissao C, Zeni G, Rocha JB. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 2003; 183: 29-37.
33. Brito VB, Folmer V, Puntel GO, Fachineto R, Soares JC, Zeni G, et al. Diphenyl diselenide and 2,3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice. *Brain Res Bull* 2006; 68: 414-418.
34. Nogueira CW, Quinhones EB, Jung EA, Zeni G, Rocha JB. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 2003; 52: 56-63.
35. Moretto MB, Rossato JI, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Voltage-dependent ebselen and diorganochalcogenides inhibition of 45Ca^{2+} influx into brain synaptosomes. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 154-160.
36. Centuriao FB, Corte CL, Paixao MW, Braga AL, Zeni G, Emanuelli T, et al. Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. *Brain Res* 2005; 1039: 146-152.
37. Pamham MJ, Graf E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog Drug Res* 1991; 36: 9-47.
38. Geoghegan M, McAuley D, Eaton S, Powell-Tuck J. Selenium in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12: 136-141.
39. Sies H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 313-323.
40. Schewe T. Molecular actions of ebselen - an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 1153-1169.
41. Rossato JI, Ketzer LA, Centuriao FB, Silva SJ, Ludtke DS, Zeni G, et al. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 2002; 27: 297-303.
42. Meotti FC, Stangherlin EC, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JB. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 2004; 94: 276-282.
43. Santos FW, Oro T, Zeni G, Rocha JB, do Nascimento PC, Nogueira CW. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol Lett* 2004; 152: 255-263.
44. Santos FW, Zeni G, Rocha JB, do Nascimento PC, Marques MS, Nogueira CW. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 1723-1730.
45. Santos FW, Zeni G, Rocha JB, Weis SN, Fachineto JM, Favero AM, et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact* 2005; 151: 159-165.
46. Santos FW, Graca DL, Zeni G, Rocha JB, Weis SN, Favero AM, et al. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 546-550.
47. Posser T, Moretto MB, Dafre AL, Farina M, da Rocha JB, Nogueira CW, et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an *in vitro* evaluation. *Chem Biol Interact* 2006; 164: 126-135.
48. Adams WJ Jr, Kocsis JJ, Snyder R. Acute toxicity and urinary excretion of diphenyldiselenide. *Toxicol Lett* 1989; 48: 301-310.
49. Borges LP, Borges VC, Moro AV, Nogueira CW, Rocha JB, Zeni G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 2005; 210: 1-8.
50. Borges LP, Nogueira CW, Panatieri RB, Rocha JB, Zeni G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 99-107.
51. Barbosa NB, Rocha JB, Wondracek DC, Perottoni J, Zeni G, Nogueira CW. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chem Biol Interact* 2006; 163: 230-238.
52. Savegnago L, Pinto LG, Jesse CR, Alves D, Rocha JB, Nogueira CW, et al. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 2007; 555: 129-138.
53. Ghisleni G, Porciuncula LO, Cimarosti H, Batista TR, Salbego CG, Souza DO. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immuncontent. *Brain Res* 2003; 986: 196-199.
54. Porciuncula LO, Schmidt AP, Coitinho AS, Vinade L, Izquierdo I, Rocha JB, et al. Intra-hippocampal infusion of ebselen impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 451: 165-169.
55. Rosa RM, Flores DG, Appelt HR, Braga AL, Henriques JA, Roesler R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett* 2003; 341: 217-220.
56. Moretto MB, Funchal C, Zeni G, Rocha JB, Pessoa-Pureur R. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* 2005; 210: 213-222.
57. Funchal C, Moretto MB, Vivian L, Zeni G, Rocha JB, Pessoa-Pureur R. Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* 2006; 222: 143-153.
58. Burger M, Fachineto R, Calegari L, Paixao MW, Braga AL, Rocha JB. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. *Brain Res Bull* 2004; 64: 339-345.
59. Burger ME, Fachineto R, Wagner C, Perottoni J, Pereira RP, Zeni G, et al. Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. *Brain Res Bull* 2006; 70: 165-170.
60. Machado MS, Rosa RM, Dantas AS, Reolon GK, Appelt HR, Braga AL, et al. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neurosci Lett* 2006; 410: 198-202.



CAPÍTULO - II

Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts

Mutation Research 628:87-98, 2007.



Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts

Renato Moreira Rosa^a, Jaqueline do Nascimento Picada^b,
Jenifer Saffi^{a,b}, João Antonio Pêgas Henriques^{a,b,*}

^a Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil

Received 3 October 2006; received in revised form 4 December 2006; accepted 7 December 2006

Available online 16 December 2006

Abstract

Diphenyl diselenide (DPDS) is an electrophilic reagent used in the synthesis of a variety of pharmacologically active organic selenium compounds, and may increase the risk of human exposure to this chemical at the workplace. In a previous study, we demonstrated the pro-oxidant action and the mutagenic properties of this compound on bacteria and yeast. In the present study, we evaluated the putative cytotoxic, pro-oxidant, genotoxic, and mutagenic properties of this molecule in V79 Chinese lung fibroblast cells. When cells were treated with increasing concentrations of DPDS, its cytotoxic activity, as determined using four cell viability endpoints, occurs in doses up to 50 μ M. The MTT reduction was stimulated, which may indicate reactive oxygen species (ROS) generation. Accordingly, the treatment of cells for 3 h with cytotoxic doses of DPDS increased TBARS levels, and sensitized cells to oxidative challenge, indicating a pro-oxidant effect. The measurement of total, reduced, and oxidized glutathione showed that DPDS can lead to lower intracellular glutathione depletion, with no increase in the oxidation rate in a dose- and time-dependent manner. At the higher doses, DPDS generates DNA strand breaks, as observed using the comet assay. The treatment also induced an increase in the number of binucleated cells in the micronucleus test, showing mutagenic risk by this molecule at high concentrations. Finally, pre-incubation with *N*-acetylcysteine, which restored GSH to normal levels, annulled DPDS pro-oxidant and genotoxic effects. These findings show that DPDS-induced oxidative stress and toxicity are closely related to intracellular level of reduced glutathione. Moreover, at lower doses, this molecule has antioxidant properties, protecting the cell against oxidative damage induced by hydrogen peroxide.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Diphenyl diselenide; V79 cells; Genotoxicity; Oxidative stress

1. Introduction

During the last decades, the interest in organoselenium (OS) biochemistry has been intensified after the pharmacology of synthetic OS compounds revealed molecules that could be used as antioxidants, enzyme inhibitors, neuroprotectors, anti-tumor and anti-infectious agents, cytokine inducers, and immunomodulators [1]. Diphenyl diselenide (DPDS) is a simple and stable OS compound. As it is an elec-

* Corresponding author at: Departamento de Biofísica, Prédio 43422, Laboratório 210 Campus do Vale, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33166069; fax: +55 51 33167003.

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (J.A.P. Henriques).

trophilic reagent, it is used in the synthesis of a variety of pharmacologically active OS compounds [2]. The biological activities of DPDS make these compounds good candidates for therapeutical applications, as they present very interesting pharmacological effects. DPDS reduces the production of reactive oxygen species (ROS) in rat brain homogenates, increases the basal activity of adenylyl cyclase, and inhibits glutamate and MK-801 binding in the synaptic membranes of rats. Furthermore, it exhibits high thiol peroxidase activity, and better antioxidant potential as compared to other tested diselenides substitutes [1]. The systemic administration of DPDS promotes the formation of long-term object recognition memory in mice, and presents a neuroprotective effect in *in vitro* models of brain ischemia, and in reserpine-induced orofacial dyskinesia in rats. A study demonstrated that DPDS prevented the neurotoxic effects of methylmercury, as well as its hepatoprotector effects, anti-ulcer activity, and interestingly, the antinociceptive and anti-inflammatory potency of DPDS was shown to be higher than that of ebselen [1].

However, DPDS also presents toxic effects as it inhibits δ -aminolevulinic acid dehydratase in several tissues and organs. Moreover, chronic exposure of the mouse brain to high doses of DPDS affects the central nervous system, causing seizures, and impairment of glutamatergic transmission, and excitotoxicity, as well as liver and renal toxicity [1]. In microorganism models, DPDS was able to induce frameshift mutations in both *Salmonella typhimurium* and haploid yeast, as well as to increase crossing over and gene conversion frequencies in diploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* [2]. Despite of the many *in vitro* and *in vivo* studies carried out on DPDS toxicity, few investigations evaluated cellular damage or the molecular mechanism responsible for DPDS-induced toxicity. Recently, we showed that, in the yeast *S. cerevisiae*, DPDS acts as a pro-oxidant agent by depleting free glutathione, probably via adduct formation, thus sensitizing the cell to the damaging effect of ROS [3].

The aim of the present study was to investigate the cytotoxic effects of DPDS in cultured mammalian cells, focusing on its effects on cell redox status, genotoxicity, and mutagenicity, using a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters (V79 cells). This study is relevant to determine occupational hazards, to evaluate the safety of possible future pharmacological application, and to explore new biological properties of this compound. For this purpose, we determined its cytotoxicity using four different endpoints, and evaluated both glutathione depletion and lipid peroxidation after DPDS exposure. In order to obtain a complete evalua-

tion of toxic effects of this OS compound in mammalian cells, DPDS-induced DNA damage was estimated by using the comet assay and micronucleus test.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

DPDS (CAS registry number 1666-13-3) was provided by Dr. Antônio Braga, Federal University of Santa Maria, Brazil. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, antibiotics, and trypan blue (TB) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), NADPH, glutathione reductase, thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP), *N*-acetyl-cysteine (*N*-ac), neutral red (NR), 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT), 5,5'-dithionitrobenzoic acid (DTNB), cytochalasin-B (Cyt-b), methyl methanesulfonate (MMS), cyclophosphamide (CP), hydrogen peroxide (H_2O_2), and 4-vinyl-pyridine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The S9 fraction, prepared from livers of Sprague-Dawley rats, pre-treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254, was purchased from Moltex (Annapolis, MD, USA). All others reagents were of analytical grade.

2.2. Cell culture and treatments

V79 cells were cultured under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated-FBS, 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Cells were kept in tissue-culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 in air, and were harvested by treatment with 0.15% trypsin-0.08% EDTA in phosphate-buffered saline solution (PBS). Cells were seeded (3×10^6 cells) in 5 mL complete medium in a 25-cm² flask, and grown for 2 days up to 60–70% confluence before the treatment with the test substance. DPDS was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and added to FBS-free medium to achieve the different designed concentrations. The final DMSO concentration in the medium never exceeded 0.2%, and the control group was exposed to an equivalent concentration of solvent. Cells were pre-treated with 5 mM *N*-ac for 24 h in complete medium. Oxidative challenge with 150 μ M H_2O_2 was carried out for 1 h in the dark in FBS-free medium.

2.3. Cytotoxicity evaluation

Four independent endpoints for cytotoxicity were evaluated: MTT reduction assay (MTT), determination of nucleic acid content (NAC), neutral red uptake assay (NRU), and trypan blue exclusion method (TB).

2.3.1. NAC

Cell number in control and treated cell wells was estimated based on their total nucleic acid content, according to Cingi et al. [4]. Cells were washed twice with ice-cold PBS, and a soluble nucleotide pool was extracted with cold ethanol. The cell pellet was dissolved in 0.5 M NaOH at 37 °C for 1 h, and absorbance at 260 nm of the NaOH fraction was used as an index of cell number. Results are expressed as mean percentage of absorbance at 260 nm in treated cells as compared to controls.

2.3.2. NRU

This assay was performed according to the method described by Borefreund and Puerner [5]. After incubation for 4 h in serum-free medium containing 50 µg/mL NR, cells were quickly washed with PBS, and then 0.1 mL of a solution of 1:50 (v/v) acetic acid:ethanol was added to each sample to extract the dye. After rapid stirring, absorbance was read at 540 nm. Results are expressed as mean percentage of absorbance at 540 nm in treated cells as compared to controls.

2.3.3. MTT

MTT reduction was performed according to Denizot and Lang [6]. Briefly, cells were washed once with PBS before adding 0.1 mL serum-free medium containing yellow tetrazolium salt MTT dye 1 mg/mL to each sample. After incubation for 4 h, the supernatant was removed, and the obtained purple formazan product was dissolved in 1 mL ethanol, stirred for 15 min, and the absorbance was read at 570 nm. Results are expressed as mean percentage of absorbance at 570 nm in treated cells as compared to controls.

2.3.4. TB

Cell viability was measured by TB exclusion, as previously described [7]. After submitted to the treatments, cells were stained with 50 µL of 0.4% TB, and centrifuged at 320 × g for 15 min. Cells were then lysed with 1 M NaOH, and the TB/cell suspension mixture was used to determine cell death by measuring absorbance at 590 nm. Untreated cultured cells were used as the 100% viability value.

2.4. Measurement of lipid peroxidation

The extent of DPDS-induced lipid peroxidation was determined by the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA), a product formed by lipid peroxidation. The assays were performed according to Salgo and Pryor [8], with minor modifications. V79 cells (3×10^6 cells) were incubated with various concentrations of DPDS for 3 h in FBS-free medium, and after lysis with Tris–HCl (15 mM for 1 h). Two milliliters 0.4 mg/mL TCA, 0.25 M HCl were added to the lysate, which was then incubated with 6.7 mg/mL TBA for 15 min at 100 °C. The mixture was centrifuged at 750 × g for 10 min. As TBA reacts with other products of lipid peroxidation in addition to MDA, results are expressed in terms of thiobarbituric reactive species (TBARS), which were determined by absorbance at 532 nm.

Hydrolyzed TMP was used as the standard. The results were normalized by protein content [9].

2.5. Determination of total glutathione, GSH and GSSG

Total glutathione (GSH plus GSSG) was determined by photometric determination of 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), which was produced from DTNB in a kinetic assay, according Akerboom and Sies [10] with minor modifications. Briefly, V79 cells (3×10^6 cells) were incubated with various concentrations of DPDS for 3 h in FBS-free medium. After being submitted to the experimental treatments, cells were harvested and washed with ice-cold PBS. Cells were then suspended in 0.1 M sodium phosphate–5 mM EDTA pH 8.0, and sonicated to obtain the cell homogenate. An equal volume of 2 M HClO₄–4 mM EDTA was added to the cell extract, and the precipitated proteins were sedimented by centrifugation at 8000 × g for 10 min at 4 °C. The supernatant was neutralized with 2 M KOH and 0.3 M Mops, and the insoluble residue was removed by centrifugation under the same conditions. For the spectrophotometric determination, 910 µL of the cell extract supernatant or of the standard glutathione solution, in the same phosphate–EDTA buffer, were mixed with 50 µL of 4 mg/mL NADPH in 0.5% (w/v) NaHCO₃, 20 µL of 6 U/mL glutathione reductase in phosphate–EDTA buffer, and 20 µL of 1.5 mg/mL DTNB in 0.5% NaHCO₃. The increase in absorbance was measured at 412 nm. Total glutathione content was determined in nmol/10⁶ viable cells. For GSSG determination, 4-vinylpyridine was added to a final concentration of 0.1% (v/v), and then incubated for 1 h at room temperature. At this concentration, 4-vinylpyridine is able to react with all GSH without interfering with the GSSG determination. GSH was determined based on the total glutathione and GSSG concentration results.

2.6. Comet assay

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [11], with minor modifications [12,13]. V79 cells were incubated with various concentrations of DPDS for 3 h in FBS-free medium. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in complete medium. Then, 20 µL of cell suspension (3×10^6 cells/mL) were dissolved in 0.75% low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. Agarose was allowed to set at 4 °C for 5 min. The slides were then incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0) at 4 °C for at least 1 h in order to remove cellular proteins and membranes, leaving the DNA as “nucleoids”. After the lysis procedure, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit. The unit was filled with fresh buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0), which covered the slides for 20 min at 4 °C in order to allow DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V

(300 mA). All the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water, and stained using a silver staining protocol as described in [14]. After staining step, gels were left to dry at room temperature overnight, and analyzed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of two replicate slides) were selected, and analyzed for the concentration of each test substance. When selecting cells, edges and cells around air bubbles were avoided [13]. These cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, without a tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with a tail length 1–2x the diameter of the head; (4) class 3: with a tail longer than 2x the diameter of the head; (5) class 4: comets with no heads. A value (damage index) was assigned to each comet according to its class. Damage index (DI) and damage frequency (DF) were emphasized in our analyses. The other parameters, as well as image length (IL), although considered in the analyses, were used only as complementary DNA damage parameters. Damage index ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4) [12–15]. Damage frequency (%) was calculated based on number of cells with tails as compared with those with no tail. The vehicle was used as negative control, and MMS treatment at 4×10^{-5} M for 1 h was used as positive control in absence of metabolism, and 1.5×10^{-5} M CP in presence of metabolism. In the experiment involving metabolic activation, the S9 mix was prepared according to [16]. Cells were incubated with S9 mix for 30 min, and then treated with several concentrations of DPDS at 37 °C for 20 min.

2.7. Micronucleus test

The micronucleus assay was performed according to Bonacker et al. [17], with minor modifications. V79 cells were incubated with various DPDS concentrations for 3 h in FBS-free medium. After treatment, cultures were washed twice with the medium, and Cyt-B was added at final concentration of 2 μ g/mL. Cultures were harvested 21 h after Cyt-B addition. Cells were separated from the bottle by trypsinization, and the cellular suspension was centrifuged at 1000 \times g for 5 min. Cells were then resuspended in 0.075 M KCl solution maintained at 4 °C for 3 min (mild hypotonic treatment). Subsequently, cells were centrifuged, and methanol/acetic acid (3:1) solution was carefully added. This fixation step was repeated twice, and finally, cells were resuspended in a small volume of methanol/acetic acid, and dropped onto clean slides. Slides were stained with 10% Giemsa (pH 6.8) for 3–4 min. Slides were mounted, and coded prior to analysis. MMS, at 50 μ g/mL concentration, was used as positive control, and the vehicle as negative control. Micronuclei were counted in 2000 binucleated cells (BNC) with well-preserved cytoplasm. The identification of micronuclei was carried out according to Fenech [18].

2.8. Statistical analysis

All experiments were independently repeated at least three-fold, with triplicate samples for each treatment. Results are expressed as mean \pm S.E.M. and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by test of Tukey. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Cytotoxicity

Dose- and time-dependent changes in the viability in DPDS-treated cells were evaluated based on its effects on cell growth or on metabolic capacity using four endpoints. Results in Fig. 1 show that, at concentrations ranging from 6.25 to 25 μ M, DPDS was not cytotoxic. A significant difference was observed at concentrations > 50 μ M. In the time-course study, a significant decrease in cell viability was observed as early as 1 h (200 μ M) and 3 h (50, 75 and 100 μ M) of DPDS exposure. This finding suggests that DPDS is cytotoxic at exposure doses > 25 μ M. OS exposure showed similar toxicity using NAC, NRU, and TB methods, but apparently lower toxicity to V79 cells as evaluated by MTT reduction up to a 200- μ M concentration, indicating a stimulus on MTT reduction.

3.2. Lipid peroxidation

In order to determine the oxidative damage triggered by DPDS, we examined the dose-dependent degree of lipid peroxidation induced by exposure to this OS molecule. As seen in Fig. 2, panel A, the treatment of cells with DPDS resulted in a dose-dependent increase in TBARS production. This increase was statistically significant after cells were incubated in doses higher than 75 μ M. Pre-incubation with *N*-ac prevented DPDS-generated oxidative damage at all exposure doses, as seen by the reduced levels of TBARS (Fig. 2, panel A).

When cells were treated with DPDS for 3 h before exposure to 150 μ M H_2O_2 for 1 h (Fig. 2, panel B), lipid peroxidation significantly increased, suggesting a pro-oxidant action apart from 75 μ M. On the other hand, the treatment with 6.25, 12.5, and 25 μ M was able to prevent the oxidative damage caused by H_2O_2 , indicating that DPDS provides a clear antioxidant protection at low concentrations (Fig. 2, panel B).

In order to establish if DPDS-induced oxidative stress was closely related to the decrease in the intracellular level of GSH, cells were incubated with 5 mM *N*-ac for 24 h, before the DPDS treatment for 3 h and the oxidative

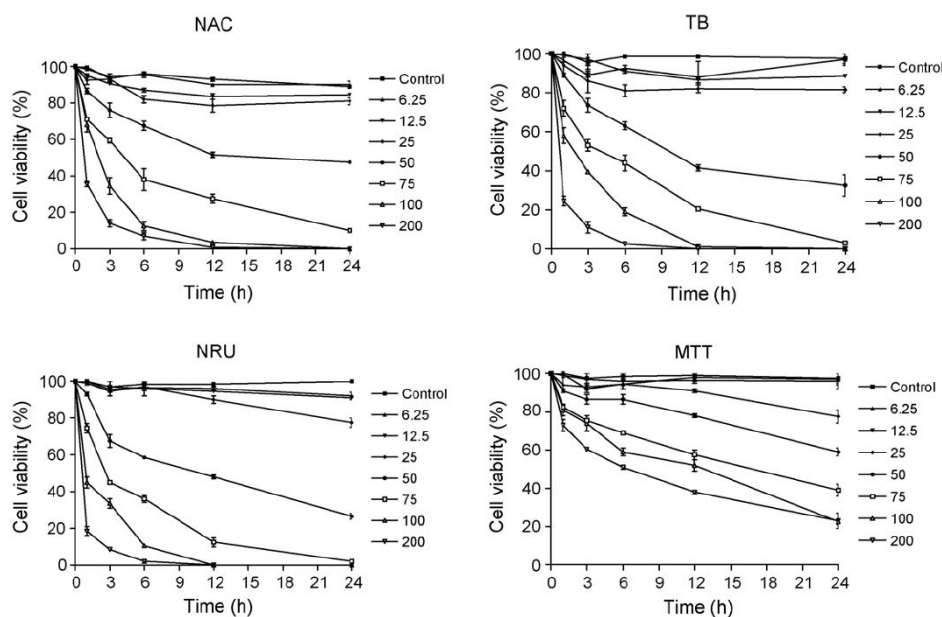


Fig. 1. Dose and time-dependent changes in cell viability as determined in four endpoints in V79 cells: NAC (nucleic acid content), TB (trypan blue exclusion), NRU (neutral red uptake) and MTT (MTT reduction method). Cells were treated with 0 (control), 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, and 200 μM DPDS for 1, 3, 6, 12, and 24 h, respectively. Data are expressed as mean \pm S.D., $n=4$.

challenge with 150 μM H_2O_2 for 1 h. *N-ac* was able to neutralize and to reverse both the oxidant effect of DPDS verified at high doses (Fig. 2, panel A), and the pro-oxidant effect of DPDS (Fig. 2, panel B).

3.3. Effect of DPDS on intracellular thiols

In order to further understand the possible mechanism of oxidative damage involved in the treatment with high concentrations of DPDS, we determined intracellular total glutathione, GSH, and GSSG. There was no obvious change in GSH concentration in cells treated with up to 25 μM DPDS (Fig. 3, panel A). However, treatments with 50, 75, 100, and 200 μM for 3 h significantly reduced the concentration of total intracellular glutathione (GSH), but did not increase GSSG content (Fig. 3, panel A). In the time-course study, cells were treated with 50, 75, 100, and 200 μM , and a significant decrease in intracellular GSH was observed as early as 30 min of incubation (Fig. 3, panel B).

GSH intracellular level in V79 cells was modulated prior to DPDS exposure by incubation for 24 h with 5 mM *N-ac*. As seen in Fig. 4, the intracellular GSH content increased with *N-ac* pre-treatment. Moreover, under such conditions, DPDS-treated cells were protected against a decrease in GSH level.

3.4. Effect on DNA integrity

Considering the cytotoxic and pro-oxidant properties of DPDS, we investigated if this compound could induce DNA damage under these experimental conditions. The *in vitro* alkaline (pH > 13) comet test and micronucleus test are the most frequently used assays for routine screening of potential genotoxic agents [19], and can be performed with a variety of cell types, including V79 cell lines. V79 cells were selected in our study because they have stable karyotype, short generation time, and are easy to maintain. While the alkaline version of the Comet assay [11] detects primary (repairable) DNA single and double strand breaks and alkali-labile sites, the micronucleus test detects DNA lesions that lead to chromosome mutations.

DPDS did not generate significant DNA damage at doses < 50 μM , either with or without metabolization. At doses 75, 100, and 200 μM , it induced DNA damage in a dose–response manner (Table 1). Fig. 5 shows the distribution of damaged cells amongst comet classes. Significant increase of grade III, and particularly of grade IV cells, was observed when cells were treated with doses up to 75 μM DPDS in a dose–response manner. For cells treated with 100 or 200 μM , almost all cells were

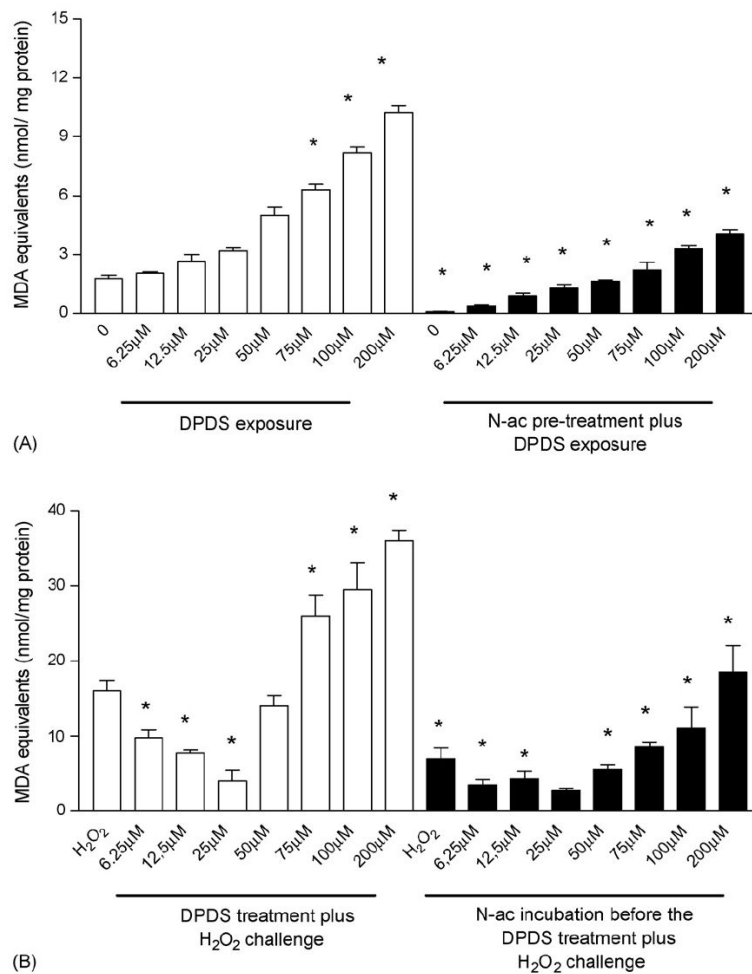


Fig. 2. (Panel A) Determination of TBARS of cells treated with DPDS with the indicated concentrations for 3 h. Open bars represent negative control or treatment with DPDS. Filled bars represent the effect of pre-treatment with 5 mM *N*-ac (*N*-acetylcysteine) before DPDS exposure. (Panel B) Determination of TBARS of cells pre-treated with DPDS at the indicated concentrations, and subsequently submitted to oxidative challenge with 150 µM H₂O₂. Open bars represent the effect of pre-treatment with DPDS (or solvent) before H₂O₂ exposure. Filled bars indicate the effect of *N*-ac treatment before the DPDS pre-treatment that precedes H₂O₂ exposure. Solvent was used as negative control. Data are expressed as mean ± S.D., *n* = 4. The symbol * indicates *p* values < 0.05 (ANOVA, Tukey test). Open bars are compared to negative (in panel A) and to positive (in panel B) controls. Filled bars are compared against open bars at same DPDS concentration.

in the status of total DNA damage (grade IV) (Fig. 5, panel A). These results indicate that DPDS is cytotoxic, and induces chromosomal DNA strand breaks at high doses. No change was detected after S9 metabolism, indicating either no metabolism of DPDS, or that those metabolites did not significantly alter the genotoxic effect of the OS molecule (Table 1 and Fig. 5, panel B). *N*-ac pre-treatment decreased DNA damage induced by DPDS (Table 1).

The evaluation of DPDS in the micronucleus test is shown in Fig. 6. The treatment with this OS molecule decreased the percentage of binucleated cells in a dose–response manner, reinforcing the cytotoxic effect of this molecule on cell proliferation (Table 2). Again, low DPDS caused no significant increase in the incidence of micronuclei, whereas the exposure to higher concentrations (100 and 200 µM) significantly increased their incidence. *N*-ac pre-treatment prevented

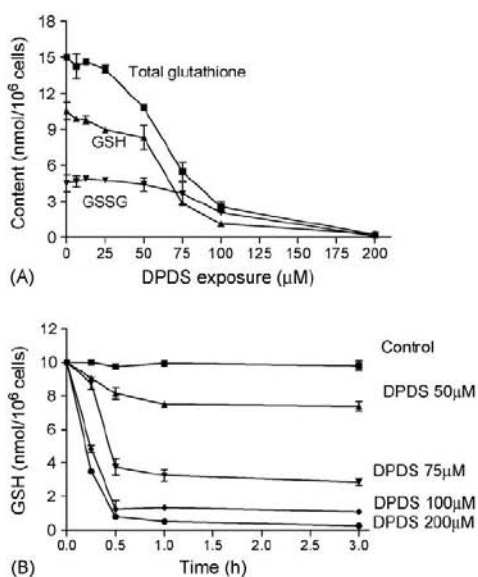


Fig. 3. (Panel A) Dose-dependent effect of DPDS on intracellular total glutathione, reduced glutathione (GSH), and oxidized glutathione (GSSG) levels. (Panel B) During the time course study, cells were treated with 50, 75, 100, and 200 μM DPDS, and reduced glutathione (GSH) was determined for 15 min, 30 min, 1 h, and 3 h, respectively. Data are expressed as mean ± S.D., *n* = 4.

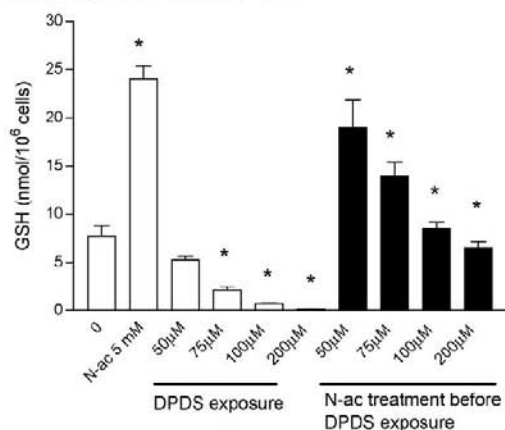


Fig. 4. Effects of *N*-ac (*N*-acetylcysteine) pre-treatment on intracellular GSH concentration. Untreated cells and cells that received only 5 mM *N*-ac are represented by bars 0 and 5 mM *N*-ac, respectively. Cells exposed to DPDS are represented as open bars with the respective DPDS concentration. Filled bars show intracellular GSH content in cells pre-treated with 5 mM *N*-ac for 24 h, and subsequently incubated with DPDS in appropriated concentrations. Bars represent the mean ± S.D., *n* = 4. The symbol * indicates *p* values < 0.05 (ANOVA, Tukey test): DPDS exposure vs. *N*-ac pre-treatment plus DPDS exposure; cells that received only 5 mM *N*-ac vs. untreated cells.

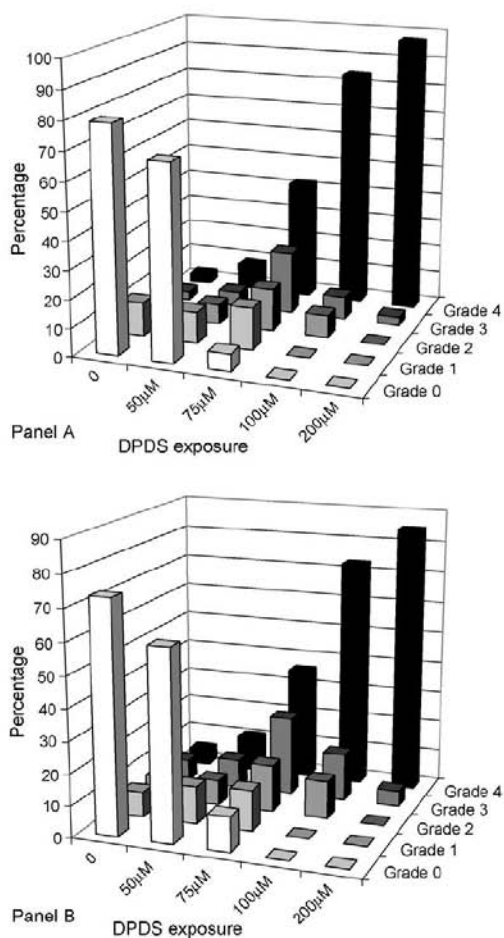


Fig. 5. Distribution of damaged cells in comet assay into damage classes (grades 0–4). (Panel A) Comet assay without metabolic activation. (Panel B) Comet assay with metabolic activation. The percentage of cells in each grade was calculated based on 50 cells counted on each slide.

the genotoxic activity of DPDS, except for the highest dose.

4. Discussion

A balance between therapeutic versus toxicological effects of a compound is an important parameter when evaluating its usefulness as a pharmacological drug. Cell culture can be used to evaluate basal cytotoxicity and target organ toxicity [20,21]. In this study, a pioneer work with respect to the biological effects of DPDS in cultured mammalian cells, V79 fibroblasts were used because this

Table 1
Genotoxicity induced by DPDS treatment and effect of pre-treatment with 5 mM *N*-ac (*N*-acetylcysteine) for 24 h using comet assay

DPDS	3 h exposure to DPDS in FBS-free medium				3 h exposure to DPDS after 24 h pre-treatment with 5 mM <i>N</i> -ac ^{''}			
	Without S9 mix		With S9 mix		Without S9 mix		With S9 mix	
	DI	DF	DI	DF	DI	DF	DI	DF
Control	21.3 ± 8.7	20.3 ± 6.9	36.3 ± 1.2	33.7 ± 1.5	16.5 ± 6.0	18.3 ± 5.4	29.1 ± 0.8	31.0 ± 2.7
6.25 μM	27.3 ± 8.1	29.1 ± 4.0	42.3 ± 6.1	38.7 ± 4.7	17.4 ± 0.7	21.9 ± 4.8	33.3 ± 7.0	35.2 ± 9.0
12.5 μM	31.0 ± 5.0	30.7 ± 4.5	43.7 ± 0.6	37.7 ± 2.1	21.2 ± 3.9	24.7 ± 2.5	34.0 ± 2.1	37.7 ± 2.1
25 μM	29.7 ± 8.1	28.7 ± 6.4	49.7 ± 8.5	40.3 ± 6.4	23.2 ± 10.1	22.1 ± 5.0	39.7 ± 7.5	42.4 ± 10.2
50 μM	34.3 ± 11.4	40.0 ± 12.8	52.6 ± 4.9	44.2 ± 1.9	28.0 ± 6.5	19.4 ± 6.5	40.8 ± 1.2	41.0 ± 2.8
75 μM	91.7 ± 24.4*	53.3 ± 6.8*	64.3 ± 12.6*	51.7 ± 8.7*	31.2 ± 8.2*	23.3 ± 1.7*	43.3 ± 9.0*	39.7 ± 1.7*
100 μM	111.6 ± 9.7*	73.0 ± 11.2*	75.6 ± 8.0*	62.8 ± 15.4*	35.0 ± 8.4*	26.0 ± 9.0*	45.1 ± 4.2*	42.1 ± 16.9*
200 μM	130.1 ± 20.6*	88.9 ± 10.3*	91.5 ± 11.0*	70.9 ± 16.2*	45.1 ± 16.0*	36.1 ± 8.1*	48.2 ± 4.3*	52.1 ± 9.7*
Positive control	143 ± 19.9*	88.3 ± 9.7*	101.7 ± 8.7*	70.0 ± 5.3*	133 ± 21.6	81.0 ± 7.0	90.6 ± 1.2	65.7 ± 11.2

DI, damage index; DF, damage frequency; $n=6$. The symbol * represents $p < 0.01$, as tested by one-way ANOVA (Tukey test); DPDS treatments were compared to the control group; pre-treatments with *N*-ac were compared to the respective DPDS exposure. Positive control: 4×10^{-5} M MMS in absence of metabolism and 1.5×10^{-5} M CP in presence of metabolism.

cell line is well characterized and commonly used in mutagenicity and cytotoxicity studies [22].

The results shown in Fig. 1 indicate that this OS compound possesses a clear concentration range in which toxic effects are not observed. These concentrations should be used in future studies evaluating its properties in terms of pharmacological potential. In this study, we mainly investigated the mechanism involved in its toxicity.

The interest in the toxic effects of selenium compounds arose from their anti-carcinogenic activity and

from their possible use as chemopreventive agents in human cancer [23–25]. The cytotoxicity of several molecules (1,3-selenazine derivatives, selenazoles, methylselenol Se-allylselenocysteine, diphenylmethyl selenocyanate, methylseleninic acid, selenazolidine prodrugs, and ebselen) has been lately investigated as these could be employed in anti-proliferative therapy [1,26–32]. In the present investigation, we found that DPDS was able to reduce V79 cell viability in a dose- and time-dependent manner. Different endpoints were used in order to obtain information on DPDS cytotoxicity *in*

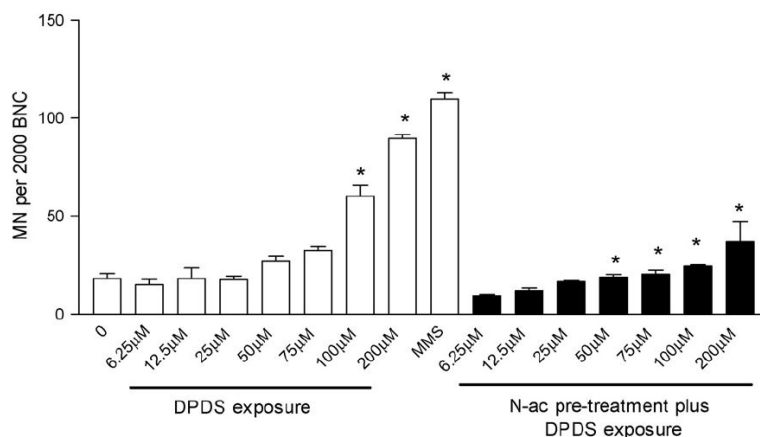


Fig. 6. Mutagenic effects of DPDS in V79 cells. V79 cells were exposed to DPDS for 3 h, and the MN frequency is expressed per 2000 binucleated cells (BNC) in open bars. The effect of pre-treatment with 5 mM *N*-ac for 24 h (*N*-acetylcysteine) on the mutagenicity of DPDS is shown in filled bars. MMS (methylmethanesulfonate) was used as positive control. Bars represent the mean ± S.D., $n=4$; * $p < 0.05$ (ANOVA, Tukey test); untreated cells vs. DPDS exposure; DPDS exposure vs. 5 mM *N*-ac pre-treatment plus DPDS exposure.

Table 2
Effect of DPDS treatment on the cell proliferation measured as percentage of binucleated cells in micronucleus assay

DPDS	% Binucleated cells (BNC)
Negative control	93.0 ± 2.10
6.25 µM	90.4 ± 3.60
12.5 µM	88.0 ± 1.30
25 µM	81.5 ± 3.10
50 µM	65.0 ± 0.50 ^{**}
75 µM	53.8 ± 2.50 ^{**}
100 µM	23.7 ± 0.18 ^{**}
200 µM	8.0 ± 0.66 ^{**}
Positive control	62.1 ± 0.90 ^{**}

V79 cells were exposed to DPDS for 3 h and the BNC (binucleated cells) were counted. MMS (methylmethanesulfonate) was used as positive control. Data are expressed as mean ± S.D., $n=4$; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ (ANOVA, Tukey test); untreated cells vs. DPDS exposure; positive control vs. negative control.

vitro: MTT reduction assesses the functional intactness of mitochondria based on the enzymatic reduction of a tetrazolium salt by the mitochondrial dehydrogenase of viable cells; NRU is a measure of lysosomal integrity, as it reflects the capacity of viable cells to incorporate vital dye into these organelles; the NAC assay evaluates total genetic cellular material as indication of total cell number; TB exclusion is based on cell membrane integrity [33]. In addition, the data on cell proliferation using the percentage of binucleated cells (BNC) in micronucleus assay also shows the cytotoxic effect of DPDS (Table 2). The use of different tests may provide some evidence of the toxicity mechanism of the compound: all tests did result in similar profiles, except for the MTT test, which showed that DPDS treatment was considerably less toxic. Some authors suggested that MTT reduction is a measurement of mitochondrial function, in particular of succinic dehydrogenase activity. However, detailed studies with liver homogenate fractions and intact hepatocytes indicated that MTT reduction is predominantly an assessment of cytosolic NAD(P)/NAD(P)H redox balance [34]. The presence of inhibitor or inducers of reactions of redox balance confirms their involvement in the MTT reduction capacity of V79 cells. This induction of MTT reduction observed in DPDS-treated cells may be expected as a result of cytosolic NAD(P)H levels, suggesting that the treatment can interfere in the cellular redox status.

It was postulated that ROS are capable of reducing tetrazolium compounds, such as MTT [33,34]. We have recently shown that this OS molecule has pro-oxidant property in *S. cerevisiae* as a function of GSH depletion [3]. GSH depletion generates a pro-oxidant status in cells, rendering them sensitive to oxidant agents and

to ROS generated during normal metabolism [35]. Thus, the resistance to oxidative mutagens, such as H₂O₂, may be reduced. In order to investigate this hypothesis, we measured the extension of lipid peroxidation in DPDS-treated cells (Fig. 2, panel A), in cells pre-treated with DPDS and then challenged with H₂O₂ (Fig. 2, panel B), and by determination of intracellular GSH and GSSG.

Cells treated with high doses of DPDS presented a significant increase in TBARS levels. At cytotoxic doses, DPDS treatment also enhances the oxidative damage induced by H₂O₂, indicating a pro-oxidant effect. The occurrence of lipid peroxidation shown in Fig. 2 suggests that ROS play an important role in DPDS cytotoxicity in V79 cells. It was recently reported that DPDS potentiates the oxidative damage caused by cadmium in mice testis [1]. In contrast, *N*-ac pre-treatment completely prevented DPDS-induced cytotoxicity, as measured by TBARS production. This strongly suggests that DPDS-induced oxidative stress may be caused by GSH depletion, leading to cell injury and loss of viability.

The present study evidenced that, in presence of DPDS, the content of intracellular GSH markedly decreased in V79 cells in a dose- and time-dependent manner (Fig. 3). The measured GSH pool size confirms a direct relation of cellular GSH content and sensitization by DPDS with oxidative challenge, as shown in Fig. 2. This could explain its pro-oxidant effect. If GSH is involved in the pro-oxidant effect of DPDS, a pre-treatment with compounds that stimulate an increase in cellular GSH may lower or even abolish this effect. *N*-ac is an antioxidant molecule that acts primarily by two mechanisms: (i) it is readily deacetylated in cells to yield L-cysteine, thereby promoting GSH synthesis; (ii) as it is a ROS scavenger, it may react (GHS-like) with various types of ROS, including hydroxyl radicals [36]. Our results show that DPDS pro-oxidant activity can be neutralized by *N*-ac pre-treatment (Fig. 2), thereby maintaining (not decreasing) cellular GSH levels (Fig. 4), which is consistent with our previous results obtained with a yeast [18]. Similarly, ebselen acts as pro-oxidant agent depleting GSH with no increase of GSH oxidation rate in HepG2 hepatoma and C6 glioma cell lines, triggering apoptosis and therefore displaying anti-proliferative activity [28,37–39].

Intracellular GSSG level was measured in DPDS-treated cells (Fig. 3). It is unlikely that intracellular GSH depletion in DPDS-treated cells is due either increased oxidation or efflux of GSH. In addition, as no significant intracellular GSSG increase was observed, it is most likely that the rapid depletion of intracellular GSH is the result of binding of DPDS to GSH as already shown (suggested) in *in vitro* models and in *S. cerevisiae* [3].

Using the Ames test and experiments of mutagenesis in DNA repair deficient yeasts strains, DPDS increases DNA strand breaks caused by oxidative mutagens or by free radicals produced during normal metabolism, possibly by virtue of its pro-oxidant capacity [2]. Now, the results indicate that the incubation with high doses of this compound, which exhibits pro-oxidant effect through GSH depletion, also induced DNA strand breaks in cultured mammalian cells (Table 1). The cytotoxic effect of DPDS was clear when the distribution of damaged cells in comet assay was analyzed, and the increase in a grades III and IV damage is a well-known evidence of cytotoxicity (Fig. 5). Similarly, sodium selenite induced chromosomal mutations in lymphocytes and in mouse tissues [40–42]. Se-allylselenocysteine, an anticarcinogenic OS compound, also induced alkaline labile DNA damage in mouse epithelial cell lines [32]. As *N*-ac pretreatment was able to prevent DPDS-induced DNA damage (Table 1), DNA strand breaks can be indirectly attributed to GSH depletion.

Mutagenesis in mammalian cells was verified only at higher doses and again, *N*-ac pre-treatment was able to prevent mutagenesis, showing that GSH is involved in DPDS toxic effects, and that supplementation of GSH precursors is useful to protect against DPDS toxicity in case of OS intoxication (Fig. 6). This is in agreement with our previous work, where the mutagenic potential of DPDS in prokaryotic and unicellular eukaryotic test systems was demonstrated [2]. All these findings are consistent with a mutagenic and clastogenic activity of high doses of this OS compound in *in vitro* models. Similarly, selenite and selenate induced dose-related increases in micronuclei in mouse bone marrow cells [40–42].

DPDS is highly cytotoxic to V79 cells in concentrations up to 50 μ M, since it depletes GSH, and consequently induces DNA damage. The pro-oxidant property associated to DNA lesions explains the mechanism of toxicity of this molecule in this dose range, and it would be interesting to explore its anti-proliferative potential. Toxic OS compounds have a considerable anti-proliferative potential in several tumoral cell lines. They induce apoptosis through rapid depletion of intracellular thiols by conjugation or by increasing the oxidation rate. For example, this ability of ebselen is well characterized [28]. Furthermore, DNA damaging capacity is useful to trigger signaling pathways that lead to apoptosis, and this has been considered a promising characteristic in the search of new OS derivative compounds with anti-tumoral effect [43]. In this manner, our findings clarify the toxicity mechanism of DPDS, which allows the development of new diselenide derivatives that have potential cyto-

toxic activity in normal and tumoral cell lines, as a consequence of its capacity to disturb redox cellular equilibrium and to induce DNA damage, mainly single and double strand breaks. Several molecules of this class, OS compounds, such as diphenylmethylselenocyanate, 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate (p-XSC), selenomethionine, and ebselen have interesting anti-mutagenic and anti-carcinogenic effects in several systems [1,23,25,28,29,43].

At low concentrations, DPDS was not cytotoxic, and had a protective effect against H_2O_2 oxidative damage (Fig. 2), but the exact mechanism of this effect remains unclear. Other studies also verified this effect, e.g., DPDS and ebselen reduced spontaneous as well as quinolinic acid- and sodium nitroprusside-induced production of TBARS in rat brain homogenates to basal rates [1].

In summary, the cellular effects of DPDS appear to be very complex, and are concentration-dependent. The cytotoxicity of DPDS in cultured V79 cells can be ascribed to its ability to deplete GSH, which leads to a pro-oxidant cellular status, as verified by TBARS increase and sensitization to H_2O_2 . These events contribute to its genotoxicity. By increasing intracellular GSH content, *N*-ac pre-treatment can prevent these effects. At a range of low doses (<50 μ M), DPDS is not cytotoxic, and exhibits antioxidant potential. It will be worthwhile to extend the investigation on DPDS toxicity to tumor cell lines, and to measure GSH depletion-mediated induction of apoptosis, thereby assessing the potential use of DPDS in anti-proliferative therapy. The antioxidant, anti-genotoxic, and anti-mutagenic potential of DPDS should be studied using low concentrations of this compound.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Martin Brendel and Dr. Christine Gaylarde for critically reading the manuscript. This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and GENOTOX-Genotoxicity Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. R.M. Rosa held a CAPES doctoral grant.

References

- [1] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, Chem. Rev. 104 (2004) 6255–6286.

- [2] R.M. Rosa, K. Sulzbacher, J.N. Picada, R. Roesler, J. Saffi, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast, *Mutat. Res.* 563 (2004) 107–115.
- [3] R.M. Rosa, R.B. Oliveira, J. Saffi, A.L. Braga, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, J.C.F. Moreira, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Prooxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions, *Life Sci.* 77 (2005) 2398–2411.
- [4] M.R. Cingi, I. De Angelis, E. Fortunati, D. Reggiani, V. Bianchi, R. Tiozzo, F. Zucco, Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach, *Toxicol. In Vitro* 5 (1991) 125–199.
- [5] E. Borefreund, J.A. Puerner, A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (Htd/NR 90), *J. Tiss. Cult. Meth.* 9 (1984) 7–9.
- [6] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Meth.* 89 (1986) 271–277.
- [7] T.F. Uliasz, S.J. Hewett, A microtiter trypan blue absorbance assay for the quantitative determination of excitotoxic neuronal injury in cell culture, *J. Neurosci. Meth.* 100 (2000) 157–163.
- [8] M.G. Salgo, W.A. Pryor, Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 15 (1996) 482–488.
- [9] O.H. Lowry, A.L. Rosebrough, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [10] T. Akerboom, H. Sies, Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples, *Meth. Enzymol.* 77 (1981) 373–382.
- [11] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Scheider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [12] A. Hartmann, G. Speit, The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183–188.
- [13] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.
- [14] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig, D.R. Ciocca, A single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183–1186.
- [15] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, R. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [16] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173–215.
- [17] D. Bonacker, T. Stoiber, M. Wang, K.J. Bohm, I. Prots, E. Unger, R. Their, H.M. Bolt, G.H. Degen, Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function, *Arch. Toxicol.* 78 (2004) 575–583.
- [18] M. Fenech, The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455 (2000) 81–95.
- [19] A. Hartmann, A. Elhajouji, E. Kiskinis, F. Poetter, H. Martins, A. Fjallman, W. Friauff, W. Suter, Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test, *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 843–858.
- [20] B. Ekwall, H. Ekwall, Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing, *ATLA—Alt. Lab. Anim.* 15 (1988) 193–200.
- [21] H. Seibert, M. Ball, J. Femem, V. Bianchi, R. Clothier, P. Dierickx, B. Ekwall, M. Garle, M. Gómez-Lechón, L. Gribaldo, M. Gulden, M. Liebsch, E. Rasmussen, R. Roguet, R. Shrivastava, E. Walum, Acute toxicity testing in vitro and the classification and labeling of chemicals, *ATLA—Alt. Lab. Anim.* 24 (1996) 499–510.
- [22] M. Bradley, B. Bhuyan, M.C. Francis, R. Langenbach, A. Peterson, E. Huberman, Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of literature, *Mutat. Res.* 87 (1981) 81–142.
- [23] P. Brenneisen, H. Steinbrenner, H. Sies, Selenium, oxidative stress, and health aspects, *Mol. Aspects Med.* 26 (2005) 256–267.
- [24] K. El-Bayoumy, R. Sinha, Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach, *Mutat. Res.* 591 (2005) 224–236.
- [25] K. El-Bayoumy, R. Sinha, Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds, *Mutat. Res.* 551 (2004) 181–197.
- [26] Y. Kumar, R. Green, K. Borysko, D. Wise, L. Wotring, L. Townsend, Synthesis of 2,4-disubstituted thiazoles and selenazoles as a potential antitumor and antimalarial agents, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 3843–3848.
- [27] M. Koketsu, H. Ishihara, W. Wu, K. Murakami, I. Saiki, 1,3-Selenazine derivatives induce cytotoxicity and DNA fragmentation in human HT-1080 fibrosarcoma cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 9 (1999) 157–161.
- [28] C. Yang, H. Shen, C. Ong, Ebselen induces apoptosis in HepG2 cells through rapid depletion of intracellular thiols, *Arch. Biochem. Biophys.* 374 (2000) 142–152.
- [29] R.K. Das, S.K. Hossain, S. Bhattacharya, Diphenylmethyl selenocyanate inhibits DMBA-croton oil induced two-stage mouse skin carcinogenesis by inducing apoptosis and inhibiting cutaneous cell proliferation, *Cancer Lett.* 230 (2005) 90–101.
- [30] H. Zeng, M. Briske-Anderson, J.P. Idso, C.D. Hunt, The selenium metabolite methylselenol inhibits the migration and invasion potential of HT1080 tumor cells, *J. Nutr.* 136 (2006) 1528–1532.
- [31] K. Yamaguchi, R.G. Uzzo, J. Pimkina, P. Makhov, K. Golovine, P. Crispin, V.M. Kolenko, Methylseleninic acid sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis, *Oncogene* 38 (2005) 5868–5877.
- [32] Z. Zhu, W. Jiang, H. Ganther, C. Ip, H. Thompson, *In vitro* effects of Se-allylselenocysteine and Se-propylselenocysteine on cell growth, DNA integrity and apoptosis, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1467–1473.
- [33] D. Renzi, M. Valtonila, R. Foster, The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system, *ATLA—Alt. Lab. Anim.* 21 (1993) 89–96.
- [34] M. Andrews, M. Garle, R. Clothier, Reduction of the new tetrazolium dye in cultured rat hepatocytes and liver fractions, *Toxicol. In vitro* 25 (1997) 641–653.
- [35] J. Estrela, A. Ortega, E. Obrador, Glutathione in cancer biology and therapy, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 43 (2006) 143–181.
- [36] M. Zafarullah, W.Q. Li, J. Sylvester, M. Ahmad, Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 6–20.
- [37] H. Shen, W. Ding, C. Ong, Intracellular glutathione is a cofactor in methylseleninic acid-induced apoptotic cell death of human hepatoma HEPG2 cells, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 552–561.
- [38] H. Shi, S. Liu, M. Miyake, K.J. Liu, Ebselen induced C6 glioma cell death in oxygen and glucose deprivation, *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 655–660.

- [39] M.S. Stewart, J.E. Spallholz, K.H. Neldner, B.C. Pence, Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 42–48.
- [40] S. Biswas, G. Talukder, A. Sharma, Chromosome damage induced by selenium salts in human peripheral lymphocytes, *Toxicol. In Vitro* 14 (2000) 405–408.
- [41] R.M. Balansky, Comutagenic and coclastogenic effects of selenium *in vitro* and *in vivo*, *Mutat. Res.* 263 (1991) 231–236.
- [42] S. Itoh, H. Shimada, Micronucleus induction by chromium and selenium, and suppression by metallothionein inducer, *Mutat. Res.* 367 (1996) 233–236.
- [43] N. Zhou, H. Xiao, T.K. Li, A. Nur-E-Kamal, L.F. Liu, DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 29532–29537.



CAPÍTULO – III

Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells

Mutation Research 631:44-54, 2007



Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells

Renato Moreira Rosa^a, Dinara Jaqueline Moura^a, Ana Catarina Romano e Silva^a,
Jenifer Saffi^b, João Antonio Pêgas Henriques^{a,b,*}

^a Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil

Received 4 February 2007; received in revised form 3 April 2007; accepted 4 April 2007

Available online 18 April 2007

Abstract

Diphenyl diselenide (DPDS) is an electrophilic reagent used in the synthesis of a variety of pharmacologically active organic selenium compounds. Studies have shown its antioxidant, hepatoprotective, neuroprotective, anti-inflammatory, and antinociceptive effects. We recently showed the antioxidant effect of DPDS in V79 cells, and established the beneficial and toxic doses of this compound in this cell line. Here, we report the antigenotoxic and antimutagenic properties of DPDS, investigated by using a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters. We determined the cytotoxicity by clonal survival assay, and evaluated DNA damage in response to several mutagens by comet assay and micronucleus test in binucleated cells. In the clonal survival assay, at concentrations ranging from 1.62 to 12.5 μM , DPDS was not cytotoxic, while at concentrations up to 25 μM , it significantly decreased survival. The treatment with this organoselenium compound at non-cytotoxic dose range increased cell survival after challenge with hydrogen peroxide, methyl-methanesulphonate, and UVC radiation, but did not protect against 8-methoxypsoralen plus UVA-induced cytotoxicity. In addition, the treatment prevented induced DNA damage, as verified in the comet assay. The mutagenic effect of these genotoxins, as measured by the micronucleus test, similarly attenuated or prevented cytotoxicity and DNA damage. Treatment with DPDS also decreased lipid peroxidation levels after exposure to hydrogen peroxide MMS, and UVC radiation, and increased glutathione peroxidase activity in the extracts. Our results clearly demonstrate that DPDS at low concentrations presents antimutagenic properties, which are most probably due to its antioxidant properties.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Diphenyl diselenide; V79 cells; Genotoxicity; Mutagenicity; Antimutagenesis; Selenium

1. Introduction

It has been shown that selenium, an essential trace element for animals, prevents cancer in many animal model systems, and enhances cancer chemopreventive efficacy in humans [1–3]. Selenium compounds appear to be antimutagenic during cancer-promotion stage, when they prevent transformation of normal cells into malignant cells and oncogene activation [4–7]. In spite of extensive literature describing the antimutagenic and

* Corresponding author at: Departamento de Biofísica, Prédio 43422, Laboratório 210, Campus do Vale, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia, CEP 91501970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 5133166069; fax: +55 5133167003.

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (J.A. Pêgas Henriques).

anticarcinogenic effects of selenium compounds, little is known on their mode of action. Selenium compounds are considered as a “Janus compound” – products with a double face – due to their contrasting behavior, which depends on the concentration used. At low doses, Se has beneficial effects, whereas at high doses, Se is toxic and possibly carcinogenic. The threshold concentration for these opposing activities has not been established yet [8,9].

As the doses of the main known dietary sources of selenium, such as selenomethionine, selenocysteine, and inorganic selenium, are limited by toxicity, synthetic derivatives have been developed. In the last few decades, there has been an increasing interest in organoselenium (OS) biochemistry because the pharmacology of synthetic OS compounds revealed molecules that could be used as antioxidants, enzyme inhibitors, neuroprotectors, anti-tumor and anti-infectious agents, cytokine inducers, and immunomodulators [10]. Several molecules of this class of OS compounds, such as diphenylmethylselenocyanate, 1,4-phenylenebis(methylene)-selenocyanate (p-XSC), selenomethionine, and ebselen, present interesting antimutagenic and anticarcinogenic effects in several systems [11–21].

Diphenyl diselenide (DPDS) is a simple and stable OS compound. It is an electrophilic reagent used in the synthesis of a variety of pharmacologically active OS compounds [22]. The biological activities of DPDS were recently studied, making this compound a good candidate for therapeutic proposals, as antioxidant, hepatoprotective, neuroprotective, anti-inflammatory, and anticarcinogenic properties were demonstrated for this OS compound [10]. Although its various pharmacological capabilities have been extensively investigated, little is known about its antimutagenic effects.

DPDS also presents toxic effects as it inhibits δ -aminolevulinic acid dehydratase in several tissues and organs of mammals; moreover the chronic exposure of the mouse brain to high doses of DPDS affects the central nervous system [10]. In microorganism models, DPDS was able to induce frameshift mutations in both *Salmonella typhimurium* and haploid yeast, as well as to increase crossing over and gene conversion frequencies in diploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* [22]. In the yeast *S. cerevisiae*, DPDS acts as a pro-oxidant agent by depleting free glutathione, probably via adduct formation, thus sensitizing the cell to the damaging effect of ROS [23].

Recently, we showed that the DPDS cytotoxicity and genotoxicity, using the comet assay and the micronuclei evaluation, in V79 cells occurs in doses at 50 μ M and

higher, as consequence of its pro-oxidant properties by intracellular glutathione depletion [24]. However, in this contribution we showed that DPDS has an antioxidant effect of DPDS in V79 cells protecting the cell against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in concentrations at 25 μ M and lower, and thus established the beneficial and the toxic doses of this compound in this cell line

This study aimed at deepening our knowledge on the effects of DPDS on mammalian cultured cells in order to investigate new pharmacological possibilities for its application. The antigenotoxic and antimutagenic properties of DPDS were studied in a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters (V79 cells), using comet assay, and micronucleus test to determine DPDS cytotoxicity and to evaluate DNA damage in response to several mutagens after treating cells with this OS compound.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

DPDS (CAS registry number 1666-13-3) was graciously provided by Dr. Antônio Braga, from the Federal University of Santa Maria, Brazil. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, antibiotics, and Trypan blue (TB) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Cytochalasin-B (Cyt-b), methyl methanesulfonate (MMS), 8-methoxypsoralen (8-MOP), thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP), nitrobluetetrazolium (NBT), xanthine oxidase, xanthine, reduced glutathione (GSH), glutathione reductase, NADPH, and sodium azide were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Hydrogen peroxide (H_2O_2) at 30% was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Giemsa stain was bought from Merck (Darmstadt, Germany). All others reagents were of analytical grade. The tissue culture flasks (bottles and dishes) were supplied by Nunc (Wiesbaden, Germany).

2.2. Cell culture and treatments

V79 cells were grown as monolayers under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated-FBS, 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Cells were maintained in tissue culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 , and were harvested by treatment with 0.15% trypsin–0.08% EDTA in phosphate-buffered saline solution (PBS). Cells were seeded (3×10^6 cells) in 5 mL of complete medium in a 25-cm² flask, and grown for 2 days to 90–100% confluence prior to the treatment with the test substance. DPDS was dissolved in

dimethyl sulfoxide (DMSO), and added to FBS-free medium to the desired concentrations. Final DMSO concentration in the medium never exceeded 0.2%, and the control group was exposed to an equivalent concentration of this solvent.

Cells were treated with DPDS for 3 h in the medium without FBS. Cells were then washed with PBS at pH 7.4, and submitted to the mutagen experimental protocol. As to oxidative challenge, cells were exposed to 150 μM H_2O_2 for 1 h in the dark at 37 °C. As to MMS exposure, cells were incubated with 40 μM MMS for 1 h in the dark at 37 °C.

For 8-MOP photo-activated with UVA light treatment (PUVA), the medium was removed after incubation, and the monolayer rinsed with PBS at pH 7.4. Each dish received PBS at pH 7.4 containing 8-MOP at 10 μM , and was then incubated for 30 min in the dark at 4 °C to allow for intercalation. Cells in each dish were then exposed to ultraviolet A light (365 nm, Sylvania FR20T12) at a rate of 5.0 J/m²/s at room temperature, while still covered with the psoralen solution. For the UVC exposure, medium was removed after incubation, and the monolayer was rinsed with PBS at pH 7.4. Each dish received PBS at pH 7.4, and cells were exposed to a dose of ultraviolet light (254 nm) at a rate of 0.3 J/m²/s at room temperature. UVC dosimetry was performed in air with Blak-Ray Ultraviolet Meter (USA) and the irradiation dose was 5 J/m². Prior to exposure, lids of the dishes were removed, and the covering solution aspirated from the dishes.

2.3. Cytotoxicity evaluation by colony-forming ability (clonal survival)

Exponentially growing V79 cells were treated according to the experimental protocol. Thereafter, they were trypsinized, and 500 cells/60 mm dish were seeded in triplicate to determine colony-forming ability. An aliquot of DPDS stock solution was thawed, diluted, and added after attachment (4 h). After 5 days incubation, colonies were fixed with ethanol, stained with Giemsa, counted, and their survival calculated as a percentage relative to control treatment.

2.4. Genotoxic evaluation using comet assay

Alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [25] with minor modifications [26,27]. V79 cells were incubated with various concentrations of DPDS for 3 h in FBS-free medium. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in complete medium. Then, 20 μL of cell suspension (3×10^6 cells/mL) were mixed with 0.75% low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. Agarose was allowed to set at 4 °C for 5 min. Slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 10% DMSO, pH 10.0) at 4 °C for at least 1 h to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. After the lysis procedure, slides were placed on a horizontal electrophoresis unit, covered fresh buffer (300 M NaOH, 1 M EDTA, pH 13.0) for 20 min at 4 °C to

allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min at 25 V (300 mA). All the above steps were conducted under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water, and stained using a silver staining protocol. After drying at room temperature overnight, gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected, and analyzed for the concentration of each test substance. When selecting cells, the edges and cells around air bubbles were avoided [26]. Cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, without a tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with a tail length 1–2 \times the diameter of the head; (4) class 3: with a tail longer than 2 \times the diameter of the head and (5) class 4: comets with no heads. A value (damage index) was assigned to each comet according to its class. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method, as it is highly correlated with computer-based image analysis. The damage index is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail, and it is considered a sensitive DNA measurement. The other parameters, damage frequency (DF) and image length (IL), although considered in the analysis, were only used as complementary DNA damage parameters. Damage index ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4) [26–29]. The damage frequency (%) was calculated based on the number of cells with tails versus those without tails. The vehicle was used as negative control.

2.5. Determination of interstrand crosslinks (ICL) by comet assay

The comet assay was performed under alkaline conditions to detect the presence of ICL, as previously reported, with minor modifications [30]. This assay measures the unhooking of DNA ICL, which is the first step of DNA ICL repair. Under alkaline conditions, ICL-containing DNA cannot denature, delaying DNA migration during electrophoresis. Therefore, DNA without ICLs forms tails, while cross-linked DNA does not. We used this approach to quantify DNA damage.

2.6. Clastogenic evaluation using micronucleus test

The micronucleus assay in binucleated cells was performed according to Bonacker et al. [31], with modifications [32]. V79 cells were incubated with various DPDS concentrations for 3 h in FBS-free medium. Cultures were then washed twice with medium, and Cyt-B was added to a final concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cultures were harvested 21 h after Cyt-B addition. Cells were separated from the bottle by trypsinization, and the cell suspension was centrifuged at 1000 $\times g$ for 5 min. Cells were resuspended in 0.075 M KCl, and maintained at

4°C for 3 min (mild hypotonic treatment). They were then centrifuged, and a methanol/acetic acid (3:1) solution was slowly added. This fixation step was repeated twice, and cells were finally resuspended in a small volume of methanol/acetic acid, dropped on clean slides, and stained with 10% Giemsa (pH 6.8) for 3–4 min. Slides were mounted, and codified prior to microscopic analysis. The vehicle was used as negative control. Micronuclei were counted in 2000 binucleated cells (BNC) with well-preserved cytoplasm. The identification of micronuclei was carried out according to Fenech [32].

2.7. Measurement of lipid peroxidation

The extent of DPDS-induced lipid peroxidation was evaluated by the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA), a product formed by lipid peroxidation. The assays were carried out according to Salgo and Prior [33], with slight modifications. V79 cells (3×10^6 cells) were incubated with various DPDS concentrations for 3 h in FBS-free medium, and after lysis with Tris-HCl (15 mM for 1 h). Two 2 mL of 0.4 mg/mL TCA, and 0.25 M HCl were added to the lysate. After incubation with 6.7 mg/mL TBA for 15 min at 100°C, the mixture was centrifuged for 10 min at $750 \times g$. As TBA reacts with products of lipid peroxidation other than MDA, results were expressed in terms of thiobarbituric reactive species (TBARS), as determined by their absorbance at 532 nm. Hydrolyzed TMP was used as standard. The results were normalized for protein content [34].

2.8. Enzyme activities

Enzyme activities were determined in cell extracts according to Bronzetti and co-workers [8].

2.9. Superoxide dismutase (SOD)

SOD activity was assayed by the nitroblue tetrazolium (NBT) method of Beauchamp and Fridovich [35]. NBT is reduced to blue formazan by superoxide anions, which presents high absorbance at 560 nm, whereas the presence of SOD inhibits the reaction. Cells were homogenized in 0.05 M sodium carbonate buffer pH 10.2. The assay mixture consisted of 0.05 M sodium carbonate buffer, pH 10.2, containing 3 mM xanthine, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA, 1.5 mg/mL BSA, and 50 μ L homogenate. The reaction was initiated by adding 50 μ L xanthine oxidase (0.1 mg/mL), and incubated for 30 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 6 mM copper(II) chloride, and then centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min. The absorbance of blue formazan at 560 nm was determined in the supernatants.

2.10. Catalase (CAT)

The reaction mixture contained 12 μ L 3% (v/v) H_2O_2 , and 100 μ L cell lysates in 50 mM phosphate buffer solution (pH

7.0) at a total volume of 1.0 mL. Samples were incubated at 37°C for 2 min, and the absorbance of the samples monitored for 5 min at 240 nm. The change in absorbance is proportional to H_2O_2 breakdown [36].

2.11. Glutathione peroxidase (GPX)

GPX was assayed by the method of Paglia and Valentine [37]. The reaction mixture contained 0.1 M phosphate buffer solution, pH 7.0, 1 mM EDTA, 10 mM GSH, 1 mM sodium azide, 1 unit of glutathione reductase, 1.5 mM NADPH, and 0.1 mL cell lysate. After incubation for 10 min at 37°C, H_2O_2 was added to each sample at a final concentration of 1 mM. GPX activity was measured at 340 nm as the rate of NADPH oxidation.

2.12. Statistical analysis

All experiments were independently performed at least three times in triplicate, and the results are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by test of Tukey at $p < 0.05$, which was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Choice of DPDS concentration range

In order to choose DPDS concentrations for the assays, clonal survival was determined (Fig. 1). At concentrations ranging from 1.62 to 12.5 μ M, DPDS was not cytotoxic, while concentrations up to 25 μ M cell survival significantly decreased. Below a threshold of 12.5 μ M, DPDS did not show any toxic effects. Therefore, we decided to use 1.62–12.5 μ M in all subsequent experiments.

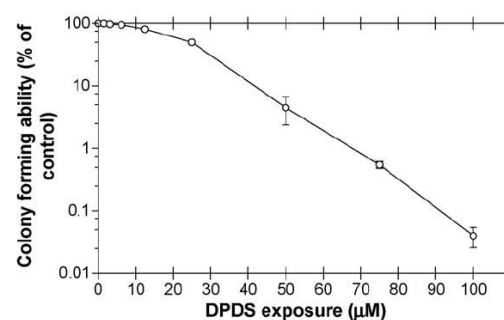


Fig. 1. Clonogenic survival of V79 cells after treatment with DPDS at different concentrations for 3 h in medium without FBS. The results are expressed as mean \pm S.D., $n = 9$.

3.2. Effects on H₂O₂ challenge

The ability of non-toxic concentrations of DPDS to reduce H₂O₂ toxicity, as measured by clonal survival assay, was analyzed. Fig. 2 shows that, at 150 μM H₂O₂ (37% survival), H₂O₂ cytotoxicity was significantly suppressed by DPDS treatment at low concentrations, until 25 μM. The effect of DPDS on H₂O₂-induced DNA damage is shown in Table 1, along with the antimutagenic effects of DPDS determined the micronucleus test. As expected, V79 cells treated with 150 μM H₂O₂ exhibit serious DNA damage, as verified by the increase in DI and DF. When cells were pretreated with DPDS, DNA damage was significantly reduced, as demonstrated by the reduction of the damage index and of frequency at doses up to 12.5 μM in a dose-response manner. Permanent DNA damage was also prevented, as shown in the dose-response decrease in micronucleus rate. Moreover, the treatment with this OS molecule prevented the decrease in the percentage of binucleated cells in a dose-response manner, alleviating the cyto-

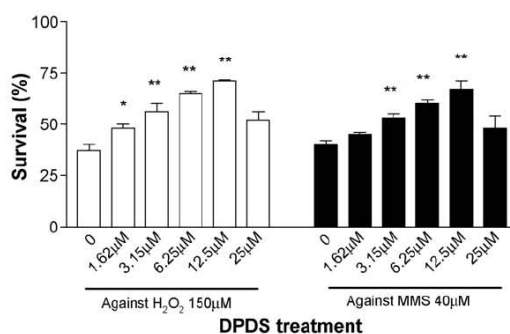


Fig. 2. Clonogenic survival of V79 cells pretreated with non-cytotoxic doses of DPDS for 3 h in medium without FBS, and challenged with H₂O₂ (150 μM) or MMS (40 μM) for 1 h at 37 °C in the dark. Results are expressed as mean ± S.D., *n* = 9. The symbols * represents *p* < 0.05, and ** represents *p* < 0.001, as tested by one-way ANOVA (Tukey test): DPDS pretreated cells were compared to cells only exposed to mutagens.

Table 1
Effects of DPDS treatment on H₂O₂-, MMS- and UVC-induced chromosome breakage and clastogenesis in V79 cells

Treatment	Comet assay		Micronuclei	
	DI	DF	Cell proliferation (% binucleated cells)	Micronuclei per 2000 binucleated cells
H₂O₂				
NC	76.0 ± 4.00	49.0 ± 2.00	93.0 ± 2.10	15.1 ± 7.30
H ₂ O ₂ 150 μM	251.0 ± 7.07**	94.5 ± 0.70**	46.0 ± 3.35*	96.4 ± 9.40**
DPDS 1.62 μM plus H ₂ O ₂	185.1 ± 0.70*	79.5 ± 2.12**	61.7 ± 0.90*	61.7 ± 9.13*
DPDS 3.15 μM plus H ₂ O ₂	151.1 ± 11.21*	63.5 ± 0.70**	73.2 ± 4.00**	50.0 ± 0.90**
DPDS 6.25 μM plus H ₂ O ₂	122.4 ± 4.24**	52.5 ± 6.15**	78.1 ± 0.10**	43.7 ± 0.44**
DPDS 12.5 μM plus H ₂ O ₂	100.5 ± 6.97**	41.5 ± 4.94**	89.0 ± 1.30**	22.0 ± 1.55**
DPDS 25 μM plus H ₂ O ₂	131.0 ± 7.82	48.5 ± 6.36	81.0 ± 7.90	18.9 ± 2.45
MMS				
NC	96.0 ± 4.00	49.0 ± 2.0	88.0 ± 6.40	18.0 ± 2.30
MMS 40 μM	303.5 ± 12.02**	94.5 ± 2.12**	58.0 ± 2.05*	194.4 ± 12.10**
DPDS 1.62 μM plus MMS	150.0 ± 2.24**	76.0 ± 1.51*	70.0 ± 2.80*	157.7 ± 12.00*
DPDS 3.15 μM plus MMS	135.0 ± 4.87**	65.0 ± 1.41*	73.2 ± 4.00**	91.0 ± 2.47**
DPDS 6.25 μM plus MMS	114.5 ± 6.26**	48.0 ± 1.03*	85.0 ± 1.20**	63.0 ± 9.57**
DPDS 12.5 μM plus MMS	99.0 ± 1.41**	36.5 ± 0.70*	91.2 ± 6.00**	44.2 ± 17.43**
DPDS 25 μM plus MMS	247.5 ± 0.70	91.5 ± 0.70	56.8 ± 2.70	145.1 ± 20.90
UVC				
NC	74.0 ± 6.20	43.1 ± 0.50	96.0 ± 3.00	21.0 ± 0.90
UVC 5 J/m ²	250.5 ± 8.04**	87.0 ± 3.00	63.0 ± 0.80*	132.0 ± 12.00
DPDS 1.62 μM plus UVC	224.1 ± 6.14*	79.0 ± 4.50*	71.0 ± 0.76*	94.9 ± 6.44*
DPDS 3.15 μM plus UVC	195.4 ± 2.33*	60.0 ± 0.90**	81.0 ± 4.00**	80.9 ± 4.00*
DPDS 6.25 μM plus UVC	154.4 ± 10.26**	46.6 ± 1.12**	89.0 ± 0.05**	65.8 ± 12.37*
DPDS 12.5 μM plus UVC	101.0 ± 0.40**	38.5 ± 2.70**	92.5 ± 1.40**	45.1 ± 1.85**
DPDS 25 μM plus UVC	271.5 ± 10.70	91.5 ± 0.80	65.8 ± 2.20	135.0 ± 10.90

DI: damage index; DF: damage frequency; *n* = 9. The symbol * represents *p* < 0.05 and ** represents *p* < 0.01, as tested by one-way ANOVA (Tukey test): DPDS treatments were compared to cells only exposed to mutagen; mutagen treatment was compared against respective negative control. NC: negative control (DMSO 0.2%).

toxic effect of H₂O₂ on cell proliferation (Table 2). The results indicated that treatment with DPDS in this dose range protected the cells against the effects of this oxidative mutagen.

3.3. Effects on MMS treatment

The effect of non-toxic concentrations of DPDS against MMS cytotoxicity as measured in the clonal survival, were evaluated. Fig. 2 shows that at 40 μ M, MMS decreased clonogenic survival to 40%. The addition of concentrations up to 12.5 μ M DPDS increased survival; 6.25 μ M DPDS increased survival by 50%. The effect of DPDS on MMS-induced DNA damage is shown in Table 1, as well as its antimutagenic effects observed in the micronucleus test. As expected, 40 μ M MMS highly genotoxic and clastogenic under these experimental conditions. Relative to OS effect, both DNA damage parameters (DI and DF) decreased in response to DPDS treatment in the range of 1.62–12.5 μ M. Due to its cytotoxic properties, protection is more effective at lower concentrations—up to the threshold dose 12.5 μ M. The same profile of biological effects was observed when micronuclei and cell proliferation were evaluated (Table 2). Thus, treatment with DPDS in this dose range protects the cell against the genotoxic effects of this classical alkylating agent.

3.4. Effects on UVC radiation

Fig. 3 shows the response of DPDS-treated cells after exposure to 5 J/m² UVC. At a dose range of 1.62–12.5 μ M, DPDS improved survival, and the best result was obtained at 12.5 μ M, the threshold for the protective effect. The effect on UVC-induced chromo-

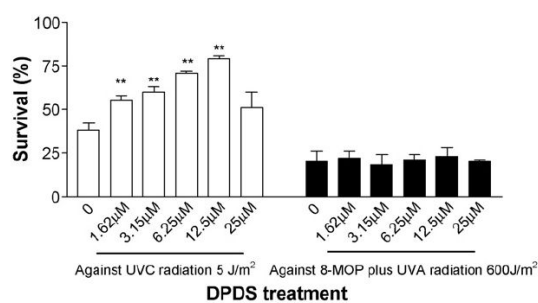


Fig. 3. Clonogenic survival of V79 cells pretreated with non-cytotoxic doses of DPDS for 3 h in medium without FBS and then challenged with UVC radiation 5 J/m² or 8-MOP photoactivated with UVA light at 600 J/m². The results are expressed as mean \pm S.D., n = 9. The symbol * represents $p < 0.05$ and ** represents $p < 0.01$, as tested by one-way ANOVA (Tukey test); DPDS pretreated cells were compared to cells only exposed to mutagens.

some breakage and clastogenesis is shown in Table 1. In doses below 25 μ M, DPDS prevented DNA damage caused by UVC radiation. When micronuclei and cell proliferation were evaluated, the treatment was also effective in the same broad dose range employed. Thus, this OS molecule has a beneficial effect by protecting cells against UVC-induced cell damage, or by recovering UVC-damaged cells (Fig. 4).

3.5. Effects on PUVA exposure

The results in Fig. 3 show that DPDS treatment did not prevent 8-MOP photoinduced cytotoxicity. Moreover, DPDS treatment did not decrease the generation of DNA cross-linking (Table 2). Furthermore, the mutagenic effect of 8-MOP + UVA was also not modified by DPDS at all doses tested.

Table 2
Effects of DPDS treatment on PUVA induced chromosome breakage and clastogenesis in V79 cells

Treatment	Comet assay	Micronuclei	
	ICL (%)	Cell proliferation (% binucleated cells)	Micronuclei per 2000 binucleated cells
NC	0.20	90.0 \pm 4.50	25.4 \pm 2.10
8-MOP + 600 J/m ² UVA (PUVA)	88.60**	44.3 \pm 2.90*	101.2 \pm 1.40**
DPDS 1.62 μ M plus PUVA	89.12	48.0 \pm 0.50	109.6 \pm 10.20
DPDS 3.15 μ M plus PUVA	75.10	46.1 \pm 3.70	96.40 \pm 0.25
DPDS 6.25 μ M plus PUVA	82.10	53.3 \pm 4.20	112.0 \pm 8.40
DPDS 12.5 μ M plus PUVA	91.00	46.0 \pm 2.00	100.4 \pm 6.20
DPDS 25 μ M plus PUVA	87.00	51.0 \pm 5.00	115.9 \pm 0.10

ICL: interstrand crosslinks, n = 9. The symbol * represents $p < 0.05$ and ** represents $p < 0.01$, as tested by one-way ANOVA (Tukey test); DPDS treatments were compared to cells only exposed to PUVA; PUVA treatment was compared against negative control. NC: negative control (DMSO 0.2%).

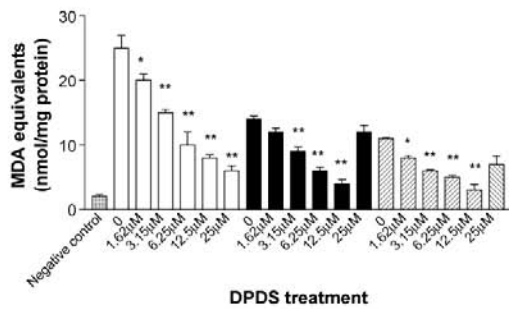


Fig. 4. Determination of TBARS of cells pretreated with DPDS at the indicated concentrations for 3 h and subsequently submitted to H₂O₂ (150 μM, clear bars), MMS (40 μM, black bars) or UVC radiation (5 J/m², hatched bars). Data are presented as mean ± S.D., *n* = 9. The symbol * represents *p* < 0.05 and ** represents *p* < 0.01, as tested by one-way ANOVA (Tukey test); DPDS pretreated cells were compared to cells exposed to mutagens.

3.6. Lipid peroxidation

In order to determine the oxidative damage triggered by the mutagens H₂O₂, MMS, and UVC, and the effect of DPDS on this event, the degree of lipid peroxidation was examined. As observed in Fig. 4, the treatment of cells with these agents resulted in a dose-dependent increase in TBARS production. When cells were pretreated with DPDS, the extension of lipid peroxidation was lower, suggesting that this molecule presents antioxidant activity.

3.7. Enzyme activities

In order to investigate whether the antioxidant properties of DPDS were mediated by an increase in antioxidant enzymes, SOD, CAT, and GPX activities were measured (Table 3). The treatment with this OS molecule at doses ranging from 1.62 to 25 μM did not increase SOD or CAT activity in cell extracts. However, when the medium

concentration of DPDS was increased, fibroblast GPX activity increased.

4. Discussion

In a previous study using V79 cells, it was shown that DPDS at low concentrations is not cytotoxic, genotoxic, or mutagenic [24]. In the present study, our aim was to evaluate the possible antigenotoxic/antimutagenic effects of DPDS on mammalian V79 cell line. This is the first study of this OS compound as a potential chemopreventive agent using several mutagens. H₂O₂ was used as oxidative agent; MMS, as monofunctional alkylating agent; UVC radiation, which induces structural helix distortions, and photo-activated 8-MOP, which induces ICL without generating any oxidative lesion.

DPDS at low concentrations is not cytotoxic to V79 cells, and protects against H₂O₂ oxidative damage by reducing the lipid peroxidation, as measured by TBARS levels [24]. However, relatively little is known about the effect of DPDS on oxidative DNA damage induced by ROS in mammalian cells. H₂O₂ is genotoxic, capable of inducing oxidative DNA damage, including DNA strand breakage and base modification [38]. The mutagenic effects of ROS, in particular of H₂O₂, which induces similar lesions as those caused by ionizing radiation, are well documented in V79 cells [8]. The present study presents evidences that DPDS has a strong protective effect against H₂O₂-induced oxidative DNA damage in V79 cells. Consistent with this protective effect, DPDS displayed a significant protection against H₂O₂-induced DNA breaks, as verified by the comet assay, and prevented induced mutation, as verified by the lower micronuclei rate (Table 1). The reason for this protection by DPDS at low doses is not obvious, but probably resides in the increase in GPX activity, providing additional antioxidant protection, as confirmed by the reduction of TBARS levels and by the measurement of enzyme activities (Fig. 4; Table 3).

Table 3
Influence of DPDS pre-treatment at lower concentrations during 3 h in medium without FBS on enzymatic activities in V79 cells

	Superoxide dismutase (SOD U/mg protein)	Catalase (μmol H ₂ O ₂ /mg protein min)	Glutathione peroxidase (nmols oxidized of NADPH/min mg protein)
Control	1.25 ± 0.60	11.3 ± 0.36	0.5 ± 0.09
DPDS 1.62 μM	1.80 ± 0.60	12.6 ± 2.20	0.8 ± 0.10*
DPDS 3.15 μM	1.16 ± 0.12	13.9 ± 2.10	1.0 ± 0.20**
DPDS 6.25 μM	0.90 ± 0.40	10.6 ± 2.10	1.6 ± 0.16**
DPDS 12.5 μM	1.42 ± 0.20	11.5 ± 1.05	2.2 ± 0.30**
DPDS 25 μM	0.80 ± 0.30	12.8 ± 1.90	0.9 ± 0.35

The symbol * represents *p* < 0.05 and ** represents *p* < 0.01, as tested by one-way ANOVA (Tukey test); DPDS treatments were compared to control (DMSO 0.2%).

The properties of some synthetic diselenides suggest that the cleavage and the reduction of their diselenide bond produces a selenol group, and therefore diselenides are successful in mimicking the enzyme GPX [39]. Diselenides are good candidates for antioxidant agents because they have some chemical and biochemical characteristics common with ebselen. In fact, DPDS is more active as a GPX mimetic, and it is less toxic to rodents than ebselen, presenting higher thiol peroxidase activity and antioxidant potential [10,40]. In *in vitro* models, ebselen protects against oxidative DNA damage induced by dopamine in the presence of copper ions [41]. Similarly, it provides potent protection against ROS-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 and HL-60 cell lines, through its antioxidant properties [15,42]. Ebselen also protects against aflatoxin B1 cytotoxicity via its strong ability to scavenge intracellular ROS, and to prevent oxidative damage [43]. Furthermore, it can inhibit pre-neoplastic changes caused by aflatoxin B1, at least in part, due the protective effect against oxidative damage [14]. The OS compound p-XSC inhibits the mutagenic effects of 4-nitroquinoline-N-oxide in rodents by stimulating selenium-dependent glutathione peroxidase [11]. Similarly, selenomethione at 8 ppm helped to maintain intracellular redox balance in mice with Dalton's lymphoma [44].

The present study also evaluated the performance of DPDS against alkylating agents. MMS is a typical monofunctional alkylating agent, and thus has been used as an experimental model compound for several decades to elucidate the toxicity mechanisms of alkylating agents relative to mutagenesis. MMS is a direct-acting alkylating agent, which presents low capacity to directly break DNA strands. Its action is mediated by base tautomerization [45–47]. There are numerous reports of alkylating agents rapid depletion of GSH in mammalian cells, thereby generating oxidative stress [48,49]. It has been postulated that the loss of GSH may compromise cellular antioxidant defenses, and lead to the accumulation of ROS generated as byproducts of normal cellular function. ROS generation plays a role in MMS-induced cytotoxicity, as shown by MMS-induced lipid peroxidation (Fig. 4). We found that DPDS treatment resulted in an improvement in survival, and reduced DNA damage and mutation caused by MMS-induced oxidative stress (Table 1).

GPX and GSH represent an important pathway for metabolizing hydrogen peroxide in the cell. The depletion of GSH may compromise this pathway, and thereby allow H₂O₂ to accumulate to toxic levels. However, DPDS treatment, in the broad range employed in this experiment, decreased TBARS levels, DNA damage, and

consequently, MMS-induced mutation. In addition, GPX activity was increased in cells pretreated with DPDS and submitted to MMS challenge. As mentioned above, this OS molecule has a potent GPX mimetic action.

Another possible mechanism is the protection against MMS by reducing its DNA alkylating ability. Taking into account that MMS presents non-metabolism-dependent genotoxicity, DPDS antigenotoxicity could be mediated mostly by compensation. Some synthetic antioxidants can act against mutation reactivity, although in a still unexplained manner [45]. Little research has been carried out to test the composite efficiency of selenium compounds against alkylating agents, and the few results are still controversial. No evidence for enhancement (or inhibition) of the repair of MMS-induced DNA damage was observed in human fibroblasts treated with sodium selenite [50]. However, in another study, sodium selenite showed antimutagenic effects against MMS in V79 cells [8]. Although sodium selenite was able to increase GPX activity in these cells, the exact mechanism of DPDS antimutagenesis remains unclear.

Selenium, as p-XSC, is highly effective in inhibiting lung tumors induced by the tobacco specific nitrosamine (TSNA) 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mice. It reduces NNK-induced DNA methylation by increasing levels of glutathione (GSH)-related antioxidants, as well as GSH oxidation markers in the NNK-induced lung tumor model. As a potent inducer of GSH and related thiol antioxidants in the lung, p-XSC decreases oxidative stress, and this may partially inhibit tumor formation by protecting against oxidative damage [20].

UVC-radiation can directly or indirectly damage DNA via production of free radicals and ROS, which can damage DNA molecules [51]. Agents able to protect against UVC-induced cellular DNA damage or that possess strong antioxidant properties may be useful against photocarcinogenesis. Accordingly, we found that DPDS is able to protect fibroblasts against UVC-induced DNA damage through its antioxidant activity (Tables 1 and 3).

Selenium compounds have anticancer activity, including protection from UV radiation-induced skin cancers, at least in mice, and the ability to modulate cellular redox status may also account for these chemopreventive properties. Furthermore, selenium acting through selenoenzymes may prevent oxidative-stress induced DNA damage [52]. Selenomethione protects human fibroblasts from UV at non-toxic selenium concentrations higher than 50 nM without any change in the rate or in the efficiency of DNA excision repair [52]. Interestingly, p-XSC was able to significantly reduce 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), but could not pre-

vent UV radiation-induced skin tumor in mice, despite the decrease in tumor induction by a combination of UV radiation and arsenite [53]. Diphenylmethyl selenocyanate may also be considered for further research in order to establish it as an effective cancer chemopreventive agent in photoprotection [21].

As shown in Fig. 3 and Table 2, DPDS did not protect cells against PUVA treatment. Upon photoactivation with UVA (UV-light of 360 nm), 8-MOP may form diadducts with thymine in DNA. The diadduct DNA lesion results from two consecutive reactions of 8-MOP with two thymine residues of opposite DNA strands, leading to DNA ICL, which have been quantitatively measured and seem to constitute the most toxic lesion amongst all those formed by photoactivated psoralens [54]. 8-MOP does not generate singlet oxygen as other psoralens, such as 3-carboxypsoralen and apparently induces a minimal oxidative DNA damage [54–57]. Treatment with DPDS does not protect against 8-MOP + UVA-induced DNA damage and mutagenesis, probably because this genotoxic lesion is formed without participation of ROS. Therefore, this reinforces that the protective effect of DPDS is due to this antioxidant activity.

Similar to p-XSC, DPDS presents antigenotoxic and antimutagenic activity at low doses, in the range of 1.62–12.5 μM . p-XSC is antimutagenic and anticarcinogenic in several biological models at 2.5–20 μM , but mainly at 2.5–5 μM [11]. Ebselen reduces ROS formation and the DNA damaging effect caused by H_2O_2 in HepG2 cells at 1–25 μM [15], and it protects ECV-304 cells against oxysterols at 2 μM [58]. The neuroprotective actions of ebselen are at 0.01–20 μM , with the best results obtained at 8 μM [59]. Sodium selenite increases GPX, and prevents mutagenesis by several mutagens in V79 cells at 0.3–1 μM , with 0.5 μM giving the most effective response [8]. These results are consistent with those reported in literature, which show that some OS compounds exhibit protective potential at lower concentrations. In concentrations of up to 50 μM , DPDS is genotoxic and clastogenic in V79 cell line [24].

In summary, the present findings suggest that treatment with low concentrations of DPDS, a synthetic seleno-organic compound, protects against MMS, UVC and H_2O_2 -induced cytotoxicity, DNA damage, and clastogenesis in V79 cells by increasing GPX activity. It can be used as a potent antigenotoxic agent against ROS-induced DNA lesions. Synthetic OS compounds can be tailored to achieve greater chemopreventive efficacy with minimal toxic side effects by structural modifications. Thus, the investigation of antimutagenic potential of DPDS and its structural derivatives

may help to develop novel efficient chemopreventive strategies.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Christine Gaylarde and Dr. Martin Brendel for critically reading the manuscript. This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and GENOTOX-Laboratório de Genotoxicity-Instituto Royal-Universidade Federal do Rio Grande do Sul. R. M. Rosa RM held a CAPES doctoral grant.

References

- [1] T. Aboul-Fadl, Selenium derivatives as cancer preventive agents, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5 (2005) 637–652.
- [2] P. Brenneisen, H. Steinbrenner, H. Sies, Selenium, oxidative stress, and health aspects, *Mol. Aspects Med.* 26 (2005) 256–267.
- [3] M. Soriano-Garcia, Organoselenium compounds as potential therapeutic and chemopreventive agents: a review, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 1657–1669.
- [4] G. Bronzetti, C. della Croce, Selenium: its important roles in life and contrasting aspects, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 12 (1993) 59–71.
- [5] K. El-Bayoumy, The protective role of selenium on genetic damage and on cancer, *Mutat. Res.* 475 (2001) 123–139.
- [6] K. El-Bayoumy, R. Sinha, Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach, *Mutat. Res.* 591 (2005) 224–236.
- [7] G.N. Schrauzer, Anticarcinogenic effects of selenium, *Cell Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1864–1873.
- [8] G. Bronzetti, M. Cini, L. Caltavuturo, R. Fiorio, C.D. Croce, Antimutagenicity of sodium selenite in Chinese hamster V79 cells exposed to azoxymethane, methylmethansulphonate and hydrogen peroxide, *Mutat. Res.* 523–524 (2003) 21–31.
- [9] R.C. von Borstel, J.A. Higgins, Janus carcinogens and mutagens, *Mutat. Res.* 402 (1998) 321–329.
- [10] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6255–6285.
- [11] K. El-Bayoumy, A. Das, B. Narayanan, N. Narayanan, E.S. Fiala, D. Desai, C.V. Rao, S. Amin, R. Sinha, Molecular targets of the chemopreventive agent 1,4-phenylenebis(methylene)-selenocyanate in human non-small cell lung cancer, *Carcinogenesis* 27 (2006) 1369–1376.
- [12] K. el-Bayoumy, C.V. Rao, B.S. Reddy, Multiorgan sensitivity to anticarcinogenesis by the organoselenium 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, *Nutr. Cancer* 40 (2001) 18–27.
- [13] B. Mukherjee, M. Basu, M. Chatterjee, Effect of selenomethionine on *N*-methylnitrosoguanidine-induced colonic aberrant crypt foci in rats, *Eur. J. Cancer Prev.* 10 (2001) 347–355.

- [14] C.F. Yang, J. Liu, S. Wasser, H.M. Shen, C.E. Tan, C.N. Ong, Inhibition of ebselen on aflatoxin B(1)-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats, *Carcinogenesis* 21 (2000) 2237–2243.
- [15] C.F. Yang, H.M. Shen, C.N. Ong, Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 273–279.
- [16] C.V. Rao, I. Cooma, J.G. Rodriguez, B. Simi, K. El-Bayoumy, B.S. Reddy, Chemoprevention of familial adenomatous polyposis development in the APC(min) mouse model by 1,4-phenylene bis(methylene)selenocyanate, *Carcinogenesis* 21 (2000) 617–621.
- [17] S.K. Lee, Y.H. Heo, V.E. Steele, J.M. Pezzuto, Induction of apoptosis by 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate in cultured human colon cancer cells, *Anticancer Res.* 22 (2002) 97–102.
- [18] J.B. Guttenplan, T.E. Spratt, M. Khmelnsky, W. Kosinska, D. Desai, K. El-Bayoumy, Effects of 3H-1,2-dithiole-3-thione, 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, and selenium-enriched yeast individually and in combination on benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis in oral tissue and esophagus in lacZ mice, *Mutat. Res.* 559 (2004) 199–210.
- [19] J.B. Guttenplan, W. Kosinska, M.M. von Pressentin, J. Rosa, K. El-Bayoumy, Effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate (p-XSC) and vitamin E on 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO)-induced mutagenesis in lacZ mouse upper aerodigestive tissue, *Mutat. Res.* 518 (2002) 85–93.
- [20] J.P. Richie Jr., W. Kleinman, D.H. Desai, A. Das, S.G. Amin, J.T. Pinto, K. El-Bayoumy, The organoselenium compound 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate inhibits 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced tumorigenesis and enhances glutathione-related antioxidant levels in A/J mouse lung, *Chem. Biol. Interact.* 161 (2006) 93–103.
- [21] R.K. Das, S.K. Hossain, S. Bhattacharya, Diphenylmethyl selenocyanate inhibits DMBA-croton oil induced two-stage mouse skin carcinogenesis by inducing apoptosis and inhibiting cutaneous cell proliferation, *Cancer Lett.* 230 (2005) 90–101.
- [22] R.M. Rosa, K. Sulzbacher, J.N. Picada, R. Roesler, J. Saffi, M. Brendel, J.A. Henriques, Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast, *Mutat. Res.* 563 (2004) 107–115.
- [23] R. Moreira Rosa, R.B. de Oliveira, J. Saffi, A.L. Braga, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, J.C. Fonseca Moreira, M. Brendel, J.A. Pegas Henriques, Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions, *Life Sci.* 77 (2005) 2398–2411.
- [24] R.M. Rosa, N. Picada Jdo, J. Saffi, J.A. Henriques, Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts, *Mutat. Res.* 628 (2007) 87–98.
- [25] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [26] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.
- [27] A. Hartmann, G. Speit, The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183–188.
- [28] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [29] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez, A. Hartmann, Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup, *Mutat. Res.* 627 (2007) 31–35.
- [30] F. Piao, N. Ma, Y. Hiraku, M. Murata, S. Oikawa, F. Cheng, L. Zhong, T. Yamauchi, S. Kawanishi, K. Yokoyama, Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels, *J. Occup. Health* 47 (2005) 445–449.
- [31] D. Bonacker, T. Stoiber, M. Wang, K.J. Bohm, I. Prots, E. Unger, R. Thier, H.M. Bolt, G.H. Degen, Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function, *Arch. Toxicol.* 78 (2004) 575–583.
- [32] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455 (2000) 81–95.
- [33] M.G. Salgo, W.A. Pryor, Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 333 (1996) 482–488.
- [34] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [35] C. Beauchamp, I. Fridovich, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.* 44 (1971) 276–287.
- [36] M.C. Carrillo, S. Kanai, M. Nokubo, K. Kitani, (–) Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats, *Life Sci.* 48 (1991) 517–521.
- [37] D.E. Paglia, W.N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 70 (1967) 158–169.
- [38] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40.
- [39] G. Mughesh, A. Panda, H.B. Singh, N.S. Puneekar, R.J. Butcher, Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 839–850.
- [40] T. Posser, M.B. Moretto, A.L. Dafre, M. Farina, J.B. da Rocha, C.W. Nogueira, G. Zeni, S. Ferreira Jdos, R.B. Leal, J.L. Franco, Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation, *Chem. Biol. Interact.* 164 (2006) 126–135.
- [41] Y. Li, Z. Cao, The neuroprotectant ebselen inhibits oxidative DNA damage induced by dopamine in the presence of copper ions, *Neurosci. Lett.* 330 (2002) 69–73.
- [42] J. Li, J.J. Chen, F. Zhang, C. Zhang, Ebselen protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HL-60 cells, *Acta Pharmacol. Sin.* 21 (2000) 455–459.
- [43] C.F. Yang, J. Liu, H.M. Shen, C.N. Ong, Protective effect of ebselen on aflatoxin B1-induced cytotoxicity in primary rat hepatocytes, *Pharmacol. Toxicol.* 86 (2000) 156–161.
- [44] S. Mukhopadhyay-Sardar, M.P. Rana, M. Chatterjee, Antioxidant associated chemoprevention by selenomethionine in murine tumor model, *Mol. Cell. Biochem.* 206 (2000) 17–25.
- [45] S.I. Franke, D. Pra, J. da Silva, B. Erdtmann, J.A. Henriques, Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo, *Mutat. Res.* 583 (2005) 75–84.

- [46] A.R. Peterson, DNA synthesis, mutagenesis, DNA damage, and cytotoxicity in cultured mammalian cells treated with alkylating agents, *Cancer Res.* 40 (1980) 682–688.
- [47] J.G. Zhang, F.A. Nicholls-Grzemeski, M.A. Tirmenstein, M.W. Fariss, Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents, *Chem. Biol. Interact.* 138 (2001) 267–284.
- [48] H. Liu, R. Lightfoot, J.L. Stevens, Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 4805–4812.
- [49] B. van de Water, J.P. Zoetewij, J.F. Nagelkerke, Alkylation-induced oxidative cell injury of renal proximal tubular cells: involvement of glutathione redox-cycle inhibition, *Arch. Biochem. Biophys.* 327 (1996) 71–80.
- [50] R.D. Snyder, Effects of sodium selenite on DNA and carcinogen-induced DNA repair in human diploid fibroblasts, *Cancer Lett.* 34 (1987) 73–81.
- [51] J. Taira, K. Mimura, T. Yoneya, A. Hagi, A. Murakami, K. Makino, Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells, *J. Biochem. (Tokyo)* 111 (1992) 693–695.
- [52] T.S. Rafferty, M.H. Green, J.E. Lowe, C. Arlett, J.A. Hunter, G.J. Beckett, R.C. McKenzie, Effects of selenium compounds on induction of DNA damage by broadband ultraviolet radiation in human keratinocytes, *Br. J. Dermatol.* 148 (2003) 1001–1009.
- [53] A.N. Uddin, F.J. Burns, T.G. Rossman, Vitamin E and organoselenium prevent the cocarcinogenic activity of arsenite with solar UVR in mouse skin, *Carcinogenesis* 26 (2005) 2186.
- [54] D. Averbeck, S. Averbeck, DNA photodamage, repair, induction and genotoxicity following exposures to 254 nm and 8-methoxypsoralen plus UVA in a eukaryotic cell sy *Photochem. Photobiol.* 68 (1998) 289–295.
- [55] J.M. Cardone, L.F. Revers, R.M. Machado, D. Bonatt-Brendel, J.A. Henriques, Psoralen-sensitive mutant *psor5* *Saccharomyces cerevisiae* contains a mutant allele of the damage checkpoint gene MEC3, *DNA Rep. (Amst)* 5 (163–171).
- [56] C.B. Querol, S.O. Paesi-Toresan, L.B. Meira, M. Brendel Henriques, Isolation and characterization of three mutants: increased sensitivity to photoactivated 3-carbethoxypsoralen *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 25 (1994) 407–41.
- [57] M. Dardalhon, D. Averbeck, Induction and removal of DNA strand cross-links in V-79 Chinese hamster cells measured by hydroxylapatite chromatography after treatments with bifunctional furocoumarins, *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 1020.
- [58] Q. Wu, K. Huang, Protective effect of ebselen on cytotoxicity induced by cholestane-3 beta, 5 alpha, 6 beta-triol in EC3 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 350–359.
- [59] J.H. Xu, H.T. Hu, Y. Liu, Y.H. Qian, Z.H. Liu, Q.R. Tar Zhang, Neuroprotective effects of ebselen are associated with regulation of Bcl-2 and Bax proteins in cultured mouse cerebellar neurons, *Neurosci. Lett.* 399 (2006) 210–214.



CAPÍTULO – IV

***DNA damage in tissues and organs
of mice treated with diphenyl
diselenide***

Mutation Research 633:35-45, 2007.



DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide

Renato Moreira Rosa^a, Nicolás Carlos Hoch^a, Gabriel Vasata Furtado^a,
Jenifer Saffi^{a,b}, João Antonio Pêgas Henriques^{a,b,*}

^a Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil

Received 12 March 2007; received in revised form 24 April 2007; accepted 9 May 2007

Available online 18 May 2007

Abstract

Diphenyl diselenide (DPDS) is an organoselenium compound with interesting pharmacological activities and various toxic effects. In previous reports, we demonstrated the pro-oxidant action and the mutagenic properties of this molecule in bacteria, yeast and cultured mammalian cells. This study investigated the genotoxic effects of DPDS in multiple organs (brain, kidney, liver, spleen, testes and urinary bladder) and tissues (bone marrow, lymphocytes) of mice using *in vivo* comet assay, in order to determine the threshold of dose at which it has beneficial or toxic effects. We assessed the mechanism underlying the genotoxicity through the measurement of GSH content and thiobarbituric acid reactive species, two oxidative stress biomarkers. Male CF-1 mice were given 0.2–200 $\mu\text{mol/kg}$ BW DPDS intraperitoneally. DPDS induced DNA damage in brain, liver, kidney and testes in a dose response manner, in a broad dose range at 75–200 $\mu\text{mol/kg}$ with the brain showing the highest level of damage. Overall, our analysis demonstrated a high correlation among decreased levels of GSH content and an increase in lipid peroxidation and DNA damage. This finding establishes an interrelationship between pro-oxidant and genotoxic effects. In addition, DPDS was not genotoxic and did not increase lipid peroxidation levels in any organs at doses $<50 \mu\text{mol/kg}$. Finally, pre-treatment with *N*-acetyl-cysteine completely prevented DPDS-induced oxidative damage by the maintenance of cellular GSH levels, reinforcing the positive relationship of DPDS-induced GSH depletion and DNA damage. In summary, DPDS induces systemic genotoxicity in mammals as it causes DNA damage in vital organs like brain, liver, kidney and testes.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Organoselenium; Diphenyl diselenide; Genotoxicity; Oxidative damage; Comet assay

1. Introduction

Selenium, an essential trace element for animals, is known to have antioxidant and chemopreventive

potential in numerous animal model systems and cancer chemopreventive efficacy in humans [1,2]. Ingestion of the major known dietary sources of selenium, such as selenomethionine, selenocysteine and inorganic selenium, is limited by toxicity. Thus, a number of synthetic derivatives have been developed. In the last few decades, interest in organoselenium (OS) biochemistry has intensified because the pharmacology of synthetic OS compounds revealed molecules that could be used as antioxidants, enzyme inhibitors, neuroprotective, anti-tumor and anti-infec-

* Corresponding author at: Departamento de Biofísica, Prédio 43422, Laboratório 210, Campus do Vale, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33166069; fax: +55 51 33167003.

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (J.A.P. Henriques).

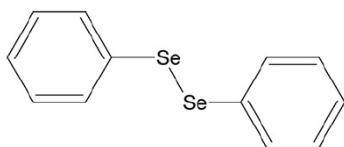


Fig. 1. Chemical structure of diphenyl diselenide.

tious agents, cytokine inducers and immunomodulators [3,4].

Diphenyl diselenide (DPDS, Fig. 1) is a simple and stable OS compound. It is an electrophilic reagent used in the synthesis of a variety of pharmacologically active OS compounds [5]. Recently the biological activity of DPDS has been studied and this compound has become a good candidate for therapeutic proposals, since it presents very interesting pharmacological effects. When compared to other tested diselenide substitutes or ebselen, DPDS exhibits high thiol peroxidase activity and better antioxidant potential as a glutathione peroxidase mimic [3,5,6]. It furthermore has neuroprotective, anti-inflammatory and hepatoprotective properties [3,7–12].

However, DPDS also presents toxic effects as it inhibits δ -aminolevulinic acid dehydratase in several tissues and organs, as well as voltage-dependent calcium channel and Na^+/K^+ -ATPase in mouse brain [13–16]. Moreover, chronic exposure to high doses of DPDS affects the central nervous system, causing seizures, and impairment of glutamatergic transmission [17]. In microbial models, DPDS was mutagenic and recombinogenic [5]. Using yeast mutant strains defective in antioxidant defenses, we showed that this OS acts as a pro-oxidant agent by depleting free reduced glutathione (GSH), probably via adduct formation, thus sensitizing the cell to the damaging effect of reactive oxygen species (ROS) [18].

Recently, we demonstrated that the cytotoxicity of DPDS in cultured V79 mammalian cells can be ascribed to its ability to deplete GSH, leading to a pro-oxidant cellular status, as verified by an increase of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels and sensitization to H_2O_2 -induced cytotoxicity and DNA damage; in these conditions, DPDS was clearly genotoxic and mutagenic [19].

The present study aims at investigating whether treatment of mice by intraperitoneal injection with DPDS can induce DNA damage in several organs and tissues, using the *in vivo* comet assay. To evaluate the possible mechanism underlying any effects, we also evaluated both GSH content and TBARS levels, two oxidative stress biomarkers. The results of this study were useful for determining occupational hazards, to evaluate the safety of future

pharmacological application, and in understanding the role of DNA damage in DPDS toxicity, mainly in neurotoxic effects.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

DPDS (Chemical Abstracts Services registry number 1666-13-3) was provided by Dr. Antônio Braga, Federal University of Santa Maria, Brazil. RPMI 1640 media and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), NADPH, glutathione reductase, Hank's balanced salt solution (HBSS), Histopaque-1077, thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP), *N*-acetylcysteine (*N*-ac), 5,5'-dithionitrobenzoic acid (DTNB), methyl methanesulphonate (MMS), and 4-vinyl-pyridine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All others reagents were of analytical grade.

2.2. Animals and experimental design

Male CF-1 mice, aged 9 weeks and weighing from 27 to 32 g, were purchased from the State Foundation for Health Science Research (FEPPS/LACEN-RS, Porto Alegre, Brazil). Animals were housed five to a cage and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h), receiving a commercial standard mouse cube diet (Nuvilab, CR1, Moinho Nuvital Ltd., Curitiba, PR, Brazil) and water *ad libitum*. The animal room was maintained at 20–24 °C and 55–60% humidity. The mice were acclimated to the laboratory for at least 7 days prior to experimentation. All procedures were carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care.

The study design included 7 groups of 10 mice each, caged separately, which were treated intraperitoneally (i.p.) in a single dose with 0.2, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 and 200 $\mu\text{mol/kg}$ body weight (BW) DPDS stock solution was dissolved in DMSO and subsequently diluted in physiological saline. In this manner, DMSO final concentration is lower than 0.1% and therefore did not affect the DPDS toxicity, as previously observed [5,18,19]. The total injection volume was 10 mL/kg. The control group received a single i.p. dose of vehicle, i.e., physiological saline solution containing DMSO at 0.1%. A positive control group dosed with 360 $\mu\text{mol/kg}$ BW (about 40 mg/kg BW) of MMS was also included [20,21]. The doses of DPDS were based on published data in respect to its pharmacological and toxic effects [7,9,13,14].

When *N*-ac pre-treatment was performed, animals received a single i.p. dose of 1840 $\mu\text{mol/kg}$ BW (about 300 mg/kg BW) 3 h before DPDS administration, because at this dose *N*-ac increases the glutathione content in mice tissues [10,22,23]. In

all groups without *N*-ac pre-treatment, 3 h before the designed treatment, a single i.p. dose of saline solution was applied.

Group 1: vehicle control, received saline solution and DMSO 5 mL/kg BW after 3 h. Group 2: positive control, received saline solution and MMS 40 mg/kg after 3 h. Groups 3–11 were given saline solution and, after 3 h, DPDS i.p. as follows: Group 3, 0.2 μ mol/kg BW; Group 4, 1 μ mol/kg BW; Group 5, 5 μ mol/kg BW; Group 6, 25 μ mol/kg BW; Group 7, 50 μ mol/kg BW; Group 8, 75 μ mol/kg BW; Group 9, 100 μ mol/kg BW; Group 10, 150 μ mol/kg BW; Group 11, 200 μ mol/kg BW. Group 12: *N*-ac 1840 μ mol/kg BW and DMSO 5 mL/kg BW after 3 h. Groups 13–16 were given *N*-ac 300 mg/kg and, after 3 h, DPDS i.p. as follows: Group 13, 75 μ mol/kg BW; Group 14, 100 μ mol/kg BW; Group 15, 150 μ mol/kg BW; Group 16, 200 μ mol/kg BW.

Animals were sacrificed by decapitation 3 h after treatment, and the organs (brain, isolated femurs, kidney, liver, spleen, testes and urinary bladder) were removed immediately and washed in ice-cold phosphate buffered saline solution (PBS) pH 7.4 to remove superficial blood. The urinary bladder was opened before washing. The organs were minced and washed again in ice-cold PBS to remove red cells. Peripheral blood samples were collected from the heart using a fine needle.

2.3. Single-cell preparation from tissues

Lymphocytes were isolated from whole blood using Histopaque-1077 according to Boyum [24] with slight modifications. Briefly, 20 μ L of blood was added to 1 mL RPMI-1640 and layered over 100 μ L Histopaque. This was centrifuged at $500 \times g$ for 3 min. The interface of media/Histopaque containing the lymphocytes was taken and added to 1 mL RPMI-1640 media. It was then centrifuged at $500 \times g$ for 3 min to pellet the lymphocytes, which were resuspended in PBS for further studies. Both the femurs were dissected out and cleaned thoroughly to remove muscles and other tissue. Bone marrow cells were flushed in 0.1 mL FBS using a syringe.

2.4. Single-cell preparation from organs

Preparation of a single-cell suspension from organs was done according to the method described by Tice et al. [25]. Briefly, 0.2 g of each organ was placed in 1 mL chilled mincing solution (HBSS with 20 mM EDTA and 10% DMSO) in a Petridish and chopped into pieces with a pair of scissors. The pieces were allowed to settle and the supernatant containing the single cells was taken.

2.5. Cell counting and viability assay

Cells from organs and tissues were counted using a hemocytometer and diluted with ice-cold PBS pH7.4 to achieve a concentration of 0.5×10^6 viable cells/mL and were used to prepare slides for the comet assay. The viability of cells isolated was checked by trypan blue exclusion method.

2.6. Comet assay

The alkaline comet assay, which detects strand breaks, alkali-labile sites, crosslinking and incomplete excision repair sites in DNA, was performed as described by Singh et al. [26], with minor modifications [27–29]. Cell suspension were embedded in 95 μ L of 0.75% low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. Agarose was allowed to set at 4 °C for 5 min. The slides were then incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH10.0) at 4 °C for at least 1 h in order to remove cellular proteins and membranes, leaving the DNA as “nucleoids”. After the lysis procedure, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit. The unit was filled with fresh buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13.0), which covered the slides for 20 min at 4 °C in order to allow DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V (0.9 V/cm) and 300 mA. All the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water, and stained using a silver staining protocol as described in [30]. After the staining step, gels were left to dry at room temperature overnight, and analyzed using an optical microscope. In order to ensure adequate electrophoresis conditions and efficiency, negative and positive internal controls (human blood with and without 40 μ M MMS treatment) were included in each experiment. Test slides were scored only when internal controls showed clearly positive and negative appearances [21].

One hundred cells (50 cells from each of two replicate slides of each organ or tissue) were selected, and analyzed for DNA migration. When selecting cells, edges and cells around air bubbles were avoided [29]. These cells were visually scored according to tail length into five classes—(1) class 0: undamaged, without a tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with a tail length 1–2 \times the diameter of the head; (4) class 3: with a tail longer than 2 \times the diameter of the head and (5) class 4: comets with no heads. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method [31]. A value (damage index) was assigned to each comet according to its class. Damage index (DI) is an arbitrary score calculated from cells in different damage classes, which are classified in the visual score by the measurement of DNA migration length and on the amount of DNA in the tail. Damage frequency (DF) is a proportion of the cells that show tails after electrophoresis and also was considered in our analyses. The DI ranges from 0 (no tail: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum migration: 100 cells \times 4) [27–29,31]. Damage frequency (%) was calculated based on number of cells with tails as compared with those with no tail. The vehicle was used as negative control, and MMS treatment at 4×10^{-5} M for 1 h was used as positive control.

2.7. Measurement of lipid peroxidation

The extent of DPDS-induced lipid peroxidation was determined by the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA), a product formed by lipid peroxidation. The assays were performed according to Draper and Hadley [32], with minor modifications. Briefly the samples were mixed with 1 mL 0.4 mg/mL TCA, 0.25 M HCl were added to the cell suspension, which was then incubated with 6.7 mg/mL TBA for 15 min at 100 °C. The mixture was centrifuged at $750 \times g$ for 10 min. As TBA reacts with other products of lipid peroxidation in addition to MDA, results are expressed in terms of thiobarbituric reactive species (TBARS), which were determined by absorbance at 532 nm. Hydrolyzed TMP was used as the standard. The results were normalized by protein content [33].

2.8. Determination of total glutathione, GSH and GSSG

Total glutathione (GSH plus GSSG) was determined by photometric determination of 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), which was produced from DTNB in a kinetic assay, according to Akerboom and Sies [34] with minor modifications. Briefly, an aliquot of cell suspension were harvested and washed with ice-cold PBS. Cells were then suspended in 0.1 M sodium phosphate–5 mM EDTA pH 8.0, and sonicated to obtain the cell homogenate. An equal volume of 2 M HClO₄–4 mM EDTA was added to the cell extract, and the precipitated proteins were sedimented by centrifugation at $8000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was neutralized with 2 M KOH and 0.3 M morpholine propanesulfonic acid (MOPS), and the insoluble residue was removed by centrifugation under the same conditions. For the spectrophotometric determination, 910 μ L of the cell extract supernatant or of the standard glutathione solution, in the same phosphate–EDTA buffer, were mixed with 50 μ L of 4 mg/mL NADPH in 0.5% (w/v) NaHCO₃, 20 μ L of 6 U/mL glutathione reductase in phosphate–EDTA buffer, and 20 μ L of 1.5 mg/mL DTNB in 0.5% NaHCO₃. The increase in absorbance was measured at 412 nm. Total glutathione content was determined in μ mol/mg protein. For GSSG determination, 4-vinylpyridine was added to a final concentration of 0.1% (v/v), and then incubated for 1 h at room temperature. At this concentration, 4-vinylpyridine is able to react with all GSH without interfering with the GSSG determination. GSH was determined based on the total glutathione and GSSG concentration results.

2.9. Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.) of the means. The analysis parameters were tested for homogeneity of variance and normality, and were found normally distributed. The data were, therefore, analyzed by use of one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc analysis. The Tukey–Kramer test post hoc was applied to identify significance among groups compared with the respective controls. In all cases $p < 0.01$ was considered statistically significant.

GraphPad software, Inc. (Version 3.06) was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Evidence of DNA damage

Cell viability for all samples was found to be more than 90% in every experiment (data not shown). None of the animals died during the experiment. In the test period and at the employed doses, the animals did not show typical symptoms associated with toxicity such as stereotypical behavior, ataxia, diarrhea, increased diuresis or abdominal writhings, except the group that received DPDS at 200 μ mol/kg, which showed tonic clonic seizures episodes. The internal controls of the comet assay (human blood) showed low damage in the negative control (DI = 0–10) and high damage in the positive control – MMS treatment at 40 μ M – (DI = 180–300), thus validating the test conditions. Furthermore, increases in both DI and DF were found in cells isolated from organs and tissues of mice treated with the positive control MMS, as expected [5,27], thus validating the ability of the test to detect DNA-damaging compounds (Table 1).

Table 1 reports the DNA-damaging effects of a single i.p. administration of DPDS in bone marrow, brain, kidney, liver, lymphocytes, spleen, testes and urinary bladder, as detected by the alkaline comet assay. DPDS did not generate significant DNA damage in any organ or tissue at doses until 50 μ mol/kg. However, a statistically significant dose-dependent increase in DNA damage was observed in brain, liver, kidney and testes of mice exposed to DPDS at doses of 75, 100, 150 and 200 μ mol/kg, as was evident from an increase in the DI and DF. These results indicate that DPDS induces DNA damage at these doses and that brain, liver, kidney and testes are target organs. In contrast, no significant DNA damage was observed in bone marrow, lymphocytes, spleen or urinary bladder at any tested dose.

When the DI values were compared at the genotoxic doses of DPDS in relation to the vehicle, brain was found to exhibit the highest level of DNA damage. Therefore, the brain is the primary target organ for DPDS-induced DNA damage, since it shows the greatest severity of lesions induced by this OS molecule (Table 1).

3.2. Pro-oxidant effect of DPDS

To determine the oxidative damage triggered by DPDS in target organs, we examined the dose-dependent degree of lipid peroxidation induced by exposure to this OS compound at toxic doses. As seen in Table 2, treat-

Table 1
Genotoxicity induced by DPDS treatment in organs and tissues of mice treated with single i.p. dose using comet assay

Treatment	Group	Bone marrow	Brain	Kidney	Liver	Lymphocytes	Spleen	Testes	Urinary bladder
DI									
Vehicle	1	20.1 ± 4.8	33.0 ± 10.9	32.4 ± 6.8	46.4 ± 3.0	10.0 ± 1.4	49.0 ± 10.4	59.9 ± 5.0	40.1 ± 2.8
MMS 40 µmol/kg BW	2	41.1 ± 0.6**	105.2 ± 12.6**	91.6 ± 7.9**	99.1 ± 0.9**	96.0 ± 11.8**	146.4 ± 6.0**	115.8 ± 2.9**	63.5 ± 8.4**
DPDS 0.2 µmol/kg BW	3	18.1 ± 5.1	30.1 ± 5.0	30.0 ± 6.0	40.3 ± 3.9	13.1 ± 3.4	51.5 ± 7.3	60.3 ± 4.1	33.1 ± 2.5
DPDS 1.0 µmol/kg BW	4	16.6 ± 3.3	36.4 ± 4.1	31.5 ± 2.4	44.1 ± 0.9	11.5 ± 4.6	53.2 ± 5.2	58.0 ± 3.4	37.0 ± 1.9
DPDS 5.0 µmol/kg BW	5	19.4 ± 1.7	42.7 ± 3.1	33.8 ± 4.7	46.0 ± 9.4	14.0 ± 8.1	50.4 ± 4.5	64.1 ± 6.0	38.8 ± 5.7
DPDS 25.0 µmol/kg BW	6	20.3 ± 6.3	46.5 ± 7.9	35.9 ± 0.7	48.3 ± 2.0	16.2 ± 5.7	55.3 ± 2.5	66.0 ± 4.0	36.4 ± 5.8
DPDS 50.0 µmol/kg BW	7	20.8 ± 7.9	94.2 ± 12.5	40.8 ± 1.2	50.5 ± 3.3	15.0 ± 9.0	50.1 ± 6.4	68.5 ± 7.3	40.4 ± 11.0
DPDS 75.0 µmol/kg BW	8	22.4 ± 1.2	105.0 ± 11.0**	59.4 ± 3.2**	71.0 ± 3.5**	11.2 ± 0.6	54.0 ± 9.2	78.0 ± 2.1**	41.2 ± 9.5
DPDS 100.0 µmol/kg BW	9	23.9 ± 7.0	117.3 ± 9.0**	66.5 ± 3.0**	80.0 ± 4.7**	13.5 ± 2.7	55.2 ± 3.4	90.1 ± 8.4**	38.3 ± 9.3
DPDS 150.0 µmol/kg BW	10	22.5 ± 8.4	125.3 ± 10.9**	79.1 ± 9.1**	85.6 ± 5.2**	16.4 ± 1.8	50.8 ± 6.9	95.3 ± 2.8**	44.0 ± 8.4
DPDS 200.0 µmol/kg BW	11	20.7 ± 2.5	131.4 ± 12.8**	105.7 ± 8.9**	93.1 ± 5.0**	10.1 ± 3.5	53.3 ± 3.5	100.4 ± 9.0**	40.3 ± 1.6
DF									
Vehicle	1	16.4 ± 1.1	30.0 ± 3.0	16.1 ± 4.0	40.0 ± 4.8	15.9 ± 6.0	45.0 ± 7.5	58.8 ± 2.1	45.0 ± 8.7
MMS 40 µmol/kg BW	2	24.5 ± 1.0**	46.3 ± 8.0**	65.0 ± 2.8**	60.4 ± 1.7**	70.1 ± 4.6**	91.5 ± 6.1**	97.6 ± 6.0**	80.2 ± 0.1**
DPDS 0.2 µmol/kg BW	3	18.4 ± 0.9	28.1 ± 5.2	17.0 ± 2.0	37.0 ± 2.9	16.1 ± 0.4	48.3 ± 1.6	50.2 ± 10.4	43.5 ± 2.9
DPDS 1.0 µmol/kg BW	4	19.3 ± 2.5	30.2 ± 5.0	18.4 ± 3.5	39.1 ± 0.7	17.9 ± 2.0	49.4 ± 0.6	52.8 ± 4.9	42.1 ± 7.8
DPDS 5.0 µmol/kg BW	5	10.0 ± 1.2	31.4 ± 2.6	20.3 ± 1.9	41.0 ± 2.0	17.4 ± 4.1	43.0 ± 8.4	56.5 ± 3.7	44.0 ± 3.0
DPDS 25.0 µmol/kg BW	6	12.9 ± 3.8	35.7 ± 0.8	21.5 ± 3.0	45.0 ± 6.0	20.0 ± 2.8	47.6 ± 11.5	63.3 ± 4.0	46.0 ± 2.1
DPDS 50.0 µmol/kg BW	7	10.1 ± 5.0	37.0 ± 4.0	25.0 ± 5.5	47.0 ± 4.2	24.1 ± 4.0	45.0 ± 2.0	65.2 ± 3.8	48.5 ± 4.0
DPDS 75.0 µmol/kg BW	8	19.8 ± 1.0	49.4 ± 2.0**	39.9 ± 6.5**	55.1 ± 0.3**	16.3 ± 5.0	46.1 ± 4.3	74.1 ± 1.0**	50.1 ± 1.9
DPDS 100.0 µmol/kg BW	9	16.5 ± 8.4	53.1 ± 4.0**	56.0 ± 2.0**	60.2 ± 0.8**	10.0 ± 1.3	48.0 ± 1.3	89.3 ± 5.9**	44.6 ± 3.4
DPDS 150.0 µmol/kg BW	10	13.8 ± 1.0	67.5 ± 3.1**	61.0 ± 2.6**	73.1 ± 4.2**	11.2 ± 7.9	52.0 ± 2.0	92.3 ± 1.4**	47.0 ± 6.0
DPDS 200.0 µmol/kg BW	11	18.2 ± 0.4	85.4 ± 0.5**	73.4 ± 0.2**	85.0 ± 3.0**	12.2 ± 4.3	40.3 ± 6.9	97.3 ± 2.9**	40.6 ± 1.8

DI: damage index; DF: damage frequency. Data are presented as mean ± S.D.; $n = 10$ animals per group. The symbol (**) represents $p < 0.01$, as tested by one-way ANOVA (Tukey test); DPDS treatments were compared to the vehicle. MMS treatment was compared to vehicle.

Table 2
Determination of TBARS in target organs for DPDS genotoxicity in mice treated with DPDS in a single i.p. dose

Treatment	Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (nmol MDA/mg protein)				
	Group	Brain	Liver	Kidney	Testes
Vehicle	1	6.2 ± 0.8	7.6 ± 0.8	3.3 ± 0.8	3.9 ± 0.2
MMS 40 µmol/kg BW	2	24.2 ± 0.4*	15.0 ± 1.7*	7.8 ± 0.6*	7.0 ± 0.4*
DPDS 50.0 µmol/kg BW	7	7.4 ± 2.1	8.0 ± 0.5	4.1 ± 1.5	4.2 ± 0.3
DPDS 75.0 µmol/kg BW	8	19.0 ± 0.9*	12.6 ± 0.8*	9.0 ± 1.6*	9.9 ± 0.3*
DPDS 100.0 µmol/kg BW	9	29.5 ± 1.0*	13.9 ± 2.0*	16.0 ± 2.0*	13.1 ± 1.0*
DPDS 150.0 µmol/kg BW	10	32.2 ± 1.6*	15.4 ± 2.3*	18.1 ± 0.3*	19.0 ± 1.9*
DPDS 200.0 µmol/kg BW	11	38.5 ± 1.4*	18.0 ± 3.0*	20.0 ± 3.6*	21.4 ± 0.4*

Data are presented as mean ± S.D., $n = 10$. The symbol (*) represents $p < 0.01$ as tested by one-way ANOVA (Tukey test); DPDS treatments were compared to vehicle. MMS treatment was compared to vehicle.

ment with DPDS resulted in a dose-dependent increase in TBARS production. This increase was statistically significant at doses 75–200 µmol/kg.

3.3. GSH depletion induced by DPDS

To further understand the possible mechanism of oxidative damage involved in the treatment with the higher doses of DPDS, we determined intracellular total glutathione, GSH, and GSSG in target organs. There was no obvious change in GSH concentration in the treatments with doses until 50 µmol/kg DPDS (Table 3). However, treatments with 75, 100, 150 and 200 µmol/kg in single i.p. administration significantly reduced the concentration of reduced form of intracellular glutathione but did not increase that of the oxidized form (GSSG). Apparently, DPDS depleted GSH in

mice organs and tissues, therefore increasing the ratio GSSG/GSH.

3.4. N-ac pre-treatment abolishes DPDS genotoxicity

Table 4 shows the effects of single i.p. pre-treatment of *N-ac* on GSH content, lipid peroxidation degree and DNA damage in target organs of DPDS. *N-ac* pre-treatment decreased DNA damage induced by DPDS. Furthermore, the administration of *N-ac* prevented DPDS-generated oxidative damage at all exposure doses, as seen by the reduced levels of TBARS.

Intracellular level of GSH in tissues and organs was modulated prior to DPDS exposure by *N-ac* treatment at this dose, as expected. As seen in Table 4, the intracellular GSH content increased with *N-ac* pre-treatment.

Table 3
Effect of DPDS on intracellular GSH and GSSG levels in mice target organs

Treatment	GSH (nmol/mg protein) and GSSG (nmol GSH equivalents/mg protein)								
	Group	Brain		Liver		Kidney		Testes	
		GSH	GSSG	GSH	GSSG	GSH	GSSG	GSH	GSSG
Vehicle	1	48.3 ± 0.8	1.2 ± 0.2	70.3 ± 5.6	2.3 ± 0.2	53.5 ± 9.0	2.0 ± 0.3	46.4 ± 5.7	5.0 ± 0.2
MMS 40 µmol/kg BW	2	26.0 ± 1.2**	1.0 ± 0.1	45.0 ± 6.1**	2.5 ± 0.3	44.0 ± 4.6	2.2 ± 0.2	36.0 ± 1.2*	5.2 ± 0.4
DPDS 50.0 µmol/kg BW	7	46.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	67.1 ± 1.5	2.1 ± 0.1	52.0 ± 3.0	2.1 ± 0.2	45.8 ± 4.0	5.6 ± 0.5
DPDS 75.0 µmol/kg BW	8	30.2 ± 4.0**	1.1 ± 0.3	56.2 ± 1.1**	2.0 ± 0.2	30.2 ± 2.8**	1.9 ± 0.3	35.1 ± 0.2*	4.6 ± 0.5
DPDS 100.0 µmol/kg BW	9	22.1 ± 1.3**	0.9 ± 0.2	45.2 ± 3.9**	2.1 ± 0.1	26.1 ± 2.8**	2.1 ± 0.4	30.2 ± 1.4*	4.5 ± 0.3
DPDS 150.0 µmol/kg BW	10	14.3 ± 3.0**	1.2 ± 0.3	36.0 ± 7.0**	1.9 ± 0.3	20.0 ± 6.0**	2.0 ± 0.2	27.0 ± 0.2**	4.7 ± 0.1
DPDS 200.0 µmol/kg BW	11	4.0 ± 1.4**	1.0 ± 0.2	16.1 ± 3.8**	2.2 ± 0.1	14.0 ± 0.5**	2.1 ± 0.3	20.1 ± 0.4**	5.5 ± 0.3

Data are expressed as mean ± S.D., $n = 10$. The symbol (*) represents $p < 0.05$ and (**) represents $p < 0.01$, as tested by one-way ANOVA (Tukey test); DPDS treatments were compared to vehicle; MMS treatment was compared to vehicle.

Table 4
Effects of *N*-ac pre-treatment on genotoxicity, lipid peroxidation and GSH content in target organs for DPDS toxicity

Organ/treatment	Group	Parameter			
		DI (comet assay)	DF (comet assay)	TBARS (nmol MDA/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)
Brain					
<i>N</i> -ac 1840 μ mol/kg BW	12	22.0 \pm 3.1*	20.0 \pm 1.5*	2.0 \pm 0.2*	73.5 \pm 2.3*
DPDS 75.0 μ mol/kg BW	13	28.1 \pm 2.7*	22.1 \pm 3.4*	2.5 \pm 0.3*	66.1 \pm 2.0*
DPDS 100.0 μ mol/kg BW	14	31.2 \pm 6.0*	25.2 \pm 6.0*	2.9 \pm 0.1*	60.1 \pm 3.5*
DPDS 150.0 μ mol/kg BW	15	35.4 \pm 2.8*	31.3 \pm 0.9*	3.5 \pm 0.3*	55.8 \pm 1.9*
DPDS 200.0 μ mol/kg BW	16	39.0 \pm 8.9*	35.0 \pm 0.7*	4.9 \pm 0.5*	50.0 \pm 2.0*
Liver					
<i>N</i> -ac 1840 μ mol/kg BW	12	34.3 \pm 1.0*	29.0 \pm 2.6*	0.5 \pm 0.1*	103.8 \pm 8.6*
DPDS 75.0 μ mol/kg BW	13	36.0 \pm 2.9*	32.0 \pm 1.8*	0.8 \pm 0.2*	97.3 \pm 0.9*
DPDS 100.0 μ mol/kg BW	14	41.3 \pm 0.8*	35.4 \pm 1.6*	1.3 \pm 0.4*	90.5 \pm 7.0*
DPDS 150.0 μ mol/kg BW	15	46.9 \pm 1.3*	40.0 \pm 5.5*	2.5 \pm 0.2*	85.4 \pm 2.0*
DPDS 200.0 μ mol/kg BW	16	53.0 \pm 7.4*	43.0 \pm 2.0*	3.9 \pm 0.5*	79.0 \pm 4.5*
Kidney					
<i>N</i> -ac 1840 μ mol/kg BW	12	25.2 \pm 2.4*	9.0 \pm 2.0*	2.0 \pm 0.5*	75.5 \pm 11.0*
DPDS 75.0 μ mol/kg BW	13	28.1 \pm 0.2*	11.4 \pm 1.9*	2.7 \pm 0.2*	73.1 \pm 0.2*
DPDS 100.0 μ mol/kg BW	14	34.5 \pm 2.5*	15.2 \pm 7.1*	3.0 \pm 0.2*	64.0 \pm 3.0*
DPDS 150.0 μ mol/kg BW	15	39.0 \pm 0.7*	19.2 \pm 1.5*	4.5 \pm 0.6*	59.2 \pm 1.7*
DPDS 200.0 μ mol/kg BW	16	41.3 \pm 5.0*	22.8 \pm 4.1*	5.0 \pm 1.2*	52.4 \pm 4.7*
Testes					
<i>N</i> -ac 1840 μ mol/kg BW	12	45.1 \pm 3.5*	49.9 \pm 6.0*	2.0 \pm 0.7*	68.0 \pm 2.3*
DPDS 75.0 μ mol/kg BW	13	49.4 \pm 4.6*	42.0 \pm 4.1*	2.8 \pm 0.1*	63.5 \pm 1.4*
DPDS 100.0 μ mol/kg BW	14	52.0 \pm 7.1*	45.8 \pm 3.5*	4.5 \pm 0.6*	59.1 \pm 2.0*
DPDS 150.0 μ mol/kg BW	15	55.1 \pm 6.3*	51.2 \pm 0.9*	6.0 \pm 0.7*	50.1 \pm 4.0*
DPDS 200.0 μ mol/kg BW	16	59.1 \pm 3.2*	55.6 \pm 8.0*	7.1 \pm 1.3*	42.1 \pm 0.3*

Data are expressed as mean \pm S.D., $n=10$. The symbol (*) indicates p values <0.01 (ANOVA, Tukey test): animals that received *N*-ac treatment before DPDS exposure (groups 13–16) were compared with the respective group that received only DPDS treatment in equal dose, which results are indicated in Tables 1–3 (groups 8–11); *N*-ac treated animals without DPDS treatment (group 12) were compared against the negative control group (vehicle; group 1), which is shown in Tables 1–3.

Moreover, under such conditions, tissues and organs of DPDS-treated animals were protected against a decrease in GSH level.

4. Discussion

Selenium compounds are considered “Janus compounds”, i.e., products with a double face, because of their contrasting behavior that is concentration-dependent. At low doses, Se has beneficial effects, whereas high doses are toxic and possibly carcinogenic. The threshold concentration for these opposing activities has not yet been established [35,36]. In this study, a pioneer work with respect to the genotoxic effects of OS in mice, we evaluate levels of DNA damage in organs and tissues of mice treated with DPDS to determine the threshold of dose at which the molecule presents genotoxic effects. We also monitored the role of DPDS induced-GSH depletion and the oxidative stress in the molecular mechanism of the genotoxicity of DPDS.

Our data clearly show that DPDS induces DNA damage in brain, kidney, liver and testes of mice, in a dose-response manner, in a broad dose range from 75 to 200 μ mol/kg. Furthermore, the brain showed the highest level of damage among target organs (Table 1). The present contribution demonstrates that the DPDS treatment at genotoxic doses generates a significant increase in TBARS levels in target organs (Table 2). In agreement with this finding, the treatment decreased markedly the content of intracellular GSH, a main non-enzymatic antioxidant defense, in a dose-dependent manner in these organs [37] (Table 3). Since ROS may cause DNA damage, which could lead to single-strand breaks, base damage and mutation [38,39], DNA damage observed after DPDS exposure could be a result of free radical attack to DNA as a consequence of its known pro-oxidant property in virtue by GSH depletion. Recently we correlated the pro-oxidant property of this molecule with its genotoxic and mutagenic effects in *S. typhimurium*, *S. cerevisiae* and cultured mammalian cells [5,18,19]. Here

we show that systemic injection of DPDS displays genotoxic activity as consequence of its pro-oxidant effect.

If low GSH is involved in the pro-oxidant effect of DPDS, a pre-treatment with compounds that stimulate an increase in cellular GSH may lower or even abolish this effect. *N*-ac is an antioxidant molecule that acts primarily by two mechanisms: (i) it is readily deacetylated in cells to yield L-cysteine, thereby promoting GSH synthesis; (ii) as it is a ROS scavenger, it may react (GSH-like) with various types of ROS, including hydroxyl radicals [40]. Indeed, our results show that *N*-ac pre-treatment completely prevented DPDS-induced oxidative damage (Table 4), thereby maintaining (not decreasing) cellular GSH levels, which is consistent with our previous results obtained with a yeast and in cultured V79 cells [18,19].

Brain is one of the target organs in which DPDS acts on several proteins and induces neurotoxicity [3]. The acute and chronic exposure to DPDS increases the total selenium content in the mice brain, showing that DPDS crosses the blood–brain barrier, due to its high lipophilicity and lack of exclusion by the multi-drug transporter glycoprotein [13,41,42]. The high metabolic activity, high lipidic content and low DNA-repair capacity on the brain could be the reason that the highest level of genotoxicity was observed in this organ [43,44]. These DNA lesions could be involved in DPDS-induced neurotoxicity, as a significative role in the pathogenesis or as consequence of these disturbs.

In this regards, at 200 $\mu\text{mol/kg}$, DPDS is neurotoxic and induces seizures in mice [14]. In accordance to this, it is shown that this treatment increase significantly the DPDS-induced DNA damage in brain, evidenced through the elevation of damage parameters (Table 1). These results indicate that there may a positive relationship between DPDS-induced seizures, increased lipid peroxidation and brain DNA damage. It is known that seizures lead to oxidative DNA damage, which can generates single and double strand breaks [45–47]. Although the pro-oxidant and DNA damaging properties are not considered to be the prime mechanism by which DPDS induces neurotoxicity, they may be an important contributing factor of this effect besides other neurochemical alterations.

DNA damage, mainly oxidative damage, seems to be involved in various neurological disorders, for instance, in the neuronal death following ischemic injuries, prolonged seizures and in neurodegenerative diseases [46,48–53]. Thus, several neurotoxins, as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), methyl mercuric chloride, cadmium, arsenic, manganese and sodium selenite cause indirect DNA damage in neural cells by ROS generation [54–59]. Moreover,

antioxidant molecules are promising neuroprotective agents in various diseases [60,61]. In agreement with this, *N*-ac pre-treatment was able to neutralize the DPDS induced-DNA damage and lipid peroxidation, thus ameliorating the genotoxic effects of DPDS (Table 4).

DPDS induced DNA damage in other vital organs like kidney and liver. Previous reports show that in male Swiss mice, DPDS decreased hepatic glutathione content by 50% at 1 h after administration [62]. Interestingly, although DPDS has clear pro-oxidant and genotoxic activities in liver and kidney (Tables 1 and 2), it is not hepatotoxic or nephrotoxic at this broad dose range in mice when evaluated by enzymatic markers of damage [63].

In mice testes, it was recently reported that DPDS potentiates the oxidative damage caused by sub-chronic administration of cadmium although there are conflicting results indicating that DPDS may protect against cadmium-induced oxidative stress in mice testes [64–67]. Our results support the DPDS-induced oxidative stress theory, explained by GSH depletion in testes, leading to DNA damage and cell injury (Tables 1–3).

DNA damage in the hematopoietic system (spleen, bone marrow and lymphocytes) and in urinary bladder was not observed in this study (Table 1), suggesting that these tissues are not target for DPDS toxicity.

The differences in DNA damage observed among the organs in the present study could be explained by the association of several factors. For example, there is a differential expression of basal levels of DNA-repair genes in various mice tissues using DNA microarrays [68]. Moreover, the variation in constitutive expression of cytochrome P450 across the various organs in mice has been demonstrated, and thus tissues differ considerably in their capacity to biotransform xenobiotics; however in this case, the metabolization does not explain the differences observed, since in previous work the metabolization with S9 mix did not alter the genotoxic profile of DPDS in V79 cells [19,69]. Besides, we cannot exclude the possibility that the differential amounts of GSH and lipids in tissues are the main factors involved in the DPDS toxicity [37,39]. The fact that DPDS induces DNA damage in various organs and tissues of mice bears significance, as this OS exposure can lead to adverse effect on humans via systemic genotoxicity. Differential DNA damage as well as repair in various organs could lead to an increase in the susceptibility towards specific side effects.

In a previous study using V79 cells DPDS at low concentrations was not cytotoxic, genotoxic or mutagenic. On the contrary, it had a protective effect against H_2O_2 oxidative damage in virtue of its antioxidant property

[19]. Similarly, in this work, DPDS was not genotoxic and did not increase lipid peroxidation levels in brain and other organs at doses where it presents anti-inflammatory and antinociceptive [9] or cognitive enhancer characteristics [7]. The antioxidant activity of this OS may contribute for these pharmacological effects, since the presence of excess levels of ROS has been described in nociception and inflammation [70,71].

In summary, DPDS induced DNA damage in brain, liver, kidney and testes in a dose-dependent manner, in a broad dose range at 75–200 $\mu\text{mol/kg}$. Overall, our analysis demonstrated a high correlation among the decreased levels of GSH content, and an increase in lipid peroxidation and DNA damage. These results establish the interrelationship between pro-oxidant and genotoxic effects. This first study of systemic genotoxicity of OS compounds revealed that DPDS causes DNA damage in vital organs like brain, liver, kidney and testes of mice, and that this can be completely neutralized by *N*-ac pre-treatment.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Martin Brendel, Dr. Ray Tice, Dr. Christine Gaylarde for critically reading the manuscript. This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and GENOTOX-Genotoxicity Laboratory-Royal Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. R. M. Rosa held a CAPES doctoral grant.

References

- [1] P. Brenneisen, H. Steinbrenner, H. Sies Selenium, Oxidative stress, and health aspects, *Mol. Aspects Med.* 26 (2005) 256–267.
- [2] M. Soriano-García, Organoselenium compounds as potential therapeutic and chemopreventive agents: a review, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 1657–1669.
- [3] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6255–6285.
- [4] B. Gabryel, A. Malecki, Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors, *Pharmacol. Rep.* 58 (2006) 381–392.
- [5] R.M. Rosa, K. Sulzbacher, J.N. Picada, R. Roesler, J. Saffi, M. Brendel, J.A. Henriques, Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast, *Mutat. Res.* 563 (2004) 107–115.
- [6] T. Posser, M.B. Moretto, A.L. Dafre, M. Farina, J.B. da Rocha, C.W. Nogueira, G. Zeni, S. Ferreira Jdos, R.B. Leal, J.L. Franco, Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation, *Chem. Biol. Interact.* 164 (2006) 126–135.
- [7] R.M. Rosa, D.G. Flores, H.R. Appelt, A.L. Braga, J.A. Henriques, R. Roesler, Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice, *Neurosci. Lett.* 341 (2003) 217–220.
- [8] G. Ghisleni, L.O. Porciuncula, H. Cimarosti, T.R.J. Batista, C.G. Salbego, D.O. Souza, Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoreactivity, *Brain Res.* 986 (2003) 196–199.
- [9] C.W. Nogueira, E.B. Quinhones, E.A. Jung, G. Zeni, J.B. Rocha, Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide, *Inflamm. Res.* 52 (2003) 56–63.
- [10] C. Funchal, M.B. Moretto, L. Vivian, G. Zeni, J.B. Rocha, R. Pessoa-Pureur, Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats, *Toxicology* 222 (2006) 143–153.
- [11] M.E. Burger, R. Fachinotto, C. Wagner, J. Perottoni, R.P. Pereira, G. Zeni, J.B. Rocha, Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats, *Brain Res. Bull.* 70 (2006) 165–170.
- [12] L.P. Borges, V.C. Borges, A.V. Moro, C.W. Nogueira, J.B. Rocha, G. Zeni, Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats, *Toxicology* 210 (2005) 1–8.
- [13] N.B. Barbosa, J.B. Rocha, G. Zeni, T. Emanuelli, M.C. Beque, A.L. Braga, Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149 (1998) 243–253.
- [14] C.W. Nogueira, F.C. Meotti, E. Curte, C. Pilissao, G. Zeni, J.B. Rocha, Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats, *Toxicology* 183 (2003) 29–37.
- [15] V.C. Borges, J.B. Rocha, C.W. Nogueira, Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats, *Toxicology* 215 (2005) 191–197.
- [16] M.B. Moretto, J.I. Rossato, C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B. Rocha, Voltage-dependent ebselen and diorganochalcogenides inhibition of 45Ca^{2+} influx into brain synaptosomes, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17 (2003) 154–160.
- [17] C.W. Nogueira, L.N. Rotta, M.L. Perry, D.O. Souza, J.B. da Rocha, Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo, *Brain Res.* 906 (2001) 157–163.
- [18] R. Moreira Rosa, R.B. de Oliveira, J. Saffi, A.L. Braga, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, J.C. Fonseca Moreira, M. Brendel, J.A. Pegas, Henriques Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions, *Life Sci.* 77 (2005) 2398–2411.
- [19] R.M. Rosa, J.D. Picada, J. Saffi, J.A. Henriques, Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts, *Mutat. Res.* (2006).
- [20] E. Madrigal-Bujaidar, S. Diaz Barriga, M. Cassani, P. Marquez, P. Revuelta, In vivo and in vitro antigenotoxic effect of nordihydroguaiaretic acid against SCEs induced by methyl methanesulfonate, *Mutat. Res.* 419 (1998) 163–168.
- [21] S.I. Franke, D. Pra, J. da Silva, B. Erdtmann, J.A. Henriques, Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO_4 and CuSO_4 in mouse blood cells in vivo, *Mutat. Res.* 583 (2005) 75–84.
- [22] W.F. Salminen Jr., R. Voellmy, S.M. Roberts, Effect of *N*-acetylcysteine on heat shock protein induction by acetaminophen

- in mouse liver, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286 (1998) 519–524.
- [23] C. Zwingmann, M. Bilodeau, Metabolic insights into the hepatoprotective role of *N*-acetylcysteine in mouse liver, *Hepatology* 43 (2006) 454–463.
- [24] A. Boyum, Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages, *Scand. J. Immunol.* (1976) 9–15, Suppl. 5.
- [25] R.R. Tice, M. Furedi-Machacek, D. Satterfield, A. Udumudi, M. Vasquez, J.K. Dunnick, Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene, *Environ. Mol. Mutagen.* 31 (1998) 113–124.
- [26] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [27] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [28] A. Hartmann, G. Speit, The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183–188.
- [29] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.
- [30] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig, D.R. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183–1186.
- [31] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez, A. Hartmann, in: Proceedings of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: Results of the In Vivo Comet Assay Workgroup, vol. 627, *Mutat. Res.* (2007) 31–35.
- [32] H.H. Draper, M. Hadley, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 421–431.
- [33] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [34] T.P. Akerboom, H. Sies, Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples, *Methods Enzymol.* 77 (1981) 373–382.
- [35] G. Bronzetti, C. della Croce, selenium: its important roles in life and contrasting aspects, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 12 (1993) 59–71.
- [36] R.C. von Borstel, J.A. Higgins, Janus carcinogens and mutagens, *Mutat. Res.* 402 (1998) 321–329.
- [37] J.M. Estrela, A. Ortega, E. Obrador, Glutathione in cancer biology and therapy, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 43 (2006) 143–181.
- [38] B. Zegura, T.T. Lah, M. Filipic, The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage, *Toxicology* 200 (2004) 59–68.
- [39] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40.
- [40] Q. Wu, K. Huang, Protective effect of ebselen on cytotoxicity induced by cholestane-3 beta, 5 alpha, 6 beta-triol in ECV-304 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 350–359.
- [41] L.J. Bain, G.A. LeBlanc, Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141 (1996) 288–298.
- [42] E.N. Maciel, E.M. Flores, J.B. Rocha, V. Folmer, Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70 (2003) 470–476.
- [43] A.P. Walker, H.S. Bachelard, Studies on DNA damage and repair in the mammalian brain, *J. Neurochem.* 51 (1988) 1394–1399.
- [44] M.L. Fishel, M.R. Vasko, M.R. Kelley, DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutat. Res.* 614 (2007) 24–36.
- [45] M.M. von Pressentin, K. El-Bayoumy, J.B. Guttenplan, Mutagenic activity of 4-nitroquinoline-*N*-oxide in upper aerodigestive tissue in lacZ mice (MutaMouse) and the effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, *Mutat. Res.* 466 (2000) 71–78.
- [46] M. Patel, Q.Y. Li, L.Y. Chang, J. Crapo, L.P. Liang, Activation of NADPH oxidase and extracellular superoxide production in seizure-induced hippocampal damage, *J. Neurochem.* 92 (2005) 123–131.
- [47] N. Quach, T. Chan, T.A. Lu, S.S. Schreiber, Z. Tan, Induction of DNA repair proteins, Ref-1 and XRCC1, in adult rat brain following kainic acid-induced seizures, *Brain Res.* 1042 (2005) 236–240.
- [48] M. Patel, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 1951–1962.
- [49] F.A. Schanne, A.B. Kane, E.E. Young, J.L. Farber, Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway, *Science* 206 (1979) 700–702.
- [50] F. Facchinetti, V.L. Dawson, T.M. Dawson, Free radicals as mediators of neuronal injury, *Cell. Mol. Neurobiol.* 18 (1998) 667–682.
- [51] K.J. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 205–214.
- [52] Z.Z. Chong, F. Li, K. Maiese, Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49 (2005) 1–21.
- [53] J. Emerit, M. Edeas, F. Bricaire, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Biomed. Pharmacother.* 58 (2004) 39–46.
- [54] L.J. Martin, Z. Liu, DNA damage profiling in motor neurons: a single-cell analysis by comet assay, *Neurochem. Res.* 27 (2002) 1093–1104.
- [55] B.I. Juarez, H. Portillo-Salazar, R. Gonzalez-Amaro, P. Mandeville, J.R. Aguirre, M.E. Jimenez, Participation of *N*-methyl-D-aspartate receptors on methylmercury-induced DNA damage in rat frontal cortex, *Toxicology* 207 (2005) 223–229.
- [56] B.S. Mandavilli, S.F. Ali, B. Van Houten, DNA damage in brain mitochondria caused by aging and MPTP treatment, *Brain. Res.* 885 (2000) 45–52.
- [57] V. Sava, D. Mosquera, S. Song, F. Cardozo-Pelaez, J.R. Sanchez-Ramos, Effects of melanin and manganese on DNA damage and repair in PC12-derived neurons, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 1144–1154.
- [58] F. Piao, N. Ma, Y. Hiraku, M. Murata, S. Oikawa, F. Cheng, L. Zhong, T. Yamauchi, S. Kawanishi, K. Yokoyama, Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels, *J. Occup. Health* 47 (2005) 445–449.
- [59] R. Xiao, J.T. Qiao, H.F. Zhao, J. Liang, H.L. Yu, J. Liu, A.M. Guo, W. Wang, Sodium selenite induces apoptosis in cultured cortical neurons with special concomitant changes in expression of the apoptosis-related genes, *Neurotoxicology* 27 (2006) 478–484.
- [60] M.J. Parnham, E. Graf, Pharmacology of synthetic organic selenium compounds, *Prog. Drug Res.* 36 (1991) 9–47.

- [61] Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, D. Offen, Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier, *Neuropharmacology* 40 (2001) 959–975.
- [62] W.J. Adams Jr., J.J. Kocsis, R. Snyder, Acute toxicity and urinary excretion of diphenyldiselenide, *Toxicol. Lett.* 48 (1989) 301–310.
- [63] F.C. Meotti, V.C. Borges, G. Zeni, J.B. Rocha, C.W. Nogueira, Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice, *Toxicol. Lett.* 143 (2003) 9–16.
- [64] F.W. Santos, D.L. Graca, G. Zeni, J.B. Rocha, S.N. Weis, A.M. Favero, C.W. Nogueira, Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice, *Reprod. Toxicol.* 22 (2006) 546–550.
- [65] F.W. Santos, T. Oro, G. Zeni, J.B. Rocha, P.C. do Nascimento, C.W. Nogueira, Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice, *Toxicol. Lett.* 152 (2004) 255–263.
- [66] F.W. Santos, G. Zeni, J.B. Rocha, P.C. do Nascimento, M.S. Marques, C.W. Nogueira, Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 1723–1730.
- [67] F.W. Santos, G. Zeni, J.B. Rocha, S.N. Weis, J.M. Fachineto, A.M. Favero, C.W. Nogueira, Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues, *Chem. Biol. Interact.* 151 (2005) 159–165.
- [68] L.M. Tomascik-Cheeseman, M.A. Coleman, F. Marchetti, D.O. Nelson, L.M. Kegelmeyer, J. Nath, A.J. Wyrobek, Differential basal expression of genes associated with stress response, damage control, and DNA repair among mouse tissues, *Mutat. Res.* 561 (2004) 1–14.
- [69] D. Choudhary, I. Jansson, J.B. Schenkman, M. Sarfarazi, I. Stoilov, Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues, *Arch. Biochem. Biophys.* 414 (2003) 91–100.
- [70] A. Hacimuftuoglu, C.R. Handy, V.M. Goettl, C.G. Lin, S. Dane, R.L. Stephens Jr., Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice, *Behav. Brain Res.* 173 (2006) 211–216.
- [71] S. Kawanishi, Y. Hiraku, S. Pinlaor, N. Ma, Oxidative and nitrate DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis, *Biol. Chem.* 387 (2006) 365–372.



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O elemento selênio tem sido estudado desde sua descoberta em 1814. Na biologia foi considerado um veneno potencial, um elemento traço essencial para mamíferos, poderoso agente carcinogênico e atualmente um elemento dotado de propriedades anticarcinogênicas. Em aspectos comerciais, os suplementos contendo o elemento são apresentados à população como agentes antioxidantes, embora essas moléculas também possuam uma particular habilidade de disparar ciclos produtores de radicais livres ou depletar defesas antioxidantes em células vivas. Uma vez que esse micronutriente é componente de selenoproteínas com importante função fisiológica e produz metabólitos dotados de atividades biológicas interessantes, na última década, uma série de compostos organoselenados foi sintetizada com fins de encontrar novas substâncias terapêuticas, especialmente moléculas antioxidantes e antitumorais (Flohe *et al.* 2000; Rayman 2005).

O DPDS, estudado nesse trabalho, é um composto organoselenado de natureza simples e quimicamente estável. A necessidade de avaliação toxicológica dessa molécula baseia-se em sua participação como reagente e intermediário em indústria de síntese química (Rosa *et al.* 2004). O DPDS tem sido amplamente estudado com intuito de elucidar seus efeitos tóxicos, ampliar as possibilidades farmacológicas e desenvolvimento de derivados. O capítulo I constitui-se em uma revisão a respeito das atividades biológicas e tóxicas do composto. Nos capítulos subseqüentes, investigou-se os efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da molécula em células de mamíferos em cultura bem como sua genotoxicidade sistêmica em camundongos. Também se analisou os efeitos antioxidante, antigenotóxico e antimutagênico, observados durante a investigação de genotoxicidade, e determinou os mecanismos envolvidos nessas manifestações, tanto benéficas como tóxicas nos modelos empregados. Por fim, novamente no capítulo I, alguns experimentos a respeito da resposta mutagênica dessa substância orgânica contendo selênio na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a avaliação de lesões ao DNA em uma linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano complementam os resultados desse estudo.

A funcionalidade e estabilidade de macromoléculas como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos é influenciada pelo ambiente intracelular e características do líquido extracelular. O controle do estado de oxidação dos grupamentos sulfidríla no ambiente celular é realizado de forma refinada, uma vez que esse parâmetro é um mediador crucial em múltiplos eventos metabólicos, especialmente na sinalização celular,

modificação do DNA e regulação de fatores de transcrição (Liu *et al.* 2005; Moriarty-Craige e Jones 2004). Nesse sentido, as proteínas contendo grupamento tiólicos, na forma de resíduos de cisteína e metionina, são elementos-chave na percepção da alteração do estado de oxidação celular e sua regulação (Holmgren *et al.* 2005). O estado redox celular deve-se principalmente ao balanço entre o número de pares oxidados e reduzidos de três moléculas importantes: GSH/GSSG, NADPH/NADP e NADH/NAD.

O conhecimento da interação entre moléculas dotadas de grupamentos sulfidríla e selênio é antigo; os primeiros ensaios mostraram a reação entre selenito e glutathiona com concomitante produção de ânion superóxido (Spallholz 1994). Alguns anos depois, outros mecanismos moleculares foram descritos, tais como a oxidação de tióis sem geração de espécies radicalares, a depleção de glutathiona por conjugação e os processos de ciclagem redox dos diselenetos (Machida *et al.* 1999; Ramoutar e Brumaghim 2007; Sakurai *et al.* 2006; Sarma e Mugesh 2005; Spallholz 1994; Watson *et al.* 2004; Yang *et al.* 2000b; Zadinski *et al.* 1998). Torna-se evidente, portanto, a alteração da homeostase tiólica e estado redox celular como mecanismo envolvido nos aspectos toxicológicos de compostos contendo selênio. Por conseguinte, a interação entre DPDS e tióis biológicos pode explicar muitos de seus efeitos, como descrito no capítulo I.

A primeira evidência de efeito tóxico do DPDS foi a inibição da enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) em experimentos *in vitro* em vários órgãos de ratos e camundongos. Alguns anos depois, em outros tipos celulares, incluindo eritrócitos humanos, o mesmo efeito foi verificado. Recentemente observou-se que o tratamento com DPDS é capaz de inibir essa enzima em *Drosophila melanogaster* e estima-se que os mecanismos envolvidos sejam os mesmos atuantes em mamíferos (Golombieski *et al.* 2007). Experimentos utilizando glutathiona e outros compostos de baixa massa molecular possuindo grupamentos sulfidríla permitiram relacionar o mecanismo de inibição da atividade enzimática à oxidação dos grupamentos tiólicos. Realmente, os compostos orgânicos contendo selênio possuem uma peculiar afinidade por esses alvos moleculares (Jacob *et al.* 2003; Mugesh *et al.* 2001a). Nessa condição, o acúmulo de ácido aminolevulínico propicia a geração de radicais livres e conduz a célula a um estado de estresse oxidativo. Assim sendo, a primeira parte a compor a explicação da toxicidade do DPDS é oxidação de grupamentos tiólicos e conseqüente inibição da atividade protéica. Além disso, DPDS perturba o funcionamento do canal de cálcio dependente de voltagem em sinaptossomas de ratos, possivelmente interagindo com resíduos de cisteína, os quais são abundantes nessa proteína em razão de função regulatória.

Na verdade, em termos de homeostase tiólica, a glutathiona intracelular é um alvo molecular potencial, embora as conseqüências diretas da ação do DPDS no balanço redox exercido por essa molécula tenham sido pouco estudadas (Adams *et al.* 1989; Moreira Rosa *et al.* 2005). A glutathiona é um tripeptídeo com inúmeras funções intracelulares, sendo o composto tiólico de baixa massa molecular mais abundante em células animais (0,5-10 mmol/L). A maioria da glutathiona está presente no citosol (85-90%) e o conteúdo remanescente é distribuído entre as organelas. Em termos funcionais, primeiramente, glutathiona neutraliza radicais livres e outras espécies reativas de maneira eficaz, diretamente e indiretamente, através de reações enzimáticas, notadamente aquelas catalisadas pela GPx, deidroascorbato redutase e glutathiona-S-transferase. Além disso, reage com vários eletrófilos, como metabólitos fisiológicos (estrógeno, prostaglandinas, melaninas e leucotrienos) e xenobióticos, em uma estratégia de desintoxicação. Entre suas funções também encontram-se um envolvimento na sinalização intracelular mediada por óxido nítrico e na sinalização insulínica; reserva de nitrogênio e enxofre; participação no metabolismo dos eicosanóides, na via do glioxalato, na modificação pós-traducional conhecida como glutathionilação e no controle da proliferação celular (Estrela *et al.* 2006; Penninckx 2002; Valko *et al.* 2004; Wu *et al.* 2004). Desempenhando todas essas funções vitais, é esperado que agentes que causem alteração em seus níveis intracelulares possuam efeitos deletérios para a célula.

No capítulo I está descrita a depleção de glutathiona intracelular em linhagens selvagens e deficientes em defesas antioxidantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A reação entre DPDS e glutathiona reduzida (GSH) não é favorecida, pois o potencial redox da glutathiona é maior que da ponte diseleneto. Dessa maneira, mesmo sem ocorrência do aumento da taxa de oxidação de GSH em função do tratamento com a molécula selenada, o conteúdo total do tripeptídeo reduz. Então, é possível que DPDS realize uma interação com o resíduo tiol nucleofílico da molécula de GSH culminando em uma conjugação, a qual indisponibilizaria ambas estruturas no meio intracelular. Alguns ensaios em sistemas químicos e em levedura reforçam essa possibilidade, agregando um novo processo para a toxicidade dessa intrigante molécula: a depleção de GSH. Enquanto a redução dos níveis de GSH por aumento da taxa de oxidação é um fenômeno passível de regeneração, por meio da ação da enzima glutathiona redutase, a depleção por formação de adutos não pode ser facilmente revertida. Em verdade, o aduto DPDS-GSH deve ser pouco estável e de difícil isolamento e caracterização por procedimentos cromatográficos e espectroscópicos. Talvez por essas razões, embora muitos experimentos tenham sido

realizados com DPDS na última década, até o momento não foi possível descrever quimicamente o mecanismo envolvido na reação e seus intermediários.

A redução da disponibilidade citosólica de GSH predispõe as biomoléculas ao ataque oxidativo de radicais livres produzidos durante o metabolismo normal, como na redução do oxigênio molecular pela ação da NADPH oxidase mitocondrial ou xantina oxidase e reações envolvendo metais, notadamente ferro e cobre, no ambiente intracelular. Os danos causados por essas espécies em nível de material nuclear constituem parte da resposta mutagênica dessa molécula organoselenada em bactérias e leveduras. É importante salientar que GSH é conhecida por proteger os tecidos contra o dano ao DNA induzido por oxidação e intermediários reativos, como alguns carcinógenos, que podem interagir com os ácidos nucléicos (Chung *et al.* 2005; Coles e Ketterer 1990; Higuchi *et al.* 2004).

Nos experimentos apresentados no capítulo I, o tratamento de linhagens mutantes de *S.cerevisiae* deficientes em diversas vias de reparação de DNA, como reparo por excisão de nucleotídeos, reparo sujeito a erros, reparo por excisão de bases e reparo por recombinação homóloga, permitiu identificar a necessidade do sistema de reparo de DNA governado pelo gene *RAD52* para resistência aos efeitos citotóxicos do DPDS. Assim sendo, é possível afirmar que esse composto organoselenado induz quebras na fita de DNA como mecanismo principal de seu efeito genotóxico (Cahill *et al.* 2006; Sung e Klein 2006). Interessantemente, os mutantes defectivos no reparo por excisão de bases, a principal via de remoção de bases oxidadas do genoma, apresentaram altas taxas de mutagênese induzida em resposta ao tratamento com DPDS sem demonstrar sensibilidade ao tratamento (Abdulovic *et al.* 2006). Em função dos achados anteriores, mencionados ao decorrer do artigo de revisão, e dos resultados apresentados, é possível inferir que a maior extensão de lesões genotóxicas induzidas por essa molécula são as quebras simples e duplas na fita de DNA, em razão do ataque oxidativo às cadeias de ácido nucléico. Nessa direção, essas quebras necessitam de reparação recombinacional para a sobrevivência celular e o reparo por excisão de bases torna-se crucial para que a célula prolifere sem acúmulo de mutações após exposição ao composto. É importante mencionar que mutantes deficientes no reparo por excisão de bases com os demais mecanismos de reparação íntegros não são sensíveis a agentes oxidantes, entretanto apresentam um fenótipo mutador em resposta a esses tratamentos (Swanson *et al.* 1999).

Além do dano oxidativo, outro componente minimamente envolvido nos efeitos genotóxicos do DPDS em microrganismos é uma possível ação intercalante de DNA. Esse efeito não é comum entre os compostos organoselenados; mesmo análogos de

psoralenos substituídos com átomo de selênio em local do oxigênio no anel furano perdem totalmente a habilidade de adicionar-se entre as cadeias de DNA quando estimulados por fótons de luz UVA (Vedaldi *et al.* 1995). O único relato disponível até hoje, realizado em sistemas químicos, relata duas moléculas quinolínicas contendo selênio com habilidade de intercalação e ação anticâncer *in vitro* (Gopal e Veeranna 2005).

Em seguimento a esse estudo, no capítulo II realizou-se uma investigação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do DPDS em células V79 em cultura para ampliar os conhecimentos a respeito dos aspectos toxicológicos da molécula.

Os resultados apresentados no capítulo II, em relação à resposta de viabilidade celular após a exposição ao composto, definem uma clara faixa de concentração em que não se observam efeitos citotóxicos. Um dos primeiros desafios na busca de novos efeitos biológicos para moléculas com potencial farmacodinâmico é justamente delinear o intervalo de dose tóxica e a distância, em termos de concentração, para a faixa com possibilidade de ocorrência de atividades farmacológicas interessantes. A única atividade farmacológica investigada na faixa tóxica, ou próxima a ela, é a ação antiproliferativa. No capítulo II, empregou-se quatro abordagens diferentes para determinação da viabilidade celular: (i) o ensaio de redução de um sal de tetrazólio pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria; (ii) o ensaio de captação do corante vermelho neutro, o qual baseia-se na integridade lisossômica; (iii) o ensaio de coloração com azul tripan, avaliando a integridade da membrana celular; (iv) o ensaio de conteúdo de ácidos nucleicos, uma medida da população celular íntegra (Doyle e Griffiths 1999). Além disso, a medida da proliferação celular no ensaio de micronúcleos também é aceita como um bom indicativo de citotoxicidade. Embora o teste empregando a redução dos sais de tetrazólio seja considerado padrão ouro para esse tipo de análise, a possibilidade da interferência de agentes que perturbam o estado redox celular na redução do corante exigiu o controle por meio de outros ensaios. À exceção desse resultado, os demais parâmetros de citotoxicidade exibiram resultados semelhantes, tanto no perfil dose-resposta como tempo-resposta. A redução do sal de tetrazólio empregado é influenciada pelo conteúdo citosólico do par NADPH/NADP; a partir disso, agentes que propiciam um ambiente oxidante intracelular, seja por meio de reação direta ou por causar distúrbios nas defesas antioxidantes, resultarão em uma super-estimativa da sobrevivência celular. Esse resultado torna-se mais um indicativo da influência do DPDS no estado redox celular.

Em células V79 e nas condições experimentais utilizadas, concentrações acima de 50 μM de DPDS são citotóxicas, enquanto a zona de segurança encontra-se abaixo de 12,5 μM . A maior porcentagem de morte acontece nas primeiras três horas de

tratamento. Na faixa citotóxica espera-se encontrar a participação de lesões ao DNA e eventos mutagênicos. Vários compostos contendo selênio são citotóxicos em diversas linhagens celulares (Rayman 2005; Rikiishi 2007). As moléculas organoselenadas estão incluídas no grupo dos compostos de Janus, uma alusão ao deus romano das duas faces-bem e mal- justamente por possuírem efeitos biológicos tão distintos em função de sua concentração ou dose (Combs e Gray 1998).

A indicação de um possível efeito pró-oxidante pelo teste de citotoxicidade, os resultados prévios a respeito da ação desse composto e a delicada relação existente entre selênio e glutathione, guiaram as investigações a respeito do efeito citotóxico na direção de interferência com o estado redox celular controlado por GSH. Nas doses citotóxicas, tanto em estudos concentração- quanto tempo- resposta, DPDS é capaz de diminuir o conteúdo intracelular de GSH sem promover formação de GSSG, reforçando a possibilidade da formação de adutos observada anteriormente. O estudo tempo-dependente indica que em menos de 30 minutos o conteúdo de GSH é intensamente reduzido. Além disso, considerando não existir interferência de DPDS na atividade enzimática da glutathione redutase, se existisse ação em nível de oxidação de GSH, entre 30 minutos e 3 horas existiria tempo suficiente para reciclagem de GSSG em condições de conteúdo normal de NADPH. Assim, a formação de aduto e inativação da molécula de GSH constituem uma explicação fundamentada para o fenômeno. Alguns compostos organoselenados depletam GSH sem aumento de sua taxa de oxidação, como o ebselen nas linhagens celulares de hepatoma humano HepG2 e glioma murino C6, induzindo apoptose por esse mecanismo (Yang *et al.* 2000b). Esse evento está intimamente ligado ao mecanismo desencadeador de morte celular por apoptose pela ativação da via mitocondrial.

O pré-tratamento com N-acetilcisteína, um conhecido precursor da biosíntese de GSH, permite prevenir contra a depleção induzida por DPDS. A N-acetilcisteína é uma molécula antioxidante, rapidamente desacetilada em meio celular, com função de prover cisteína para biosíntese de GSH, e dessa forma, dotada da propriedade de reverter eficientemente as intoxicações com uma série de xenobióticos causadores de distúrbios no equilíbrio redox ou produtores de metabólitos altamente reativos (Blanusa *et al.* 2005; Sheikh-Hamad *et al.* 1997; Zafarullah *et al.* 2003). Deve-se portanto, considerar a utilidade do emprego de N-acetilcisteína em indivíduos intoxicados com essa substância ou com outros compostos selenados que atuem por mecanismos similares. A esse respeito, Jacques-Silva e colaboradores mostraram que a administração de ácido ascórbico é capaz de reverter o estado pró-oxidante induzido pelo DPDS, mas não é capaz de reverter a inibição da enzima ALA-D em camundongos (Jacques-Silva *et al.* 2001).

Um detalhamento a respeito da afirmação: “os radicais livres provenientes do próprio metabolismo lesam macromoléculas de importância para a fisiologia celular” deve ser feito. Primeiramente, os radicais livres realmente lesam diretamente várias moléculas. Além disso, espécies reativas de oxigênio de natureza não radicalar, como o peróxido de hidrogênio, podem participar de reações que acarretam a produção de espécies radicalares com potencial danoso. É preciso ainda considerar a participação da ampla variedade de produtos eletrofilicos provenientes das reações de peroxidação lipídica, os quais podem reagir com proteínas e ácidos nucleicos (Valko *et al.* 2004).

Os ácidos graxos poliinsaturados contêm um ou mais grupos metileno posicionados entre as duplas ligações cis. Esses grupamentos são altamente reativos em relação a agentes oxidantes, atuando como doadores de hidrogênios para radicais centrados em carbono, os quais reagem com o oxigênio formando radicais peroxil, cujo destino pode ser a conversão a hidroperóxidos. Na presença de complexos metálicos e metaloproteínas, ocorre redução dos hidroperóxidos de ácidos graxos produzindo radicais alcóxil, iniciando uma reação em cadeia responsável pela produção de diversos epóxidos, hidroperóxidos e compostos carbonilados, denominada peroxidação lipídica (Valko *et al.* 2004). Um dos principais produtos desse processo é o malondialdeído (MDA), cujas repercussões biológicas são estudadas há muito tempo. Três hipóteses são propostas para a origem desse aldeído: (i) em condições de estresse, essa molécula poderia ser formada durante biosíntese de prostaglandinas e tromboxanas, como um produto de decomposição lipídica; (ii) as sucessivas gerações de hidroperóxidos e clivagem da cadeia de ácido graxo no carbono β poderiam produzir hidroperoxialdeído, e a posterior β -cisão liberaria MDA; (iii) por reação final entre o radical hidroxil e a acroleína (Marnett 1999). Além do MDA, o t-4-hidroxi-2-nonenal, derivado das reações de peroxidação lipídica, também apresenta potencial de lesar o DNA in vivo (Chung *et al.* 2005).

O potencial carcinogênico do MDA é conhecido desde 1972, quando sua administração tópica em camundongos induziu tumores de pele. Uma vez que os resultados desse estudo apresentaram-se um pouco controversos, somente alguns anos depois a evidência de carcinogênese em ratos foi realmente confirmada. Na verdade, MDA é mutagênico no teste Ames por possuir capacidade de formar adutos no DNA em resíduos de guanina e conseqüentemente causar deleções gênicas e mutações de deslocamento de quadro de leitura. As lesões pré-mutagênicas são consistentes estruturalmente com pontes intercadeias formadas por outros agentes e, da mesma forma, são extremamente tóxicas por bloquear a replicação e transcrição. O reparo desses adutos entre DNA e MDA necessita obrigatoriamente de um intermediário com quebra dupla na fita, cuja reparação está canalizada para via de

recombinação homóloga (Del Rio *et al.* 2005; Marnett 1999; Niedernhofer *et al.* 2003; VanderVeen *et al.* 2003). Dessa maneira, a participação do MDA, cuja formação é favorecida pela depleção de GSH, nos efeitos genotóxicos do DPDS auxilia no entendimento dos mecanismos tóxicos envolvidos.

A maioria dos ensaios de determinação de MDA foram desenvolvidos com base na sua derivatização com ácido tiobarbitúrico, em razão da condensação das duas moléculas produzir uma aduto de alta absorvidade molar, permitindo um ensaio espectrofotométrico. Todavia, a especificidade da reação é baixa, uma vez que o ácido tiobarbitúrico pode reagir com vários compostos derivados de oxidação, além do MDA (Dotan *et al.* 2004; Hwang e Kim 2007). Com objetivo de avaliar a situação do estado redox celular após tratamento com DPDS, realizou-se a medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, um marcador polêmico de estresse oxidativo, com objetivo de relacionar a depleção de GSH e o aumento da ocorrência de reações oxidativas endógenas com potencial lesivo, caracterizando o momento pró-oxidante, como mostrado nos resultados do capítulo II.

Naturalmente o estado pró-oxidante atinge o núcleo celular, local onde a quantidade de íons ferro entre as cadeias do DNA favorece a geração de radical hidroxil por meio da reação de Fenton (Valko *et al.* 2004). Utilizando-se o ensaio cometa em condições alcalinas, verificou-se que DPDS é capaz de induzir quebras de cadeias de DNA, notadamente danos das classes III e IV, nas concentrações mais citotóxicas. Considerando-se também a proteção conferida pela N-acetilcisteína em termos de depleção de GSH, é compreensível entender o seu potencial protetor observado contra as lesões ao DNA. O padrão genotóxico do DPDS não altera-se, quali- ou quantitativamente, com uso da mistura S9, uma fração microsomal hepática de ratos. Assim sendo, é possível concluir que a metabolização da molécula organoselenada não a inativa e não produz metabólitos genotóxicos. Os metabólitos do DPDS ainda não conhecidos, mas estima-se que essa substância seja estável do ponto de vista de biotransformação, pois não se conhece enzimas, em mamíferos, que catalisem a transferência do selênio a partir do anel aromático (Ip 1998). O único estudo que lançou alguma luz a esse respeito foi realizado em 1989. No trabalho, em camundongos tratados com DPDS por via intraperitoneal, os metabólitos foram encontrados apenas na urina, correspondendo a uma estrutura originada a partir da fissão da ponte diseleneto e um derivado hidroxilado no anel aromático (Adams *et al.* 1989).

As quebras de cadeia de DNA induzidas por compostos organoselenados em virtude de danos oxidativos constituem um fenômeno bem caracterizado no campo da bioquímica do selênio (Rayman 2005; Rikiishi 2007; Zhou *et al.* 2003). Por exemplo,

em células TM2H e TM12 de tumores mamários de camundongos, selenopropilselenocisteína e ácido metilselenínico produzem sítios álcali-lábeis detectados pelo ensaio cometa (Ip *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2000). Um análogo de cisplatina conjugado com selênio também induz significativas lesões ao DNA, de origem oxidativa, em linfócitos humanos (Blasiak e Kowalik 2001).

O teste de micronúcleos mostra que as lesões geradas pelo DPDS em concentrações citotóxicas em células V79 não são eficientemente reparadas e fixam-se no genoma na forma de quebras cromossômicas, originando os micronúcleos observados.

Interessantemente, no experimento utilizando exposição com peróxido de hidrogênio após o tratamento com DPDS e análise dos níveis de TBARS, observou-se a redução desse parâmetro nas células tratadas até a concentração máxima de 25 μM . Esse efeito protetor indica uma ação antioxidante em baixas concentrações. O efeito, seu mecanismo e utilização foram explorados no capítulo III.

Em um primeiro momento, a investigação das concentrações não citotóxicas do DPDS em células V79 foi conduzida com base em um ensaio mais refinado que os testes de viabilidade celular utilizados no capítulo II. A metodologia de determinação da sobrevivência clonogênica parte do princípio da origem de uma nova progênie celular resultar apenas de uma célula plenamente viável, semelhante aos experimentos de curva de sobrevivência em microrganismos. Enquanto os demais testes de viabilidade avaliam as células em um determinado momento, sem considerar a evolução dos efeitos da droga na população, a sobrevivência clonogênica reflete verdadeiramente a quantidade de células em perfeito estado metabólico (Doyle e Griffiths 1999). Dessa forma, uma população de células V79 foi exposta ao DPDS e uma quantidade de células semeada em novo meio de cultivo de forma a espalharem-se por toda área física disponível no ambiente de cultivo. Após alguns dias, as colônias formadas a partir de células únicas foram determinadas por coloração com cristal violeta. Embora seja mais trabalhoso, esse método permitiu visualizar claramente a faixa de dose certamente não-citotóxica da substância. Nessa faixa, o potencial efeito antioxidante foi investigado.

O pré-tratamento das células com a molécula organoselenada em estudo foi capaz de reduzir os níveis de TBARS após exposição ao agente oxidante peróxido de hidrogênio em maneira dose-resposta, evidenciando claramente uma proteção antioxidante. O peróxido de hidrogênio é um mutágeno clássico, capaz de produzir radical hidroxil e, conseqüentemente, modificar bases e causar quebras na fita de DNA (Slupphaug *et al.* 2003). A sobrevivência da população celular tratada aumentou no mesmo sentido em que as lesões induzidas ao DNA e a taxa de micronúcleos

reduziram. Considerando o envolvimento do estresse oxidativo na mutagênese e carcinogênese, decidiu-se avaliar a repercussão do efeito antioxidante do DPDS na proteção contra os efeitos genotóxicos e mutagênicos de uma série de agentes químicos, tais como o metilmetanosulfonato (MMS), a radiação ultravioleta de comprimento de onda 254 nm (UVC) e psoralenos fotoativados (Nakabeppu *et al.* 2006).

O MMS é um agente alquilante eletrofílico capaz de reagir com uma série de sítios nucleofílicos na molécula de DNA. Em termos de potencial eletrostático negativo, os átomos de nitrogênio da posição 7 da guanina, o oxigênio na posição 6 da guanina e o nitrogênio em posição 3 da adenina representam os sítios preferenciais de metilação, principalmente quando localizados na fenda maior da dupla hélice (Wyatt e Pittman 2006). Estima-se que MMS realize uma substituição nucleofílica bimolecular e diversos mecanismos de reparação estão envolvidos na restauração da integridade da estrutura do DNA e preservação da informação genômica (Kaina *et al.* 2001; Wyatt e Pittman 2006).

Existem evidências mostrando a redução do conteúdo de GSH intracelular como consequência a uma tentativa de impedir a ação do MMS (Tirmenstein *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2001). Nesse sentido, a depleção de GSH conduziria a um estado pró-oxidante e quebras de DNA de procedência ligada a lesões oxidativas. No capítulo III pode-se perceber a neutralização dos efeitos do MMS em células V79, tanto em termos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, em virtude do efeito antioxidante do DPDS nas concentrações empregadas. Existem poucos dados a respeito do efeito modulatório de compostos organoselenados na ação de agentes alquilantes de DNA. O composto em estudo nesse trabalho previne as lesões induzidas por MMS ao DNA, semelhante ao efeito protetor do selenito de sódio em células V79, avaliado pelo teste de aberrações cromossômicas (Bronzetti *et al.* 2003). O composto p-XSC reduziu a metilação ao DNA induzida por uma nitrosamina através do estímulo da síntese de GSH e consequente inativação do agente alquilante (Richie *et al.* 2006).

Os experimentos empregando radiação ultravioleta possibilitam, além do auxílio no entendimento do efeito protetor do DPDS, informação interessante do ponto de vista quimiopreventivo. De fato, a radiação nessa região espectral é responsável por inúmeros efeitos biológicos na pele e a super-exposição a esse agente físico está diretamente correlacionada ao desenvolvimento de queimaduras, hiperpigmentação, edema, hiperplasia, imunossupressão, envelhecimento precoce, fototoxicidade e principalmente câncer de pele. Esses eventos estão associados, ao menos em parte, com a ocorrência de estresse oxidativo (Alonso-Lebrero *et al.* 2003; Fisher *et al.* 1997;

Krause *et al.* 2006; Psotova *et al.* 2006; Wei *et al.* 1997). Nos últimos anos, várias moléculas de origem natural e sintética, com atividade antioxidante e antiinflamatória, foram estudadas com interesse em fotoproteção e quimioprevenção (Afaq e Mukhtar 2006; F'Guyer *et al.* 2003).

A radiação ultravioleta solar pode ser classificada em três tipos em função do comprimento de onda: radiação de curto comprimento de onda - UVC (200-280 nm); médio comprimento - UVB (280-320 nm) e longo - UVA (320-400 nm). A radiação UVC é bloqueada pela camada de ozônio e, portanto, seu papel na patogênese é mínimo. Todavia, em termos práticos, escolheu-se esse comprimento de onda por ser o mais lesivo e bem caracterizado em termos de lesões ao DNA (Chung *et al.* 2001; Pfeifer *et al.* 2005). Na abordagem experimental praticada, a metodologia do ensaio cometa em pesquisa de antioxidantes com ação fotoprotetora é uma ferramenta útil e bem validada na área (Aruoma 1999; Marrot *et al.* 2004).

A radiação UVC pode danificar o DNA diretamente, causando grandes distorções na estrutura da hélice. As lesões mais freqüentes induzidas nessa situação são os dímeros de pirimidina cis-ciclobutano, formados entre as ligações 5 e 6 de quaisquer bases pirimídicas adjacentes; e os fotoprodutos 6-4, caracterizados por uma ligação estável entre as posições 6 e 4 de duas pirimidinas vizinhas; dímeros de purinas e monoadutos de pirimidinas (Nakabeppu *et al.* 2006; Pfeifer *et al.* 2005). Indiretamente, radicais livres e seus produtos de peroxidação são responsáveis pelo ataque oxidativo às cadeias de DNA, embora esse efeito indireto ainda seja um pouco controverso em relação à radiação UVC (Bruge *et al.* 2003; Chung *et al.* 2001; Evans *et al.* 1999; Wei *et al.* 1997). Em nossas condições experimentais, a exposição das células V79 ao agente causou um aumento significativo nos níveis de TBARS, indicando um estado oxidante. De acordo com os resultados anteriores, o efeito antioxidante de DPDS reduz a produção de espécies capazes de reagir com ácido tiobarbitúrico em mesmo sentido em que diminui os danos ao DNA e mutações induzidas pela radiação UVC. Nesse contexto, selenometionina protege contra as lesões induzidas por radiação UVC por influenciar em fenômenos de reparação de DNA por excisão enquanto DPDS impede as quebras de fita derivadas de ataque oxidativo por minimizar a formação de radicais livres, espécies reativas e seus produtos metabólicos endógenos (Rafferty *et al.* 2003a; Rafferty *et al.* 2003b). Assim como DPDS, a molécula organoselenada difenilmetil-selenocianato possui atividades fotoprotetora e quimiopreventiva interessantes (Das *et al.* 2005). Uma estrutura em β -ciclodextrina contendo selênio foi capaz de proteger queratinócitos humanos contra lesões oxidativas induzidas por radiação ultravioleta por meio de seu efeito antioxidante (Mu *et al.* 2003). Por fim, o composto p-XSC reduz a incidência de bases

oxidadas no DNA após tratamento com radiação ultravioleta, porém não é capaz de bloquear o desenvolvimento dos tumores de pele em camundongos, reforçando a necessidade de intervenção em ambos mecanismos genotóxicos dessa radiação (Uddin *et al.* 2005).

Em termos de proteção contra as quebras cromossômicas induzidas pela radiação UVC, a superexpressão de GPx-1 em células de adenocarcinoma de mama e fibroblastos de camundongo em cultura também foi efetiva, produzindo o mesmo efeito que uma suplementação com selenito de sódio a 30 nM. Essa é mais uma evidência da inter-relação entre o potencial antioxidante das moléculas organoselenadas e sua ação antimutagênica e anticarcinogênica, como observado para o DPDS (Baliga *et al.* 2007).

No capítulo III ainda pode-se verificar que o tratamento com DPDS não impediu os danos ao DNA induzidos por psoralenos fotoativados. Os psoralenos são derivados de furocumarinas com capacidade de intercalar-se entre as cadeias do DNA quando ativados com um fóton de radiação UVA, podendo estabelecer mono-adutos e di-adutos com timinas. O 8-metoxipsoraleno é capaz de formar um di-aduto com resíduos de timinas localizados em fitas opostas do DNA, resultando em uma ponte intercadeia muito estável. As conseqüências dos danos dessa classe são deletérias para a célula em termos de toxicidade e mutagênese (Brendel *et al.* 2003). Nesse trabalho, a investigação do efeito preventivo do DPDS na genotoxicidade dos 8-metoxipsoraleno fotoativado foi empregada também como uma abordagem controle, uma vez que essa molécula não induz danos oxidativos ou parece induzi-los em quantidades mínimas (Averbeck e Averbeck 1998). Conforme esperado, o efeito antigenotóxico e antimutagênico do DPDS, fundamentado em sua habilidade antioxidante, não mostrou-se eficaz nessa análise em células V79. Vários agentes indutores de pontes intercadeias são utilizados na terapia antitumoral e os resultados obtidos indicam que DPDS não tem potencial na prevenção dos efeitos genotóxicos e mutagênicos dessas substâncias em células sadias (McHugh *et al.* 2001).

O potencial antimutagênico de alguns compostos organoselenados tem sido estudado, contudo ainda existem poucos trabalhos publicados nessa área para comparar com nossos resultados. Sete derivados selenazolidínicos contendo ácidos carboxílicos reduziram o potencial mutagênico do benzo[a]pireno e laranja de acridina em bactérias (El-Sayed *et al.* 2007). Em células de camundongos tratados com óxido de 4-nitroquinoleína por via oral, pXSC foi capaz de reduzir a taxa de mutagênese em células da língua (Guttenplan *et al.* 2007). As pesquisas sobre antimutagenicidade de compostos organoselenados sintéticos dotados de atividades quimiopreventiva contra vários mutágenos e carcinógenos em modelos animais terão grande mérito por

fornecer as bases para utilização e seleção de compostos para estudos a longo prazo em quimioprevenção *in vivo*. Os resultados a respeito do DPDS em suas concentrações não tóxicas sugerem que esse composto deve ser avaliado quanto a sua toxicidade genética e potencial antimutagênico/anticarcinogênico em estudos com animais.

A determinação da atividade das principais enzimas antioxidantes em função do tratamento com DPDS mostrou que esse composto organoselenado eleva a atividade da GPx em células V79, esclarecendo a razão do efeito antioxidante observado e dos efeitos antígenotóxico e antimutagênico consequentes. DPDS possui atividade mimética de GPx em estudos em sistemas químicos, como mencionado no capítulo I. Em células V79, essa atividade contribui significativamente para o incremento das defesas antioxidantes e prevenção dos danos oxidativos de uma série de agentes. Como discutido no capítulo I, DPDS possui ação antioxidante em diversos modelos animais, mas em células em cultura o mecanismo do efeito está agora esclarecido.

Historicamente, conhece-se a moderada ação GPx-mimética e baixa ação GSH oxidase do DPDS há bastante tempo. Esse efeito serviu como estímulo para a síntese e avaliação de diselenetos aromáticos substituídos (Spector *et al.* 1989). Na presença de um excesso de GSH, em torno de dez vezes, em razão da dificuldade de redução da ponte diseleneto por GSH, a ligação selênio-selênio é reduzida para forma selenol e reage rapidamente com peróxidos à mesma maneira que a GPx (Mugesh *et al.* 2001a; Spector *et al.* 1989). Dessa forma, é compreensível os efeitos antioxidantes de DPDS manifestarem-se apenas em concentrações reduzidas, como observado no capítulo III. Em concentrações maiores, os resultados apontam para a formação de aduto DPDS-GSH como interação mais provável.

Diante disso, uma atenção especial tem sido direcionada para os diselenetos aromáticos e alifáticos capazes mimetizar a atividade da GPx de maneira mais eficiente que outras moléculas (Back e Moussa 2003; De Silva *et al.* 2004). Os diselenetos aromáticos contendo grupamento amino atraíram muito a atenção durante algum tempo pois a interação intramolecular entre selênio e nitrogênio ativa a ligação diseleneto preparando-a para clivagem oxidativa, estabiliza o intermediário ácido selenínico resultante e potencializa o ataque nucleofílico ao enxofre do grupamento tiol (Mugesh *et al.* 2001a). Posteriormente, os diselenetos contendo um átomo de oxigênio na proximidade do átomo de selênio foram descobertos como bons agentes GPx miméticos. Dessa maneira, é surpreendente o fato de DPDS conferir uma considerável proteção antioxidante em células V79 e em animais, como descrito no capítulo I, possuindo uma estrutura molecular tão simples. Alguns derivados bis e triselenetos de

alcenos, uma nova classe de compostos organoselenados, possuem atividade antioxidante e antinociceptiva (Savegnago *et al.* 2006a). Entre as novas moléculas com promissor potencial antioxidante encontram-se complexos derivados do ácido diselenínico em ciclodextrinas, ésteres derivados cíclicos aromáticos do seleninato e do espirodioxiselenourano (Back *et al.* 2005; Kunwar *et al.* 2007; Lv *et al.* 2007).

A primeira idéia a respeito dos efeitos do ebselen também foi a ação GPx mimética, entretanto estudos posteriores mostraram claramente que seus efeitos antioxidantes também deviam-se a outros mecanismos (Sakurai *et al.* 2006). Da mesma forma, outros processos ainda não investigados podem contribuir para a resposta do DPDS em células animais.

Dessa maneira, o emprego *in vivo* de DPDS em uma série de patologias envolvendo a participação de estresse oxidativo é plenamente justificável, contudo recomenda-se cautela em vista da necessidade de determinação de doses não genotóxicas para animais. Em razão da necessidade de avaliação da segurança para o emprego de uma substância com ação farmacodinâmica em animais e do interesse no estudo da toxicidade genética dos compostos organoselenados para escolha, testes e desenvolvimento de novas moléculas quimiopreventivas, no capítulo IV está estudada a genotoxicidade sistêmica do DPDS e os processos envolvidos.

No capítulo IV, camundongos receberam administração intraperitoneal de DPDS em dose única e três horas após, diversos órgãos foram coletados para análise danos ao DNA utilizando o ensaio cometa *in vivo*. Esse experimento visava determinar as doses genotóxicas e não genotóxicas para camundongos bem como estabelecer os órgãos-alvo para toxicidade sistêmica desse composto organoselenado. Os resultados indicam as doses acima de 50 $\mu\text{mol/Kg}$ como genotóxicas. Dessa forma, o emprego de DPDS para avaliação farmacológica em animais deve ser realizado nas doses inferiores a esse valor.

Estudos anteriores comprovaram que a toxicidade de diselenetos depende da via de administração e espécie do animal utilizado (rato ou camundongo), provavelmente como conseqüência de divergências metabólicas e biodisponibilidade (Hucker 1970). Por exemplo, camundongos que receberam DPDS por via subcutânea em doses na faixa 250-1000 $\mu\text{mol/Kg}$ não apresentaram nenhum sinal de toxicidade enquanto por via intraperitoneal, uma dose de 200 $\mu\text{mol/Kg}$ já foi capaz de produzir episódios convulsivos. A toxicidade aguda dessa molécula organoselenada por via intraperitoneal é maior em camundongos que em ratos, provavelmente pela diferença na velocidade de metabolização do seleneto aromático pelos hepatócitos (Jacques-Silva *et al.* 2001; Maciel *et al.* 2000; Nogueira *et al.* 2003). Portanto, os dados de

genotoxicidade obtidos nesse trabalho deverão ser considerados no contexto de ensaios em camundongos por administração em dose única intraperitoneal.

As análises de determinação de níveis de TBARS e GSH nos diversos órgãos estudados relacionam o mecanismo de toxicidade em camundongos à depleção de GSH, encontrado em células V79 e trabalhos anteriores em levedura. Sendo assim, como esperado, se DPDS é capaz de depletar o conteúdo de GSH, o pré-tratamento com N-acetilcisteína deve propiciar o acúmulo do tripeptídeo de maneira a impedir a ação deletéria do composto. Esse resultado foi verificado e novamente indica N-acetilcisteína como tratamento eficaz contra os efeitos tóxicos desse organoselenado.

O cérebro é um órgão alvo para a toxicidade desse diseleneto em razão de fatores como seu alto caráter lipofílico, a falta do sistema de exclusão por transportadores multi-drogas, a elevada atividade metabólica e ainda pela suas reduzidas defesas antioxidantes e mecanismos de reparação de DNA (Barzilai 2007; Fishel *et al.* 2007; Halliwell 2006; Wilson e McNeill 2007). Conforme apresentado, é possível perceber a correlação entre neurotoxicidade, manifestada por episódios convulsivos, e altos índices de lesão ao DNA das células cerebrais na maior dose de DPDS administrada. Dessa forma, o estado pró-oxidante promovido pelo tratamento com essa molécula organoselenada predispõe ao dano oxidativo em diversas biomoléculas, estando ativamente envolvido nos eventos neurotóxicos.

Estudos prévios isentaram DPDS de efeitos tóxicos em fígado e rins, quando avaliados por meio de marcadores bioquímicos de lesão, ou seja, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, uréia e creatinina (Meotti *et al.* 2003). Nesse trabalho, a administração do composto organoselenado aumentou as lesões genotóxicas nesses órgãos nas maiores doses empregadas, em razão de sua habilidade pró-oxidante. De acordo com esses resultados, no trabalho de Adams e colaboradores em 1989, DPDS reduziu o conteúdo de GSH hepática em 50% após 1 hora da administração intraperitoneal (Adams *et al.* 1989).

Em testículos, a administração de DPDS depleta GSH e explica os achados que demonstram a potencialização dos danos oxidativos do cádmio nesse órgão em camundongos tratados com doses sub-crônicas de DPDS (Santos *et al.* 2006). Esse é mais um exemplo da dualidade de efeitos dessa interessante molécula em função de diversos parâmetros, como dose, via e esquema de administração e o modelo experimental utilizado. Santos e colaboradores também encontram um efeito protetor do DPDS em doses menores contra as lesões oxidativas induzidas por cádmio em testículo (Santos *et al.* 2005).

Considerando as diferenças entre acessibilidade, conteúdo lipídico, tiólico e os sistemas de reparação de DNA em cada tecido, não é surpreendente que existam

diferenças no perfil genotóxico do DPDS entre os diversos órgãos avaliados (Tomascik-Cheeseman *et al.* 2004). Embora ensaios de mutagênese, como micronúcleos ou aberrações cromossômicas, não tenham sido ainda realizados em animais expostos ao DPDS, existe uma grande probabilidade dos danos observados pelo ensaio cometa nos órgãos e tecidos de camundongos não serem eficientemente reparados e acumularem-se no genoma na forma de mutações, como verificado em células V79 no capítulo II. Portanto, recomenda-se precaução quanto a administração do composto em camundongos para busca de novas atividades biológicas em doses acima de 50 $\mu\text{mol/Kg}$.

Rojas e colaboradores investigaram os danos ao DNA em camundongos geneticamente modificados com deleção no gene codificador da enzima responsável pela clivagem e liberação de GSH, a γ -glutamil transpeptidase. Utilizando-se o ensaio cometa alcalino, a análise revelou que esses animais, os quais naturalmente possuíam níveis teciduais de GSH reduzidos, apresentaram elevados índices de lesões ao DNA em células de fígado e rins, de maneira similar aos camundongos tratados com DPDS, reforçando nossos resultados e delineamento experimental (Rojas *et al.* 2000).

Em linhagens de células tumorais, o paradoxo do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do selênio e seus derivados também foi amplamente estudado. No capítulo I, está mostrado o primeiro experimento a respeito do efeito do DPDS em uma linhagem tumoral em cultivo. Entre os diversos tipos celulares existentes, as células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 representam uma linhagem bem conhecida e extremamente utilizada em estudos de citotoxicidade. Essas células apresentam elevada instabilidade genômica, contendo múltiplos rearranjos em todos cromossomos, exceto no 4. Além disso, respondem aos efeitos de hormônios, apresentam atividade nula da GPx-1 e são resistentes a diversas drogas anticâncer (Hu e Diamond 2003). O efeito genotóxico do DPDS em células MCF-7 é idêntico àquele verificado em células V79, indicando que os mecanismos operantes na produção das quebras da fita de DNA são semelhantes e possivelmente baseados no efeito pró-oxidante por depleção de glutathiona reduzida. Reforçando essa proposição, o pré-tratamento da linhagem MCF-7, nos mesmos moldes realizados em V79, também potencializou o efeito genotóxico do peróxido de hidrogênio, possivelmente pela perturbação no conteúdo tiólico induzida pela molécula organoselenada. As quebras de DNA induzidas por agentes que propiciam danos oxidativos são um estímulo potente para a indução da morte celular programada, razão pela qual é importante a continuidade dos estudos do efeito do DPDS em células tumorais (Kaina 2003).

O tratamento com selenito de sódio em meio sem soro bovino fetal em concentrações em torno de 1 μ M apresenta efeito citotóxico em células MCF-7, mesmo elevando a atividade da TRx em 39 vezes (Gallegos *et al.* 1997; Watrach *et al.* 1984). De forma similar, DPDS pode possuir um potencial citotóxico interessante nesse tipo celular em função das lesões genotóxicas induzidas. Outro aspecto importante é a relevância dos agentes organoselenados, tais como moléculas que depletam a glutathione intracelular, no uso coadjuvante para redução da resistência a drogas anticâncer (Estrela *et al.* 2006). Exemplificando, o tratamento com elevadas concentrações de selenito de sódio torna as células MCF-7 sensíveis ao efeito citotóxico da doxorubicina (Li *et al.* 2007). Dessa forma, DPDS pode apresentar um importante papel modulatório nas estratégias para diminuir a resistência tumoral.



CONCLUSÃO

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Entre linhagens de *S.cerevisiae* deficientes em diversas vias de reparação de DNA tratadas com DPDS, as células defectivas no reparo recombinacional mostraram-se sensíveis ao composto enquanto as células disruptas em genes de reparo por excisão de bases apresentaram sobrevivência normal mas alta taxa de mutagênese induzida. Dessa forma, a via de reparação necessária para resgatar a sobrevivência após o tratamento com DPDS é o reparo por recombinação homóloga, governado pelo produto do gene *RAD52*, e o reparo por excisão de bases impede que os danos causados nas células sobreviventes produzam mutações. Em conjunto, esses dados informam que a principal lesão induzida pelo composto em estudo são as quebras de fita de DNA em razão de danos oxidativos.
2. Nas células V79, a citotoxicidade do DPDS foi observada em concentrações acima de 50 μM enquanto em concentrações menores que 12,5 μM não observaram-se efeitos tóxicos. Os efeitos tóxicos do DPDS nessas condições devem-se à redução dos níveis intracelulares de GSH sem aumento de taxa de formação de GSSG, ou seja, reforçando os resultados de trabalhos prévios, a depleção de GSH ocorre por formação de adutos. Como consequência, um estado pró-oxidante desenvolve-se, confirmado pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, e as lesões genotóxicas verificadas pelo ensaio cometa refletem as quebras na fita de DNA de origem oxidativa.
3. DPDS nas concentrações citotóxicas foi clastogênico para células V79 como mostrado pelo teste de micronúcleos.
4. O pré-tratamento com N-acetilcisteína aumenta a quantidade de GSH intracelular e assim impede os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do DPDS em células V79.
5. Em concentrações abaixo de 12,5 μM , esse organoselenado comportou-se como antioxidante em células V79, amenizando os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do peróxido de hidrogênio, MMS e radiação UVC.

Essa proteção é conferida pelo reforço na defesa antioxidante, propiciado pela atividade GPx mimética do DPDS nessas condições.

6. Nos experimentos realizados, MMS e radiação UVC induziram claramente o estado de estresse oxidativo, como visualizado pela determinação de TBARS.
7. O tratamento com DPDS não preveniu contra os efeitos genotóxicos do 8-metoxipsoraleno fotoativado, indicando que as características protetoras da molécula organoselenada estão ligadas ao seu efeito antioxidante.
8. Em camundongos, a administração intraperitoneal em dose única de DPDS causou lesões ao DNA em vários órgãos e tecidos nas maiores doses empregadas. Esses danos estão relacionados com a redução do conteúdo tecidual de GSH e conseqüentemente ao estado de estresse oxidativo como observado pela determinação de TBARS.
9. Cérebro, fígado, rins e testículos são órgãos potenciais para a genotoxicidade do DPDS, sendo o cérebro o principal órgão-alvo.
10. O pré-tratamento em dose única via intraperitoneal com N-acetilcisteína previniu contra os efeitos genotóxicos sistêmicos do DPDS em razão da elevação do conteúdo de GSH.
11. O efeito genotóxico do DPDS em células MCF-7 é idêntico àquele verificado em células V79, possivelmente baseado no efeito pró-oxidante por depleção de glutatona reduzida. Reforçando essa proposição, o pré-tratamento com a molécula potencializou o efeito genotóxico do peróxido de hidrogênio.

CONCLUSÃO

Esse trabalho complementou os ensaios anteriores em microrganismos, agregando a informação das quebras duplas na fita de DNA de origem oxidativa como lesão genotóxica majoritária induzida pelo DPDS e a necessidade do reparo recombinacional para manutenção da integridade informacional genômica. Em células V79 em cultura, estabeleceu as concentrações citotóxicas para o composto organoselenado; nas concentrações citotóxicas, DPDS é genotóxico e mutagênico em razão de sua propriedade de depletar GSH intracelular enquanto nas menores concentrações, essa molécula desempenha atividade antioxidante, antigenotóxica e antimutagênica por elevar a atividade da GPx intracelular. Em camundongos, a administração intraperitoneal em dose única foi genotóxica nas maiores doses empregadas em consequência da depleção de GSH, sendo cérebro, fígado, rins e testículos os órgãos afetados. Além disso, esse trabalho mostra a primeira evidência da genotoxicidade da molécula em estudo em células tumorais em cultura, utilizando a linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.



PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Seria de importância para o seguimento do trabalho, complementação dos resultados e progresso do conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares das atividades biológicas de moléculas organoselenadas, em especial o DPDS, as seguintes abordagens experimentais:

1. Realizar um estudo para elucidação do potencial efeito intercalante de cadeia utilizando diferentes metodologias: (i) investigação da intercalação em sistemas químicos com uso de espectroscopia de dicroísmo circular, cinética de renaturação térmica, titulação calorimétrica isotérmica, espectroscopia Raman acoplada a laser e estudos de alteração na viscosidade do DNA; (ii) avaliação da sobrevivência celular e mutagênese em linhagens da levedura *S.cerevisiae* deficientes em topoisomerases; (iii) ensaios de sobrevivência e genotoxicidade em linhagens de fibroblastos humanos contendo mutações em genes de reparo por excisão de nucleotídeos (XPD, TTD e XP/CS); (iv) ensaio in vitro para detecção de inibição de topoisomerase II.
2. Investigar em mamíferos o papel da via de reparo recombinacional de DNA, realizando ensaios de viabilidade, sobrevivência clonogênica e avaliação dos danos oxidativos induzidos pelo DPDS em uma linhagem celular de macrófagos de galinha deficientes em recombinação (DT40), utilizando o ensaio cometa empregando endonucleases de reparação com o objetivo de discriminar e quantificar o dano oxidativo.
3. Realizar testes de mutagênese, pela abordagem de micronúcleos ou aberrações cromossômicas, em camundongos tratados com DPDS em doses genotóxicas por via intraperitoneal.
4. Avaliar a influência das vias de administração e esquema de administração do DPDS em sua genotoxicidade em camundongos; realizar aplicação subcutânea e por via oral; em dose única e fracionada em até 14 dias. Desenvolver um estudo de mutagênese empregando essas condições a longo prazo.
5. Investigar o papel da ação pró-oxidante do DPDS na indução de apoptose em linhagens celulares normais e tumorais (leucemia linfocítica Jurkat-E6;

leucemia promielocítica HL-60; hepatoma humano HepG2; glioma murino C6; adenocarcinoma de mama humano MCF-7; adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 ou HT-29 e especialmente carcinoma de próstata humano DU145, PC3 e LNCaP) pelas seguintes técnicas: (i) análise da fragmentação do DNA internucleossomal por citometria de fluxo; (ii) avaliação das alterações no potencial da membrana mitocondrial com uso de rodamina 123 em citômetro de fluxo; (iii) alterações na morfologia celular por coloração com hematoxilina/eosina em microscópio ótico, brometo de etídio e laranja de acridina ou DAPI em microscópio de fluorescência e microscopia eletrônica; realizar medida da atividade da caspase 3/7; ensaio de anexina-V e outros testes imunohistoquímicos. Para correlação com o efeito pró-oxidante será necessário a determinação do conteúdo de GSH, determinação de TBARS, avaliação do dano oxidativo ao DNA por meio do ensaio cometa modificado ou quantificação de 8-hidroxiguanosina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. Além disso, pode-se utilizar a determinação do nível de espécies reativas de oxigênio por espectrofluorimetria empregando acetato de diclorofluoresceína.

6. Avaliar o efeito protetor do DPDS em camundongos utilizando doses não-genotóxicas e administração de mutágenos diversos, como hidroperóxido de t-butila, MMS, óxido de 4-nitroquinoleína, ciclofosfamida, radiação ultravioleta e dietilnitrosamina. Nesse estudo avaliar lesão genotóxica, parâmetros de mutagênese e exame anátomo-patológico
7. Sintetizar e avaliar biologicamente o efeito de derivados do DPDS, como seleneto de difenila, seleneto de metil-fenila e diseleneto de 3,3'-ditrifluormetil-difenila e outros análogos estruturais, nos mesmos modelos biológicos a fim de estabelecer uma relação estrutura-atividade para essa classe de moléculas.
8. Conduzir um estudo preliminar a respeito do tratamento com DPDS em células normais e células de tumores de próstata, avaliando a expressão das diversas selenoproteínas humanas simultaneamente, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real.
9. Avaliar o efeito modulador do DPDS na sensibilidade de linhagens tumorais resistentes a agentes quimioterápicos por super-expressão de glutathione, a

agentes anticâncer por meio de ensaios de viabilidade celular, sobrevivência clonogênica e análise de interação.

10. Construir uma biblioteca de derivados do DPDS por abordagens de química combinatória com síntese em suporte sólido (acoplado a resina de Wang ou Merrifield) e triagem para moléculas com atividade antiproliferativa em linhagens tumorais, especialmente tumores de próstata.



REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulah R, Miyazaki K, Nakazawa M, Koyama H (2005) Chemical forms of selenium for cancer prevention. *J Trace Elem Med Biol* **19**, 141-150.

Abdulovic A, Kim N, Jinks-Robertson S (2006) Mutagenesis e the three R's in yeast. *DNA Repair (Amst)* **5**, 409-421.

Abul-Hassan KS, Lehnert BE, Guant L, Walmsley R (2004) Abnormal DNA repair in selenium-treated human cells. *Mutat Res* **565**, 45-51.

Adams WJ, Jr., Kocsis JJ, Snyder R (1989) Acute toxicity e urinary excretion of diphenyldiselenide. *Toxicol Lett* **48**, 301-310.

Afaq F, Mukhtar H (2006) Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis e photoaging. *Exp Dermatol* **15**, 678-684.

Ahuja YR, Vijayalakshmi V, Polasa K (2007) Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics. *Toxicology* **231**, 1-10.

Almeida GM, Duarte TL, Steward WP, Jones GD (2006) Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro e in cancer patients using the alkaline comet assay. *DNA Repair (Amst)* **5**, 219-225.

Alonso-Lebrero JL, Dominguez-Jimenez C, Tejedor R, Brieva A, Pivel JP (2003) Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomos* on human skin cells. *J Photochem Photobiol B* **70**, 31-37.

Arner ES, Holmgren A (2006) The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* **16**, 420-426.

Aruoma OI (1999) Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic Res* **30**, 419-427.

Aubrecht J, Narla RK, Ghosh P, Stanek J, Uckun FM (1999) Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. *Toxicol Appl Pharmacol* **154**, 228-235.

Averbeck D, Averbeck S (1998) DNA photodamage, repair, gene induction e genotoxicity following exposures to 254 nm UV e 8-methoxypsoralen plus UVA in a eukaryotic cell system. *Photochem Photobiol* **68**, 289-295.

Aykin-Burns N, Ercal N (2006) Effects of selenocystine on lead-exposed Chinese hamster ovary (CHO) e PC-12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **214**, 136-143.

Back TG, Kuzma D, Parvez M (2005) Aromatic derivatives e tellurium analogues of cyclic seleninate esters e spirodioxyselenuranes that act as glutathione peroxidase mimetics. *J Org Chem* **70**, 9230-9236.

- Back TG, Moussa Z (2003) Diselenides e allyl selenides as glutathione peroxidase mimetics. Remarkable activity of cyclic seleninates produced in situ by the oxidation of allyl omega-hydroxyalkyl selenides. *J Am Chem Soc* **125**, 13455-13460.
- Baliga MS, Wang H, Zhuo P, Schwartz JL, Diamond AM (2007) Selenium e GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. *Biol Trace Elem Res* **115**, 227-242.
- Barbosa NB, Rocha JB, Soares JC, Wondracek DC, Goncalves JF, Schetinger MR, Nogueira CW (2007) Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem Toxicol*.
- Barbosa NB, Rocha JB, Wondracek DC, Perottoni J, Zeni G, Nogueira CW (2006) Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chem Biol Interact* **163**, 230-238.
- Bartek J, Lukas J (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 238-245.
- Barzilai A (2007) The contribution of the DNA damage response to neuronal viability. *Antioxid Redox Signal* **9**, 211-218.
- Baum M, Fauth E, *et al.* (2005) Acrylamide e glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood. *Adv Exp Med Biol* **561**, 77-88.
- Beckett GJ, Arthur JR (2005) Selenium e endocrine systems. *J Endocrinol* **184**, 455-465.
- Behne D, Kyriakopoulos A (2001) Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr* **21**, 453-473.
- Behne D, Kyriakopoulos A, Gessner H, Walzog B, Meinhold H (1992) Type I iodothyronine deiodinase activity after high selenium intake, e relations between selenium e iodine metabolism in rats. *J Nutr* **122**, 1542-1546.
- Birringer M, Pilawa S, Flohe L (2002) Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* **19**, 693-718.
- Blanusa M, Varnai VM, Piasek M, Kostial K (2005) Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic e experimental aspects. *Curr Med Chem* **12**, 2771-2794.
- Blasiak J, Kowalik J (2001) Protective action of vitamin C against DNA damage induced by selenium-cisplatin conjugate. *Acta Biochim Pol* **48**, 233-240.
- Bolognesi C, Buschini A, Branchi E, Carboni P, Furlini M, Martino A, Monteverde M, Poli P, Rossi C (2004) Comet e micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci Total Environ* **333**, 127-136.
- Bolt HM (2003) Genotoxicity--threshold or not? Introduction of cases of industrial chemicals. *Toxicol Lett* **140-141**, 43-51.

- Borges LP, Brandao R, Godoi B, Nogueira CW, Zeni G (2007) Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chem Biol Interact.*
- Bose Girigoswami K, Bhaumik G, Ghosh R (2005) Induced resistance in cells exposed to repeated low doses of H₂O₂ involves enhanced activity of antioxidant enzymes. *Cell Biol Int* **29**, 761-767.
- Bose K, Bhaumik G, Ghosh R (2003) Chronic low dose exposure to hydrogen peroxide changes sensitivity of V79 cells to different damaging agents. *Indian J Exp Biol* **41**, 832-836.
- Bowtell DD (1999) Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet* **21**, 25-32.
- Bradley MO, Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A, Huberman E (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review e analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* **87**, 81-142.
- Brendel M, Bonatto D, Strauss M, Revers LF, Pungartnik C, Saffi J, Henriques JA (2003) Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **544**, 179-193.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G (2005) The in vivo comet assay: use e status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* **20**, 245-254.
- Brito VB, Folmer V, Puntel GO, Fachinetto R, Soares JC, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JB (2006) Diphenyl diselenide e 2,3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure e mortality in mice. *Brain Res Bull* **68**, 414-418.
- Bronzetti G, Cini M, Caltavuturo L, Fiorio R, Croce CD (2003) Antimutagenicity of sodium selenite in Chinese hamster V79 cells exposed to azoxymethane, methylmethansulphonate e hydrogen peroxide. *Mutat Res* **523-524**, 21-31.
- Bruge F, Tiano L, Cacciamani T, Principi F, Littarru GP (2003) Effect of UV-C mediated oxidative stress in leukemia cell lines e its relation to ubiquinone content. *Biofactors* **18**, 51-63.
- Burk RF, Hill KE, Motley AK (2003) Selenoprotein metabolism e function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J Nutr* **133**, 1517S-1520S.
- Burlinson B, Tice RR, *et al.* (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res* **627**, 31-35.
- Cahill D, Connor B, Carney JP (2006) Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Front Biosci* **11**, 1958-1976.
- Campa A, Esposito G, Belli M, Simone G, Tabocchini MA (2004) DNA fragmentation in V79 cells irradiated with light ions as measured by pulsed-field gel electrophoresis. II. Simulation with a generalized broken stick model. *Int J Radiat Biol* **80**, 229-238.
- Chang TC, Huang ML, Hsu WL, Hwang JM, Hsu LY (2003) Synthesis e biological evaluation of ebselen e its acyclic derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **51**, 1413-1416.

- Chen J, Goetchius MP, Combs GF, Jr., Campbell TC (1982) Effects of dietary selenium e vitamin E on covalent binding of aflatoxin to chick liver cell macromolecules. *J Nutr* **112**, 350-355.
- Cheng WH, Kusumoto R, *et al.* (2006) Collaboration of Werner syndrome protein e BRCA1 in cellular responses to DNA interstrand cross-links. *Nucleic Acids Res* **34**, 2751-2760.
- Chigbrow M, Nelson M (2001) Inhibition of mitotic cyclin B e cdc2 kinase activity by selenomethionine in synchronized colon cancer cells. *Anticancer Drugs* **12**, 43-50.
- Chung FL, Komninou D, Zhang L, Nath R, Pan J, Amin S, Richie J (2005) Glutathione depletion enhances the formation of endogenous cyclic DNA adducts derived from t-4-hydroxy-2-nonenal in rat liver. *Chem Res Toxicol* **18**, 24-27.
- Chung WY, Jung YJ, Surh YJ, Lee SS, Park KK (2001) Antioxidative e antitumor promoting effects of [6]-paradol e its homologs. *Mutat Res* **496**, 199-206.
- Chung YW, Kim TS, Lee SY, Lee SH, Choi Y, Kim N, Min BM, Jeong DW, Kim IY (2006) Selenite-induced apoptosis of osteoclasts mediated by the mitochondrial pathway. *Toxicol Lett* **160**, 143-150.
- Clark LC, Dalkin B, *et al.* (1998) Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol* **81**, 730-734.
- Coles B, Ketterer B (1990) The role of glutathione e glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**, 47-70.
- Collins A, Dusinska M, *et al.* (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, e applications. *Environ Mol Mutagen* **30**, 139-146.
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage e repair: principles, applications, e limitations. *Mol Biotechnol* **26**, 249-261.
- Combs GF, Jr., Gray WP (1998) Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* **79**, 179-192.
- Das RK, Hossain SK, Bhattacharya S (2005) Diphenylmethyl selenocyanate inhibits DMBA-croton oil induced two-stage mouse skin carcinogenesis by inducing apoptosis e inhibiting cutaneous cell proliferation. *Cancer Lett* **230**, 90-101.
- de Bem AF, Portella Rde L, Farina M, Perottoni J, Paixao MW, Nogueira CW, Rocha JB (2007) Low toxicity of diphenyl diselenide in rabbits: a long-term study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **101**, 47-55.
- De Silva V, Woznichak MM, Burns KL, Grant KB, May SW (2004) Selenium redox cycling in the protective effects of organoselenides against oxidant-induced DNA damage. *J Am Chem Soc* **126**, 2409-2413.
- Debnath J, Brugge JS (2005) Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* **5**, 675-688.

- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule e biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **15**, 316-328.
- Delanty N, Dichter MA (2000) Antioxidant therapy in neurologic disease. *Arch Neurol* **57**, 1265-1270.
- Deng CZ, Fons MP, Rosenblatt J, El-Zein RA, Abdel-Rahman SZ, Albrecht T (2006) Nickel potentiates the genotoxic effect of benzo[a]pyrene in Chinese hamster lung V79 cells. *Environ Mol Mutagen* **47**, 150-161.
- Deniziak M, Thisse C, Rederstorff M, Hindelang C, Thisse B, Lescure A (2007) Loss of selenoprotein N function causes disruption of muscle architecture in the zebrafish embryo. *Exp Cell Res* **313**, 156-167.
- Dikiy A, Novoselov SV, *et al.* (2007) SelT, SelW, SelH, e Rdx12: Genomics e Molecular Insights into the Functions of Selenoproteins of a Novel Thioredoxin-like Family. *Biochemistry* **46**, 6871-6882.
- Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch LA, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM (2006) Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8179-8184.
- Dong Y, Zhang H, Hawthorn L, Ganther HE, Ip C (2003) Delineation of the molecular basis for selenium-induced growth arrest in human prostate cancer cells by oligonucleotide array. *Cancer Res* **63**, 52-59.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* **43**, 200-227.
- Doyle A, Griffiths JB (1999) 'Cell e Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.' (Wiley: New York).
- Drake EN (2006) Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. *Med Hypotheses* **67**, 318-322.
- Drevet JR (2006) The antioxidant glutathione peroxidase family e spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* **250**, 70-79.
- Duffield-Lillico AJ, Slate EH, *et al.* (2003) Selenium supplementation e secondary prevention of nonmelanoma skin cancer in a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1477-1481.
- Duntas LH (2006) The role of selenium in thyroid autoimmunity e cancer. *Thyroid* **16**, 455-460.
- Eckenroth B, Harris K, Turanov AA, Gladyshev VN, Raines RT, Hondal RJ (2006) Semisynthesis e characterization of mammalian thioredoxin reductase. *Biochemistry* **45**, 5158-5170.
- El-Bayoumy K (2001) The protective role of selenium on genetic damage e on cancer. *Mutat Res* **475**, 123-139.
- el-Bayoumy K, Chae YH, Upadhyaya P, Meschter C, Cohen LA, Reddy BS (1992) Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors e DNA adduct formation

in the mammary glands of female Sprague-Dawley rats by the synthetic organoselenium compound, 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Cancer Res* **52**, 2402-2407.

El-Bayoumy K, Narayanan BA, Desai DH, Narayanan NK, Pittman B, Amin SG, Schwartz J, Nixon DW (2003) Elucidation of molecular targets of mammary cancer chemoprevention in the rat by organoselenium compounds using cDNA microarray. *Carcinogenesis* **24**, 1505-1514.

el-Bayoumy K, Rao CV, Reddy BS (2001) Multiorgan sensitivity to anticarcinogenesis by the organoselenium 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Nutr Cancer* **40**, 18-27.

El-Bayoumy K, Sinha R (2004) Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res* **551**, 181-197.

El-Bayoumy K, Sinha R (2005) Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach. *Mutat Res* **591**, 224-236.

El-Bayoumy K, Sinha R, Pinto JT, Rivlin RS (2006) Cancer chemoprevention by garlic e garlic-containing sulfur e selenium compounds. *J Nutr* **136**, 864S-869S.

el-Bayoumy K, Upadhyaya P, Chae YH, Sohn OS, Rao CV, Fiala E, Reddy BS (1995) Chemoprevention of cancer by organoselenium compounds. *J Cell Biochem Suppl* **22**, 92-100.

El-Sayed WM, Hussin WA, Franklin MR (2007) The antimutagenicity of 2-substituted selenazolidine-4-(R)-carboxylic acids. *Mutat Res* **627**, 136-145.

Estrela JM, Ortega A, Obrador E (2006) Glutathione in cancer biology e therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* **43**, 143-181.

Evans MD, Cooke MS, Podmore ID, Zheng Q, Herbert KE, Lunec J (1999) Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine: implications for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 374-378.

F'Guyer S, Afaq F, Mukhtar H (2003) Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **19**, 56-72.

Favero AM, Weis SN, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW (2006) Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. *Neurotoxicol Teratol* **28**, 607-616.

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* **455**, 81-95.

Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction e cell death. *Mutat Res* **600**, 58-66.

Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* **2**, 1084-1104.

Feng MR (2002) Assessment of blood-brain barrier penetration: in silico, in vitro e in vivo. *Curr Drug Metab* **3**, 647-657.

- Ferguson LR, Bronzetti G, De Flora S (2005) Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation e cancer. *Mutat Res* **591**, 3-7.
- Fischer JL, Lancia JK, Mathur A, Smith ML (2006) Selenium protection from DNA damage involves a Ref1/p53/Brca1 protein complex. *Anticancer Res* **26**, 899-904.
- Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR (2007) DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutat Res* **614**, 24-36.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* **337**, 1419-1428.
- Fleming J, Ghose A, Harrison PR (2001) Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds. *Nutr Cancer* **40**, 42-49.
- Flohe L, Andreesen JR, Brigelius-Flohe R, Maiorino M, Ursini F (2000) Selenium, the element of the moon, in life on earth. *IUBMB Life* **49**, 411-420.
- Franklin MR, Moos PJ, El-Sayed WM, Aboul-Fadl T, Roberts JC (2007) Pre- e post-initiation chemoprevention activity of 2-alkyl/aryl selenazolidine-4(R)-carboxylic acids against tobacco-derived nitrosamine (NNK)-induced lung tumors in the A/J mouse. *Chem Biol Interact*.
- Gallegos A, Berggren M, Gasdaska JR, Powis G (1997) Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Res* **57**, 4965-4970.
- Ganther H, Lawrence R (1997) Chemical transformations of selenium in living organisms. Improved forms of selenium for cancer prevention. *Tetrahedron* **53**, 12299-12310.
- Ganther HE (1968) Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry* **7**, 2898-2905.
- Ganther HE (1999) Selenium metabolism, selenoproteins e mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-1666.
- Garcia O, Romero I, Gonzalez JE, Mandina T (2007) Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutat Res* **627**, 186-190.
- Golombieski RM, Graichen DA, Pivetta LA, Nogueira CW, Loreto EL, Rocha JB (2007) Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] inhibits *Drosophila melanogaster* delta-aminolevulinatase dehydratase (delta-ALA-D) gene transcription e enzyme activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*.
- Gopal M, Veeranna S (2005) 4-Anilinopyrimido[4',5':4,5]selenolo(2,3-b)quinoline e 4-piperazino pyrimido[4',5':4,5]selenolo(2,3-b)quinoline: new DNA intercalating chromophores with antiproliferative activity. *J Photochem Photobiol B* **81**, 181-189.
- Gromer S, Gross JH (2002) Methylseleninate is a substrate rather than an inhibitor of mammalian thioredoxin reductase. Implications for the antitumor effects of selenium. *J Biol Chem* **277**, 9701-9706.

- Gromer S, Urig S, Becker K (2004) The thioredoxin system--from science to clinic. *Med Res Rev* **24**, 40-89.
- Grosicka E, Sadurska B, Szumilo M, Grzela T, Lazarczyk P, Niderla-Bielinska J, Rahden-Staron I (2005) Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in Chinese hamster fibroblasts. *Int Immunopharmacol* **5**, 1945-1956.
- Gu ZW, Keane MJ, Ong TM, Wallace WE (2005) Diesel exhaust particulate matter dispersed in a phospholipid surfactant induces chromosomal aberrations e micronuclei but not 6-thioguanine-resistant gene mutation in V79 cells. *J Toxicol Environ Health A* **68**, 431-444.
- Guecheva T, Henriques JA, Erdtmann B (2001) Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat Res* **497**, 19-27.
- Guttenplan J, Chen KM, et al. (2007) Effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate on mutagenesis e p53 protein expression in the tongue of lacl rats treated with 4-nitroquinoline-N-oxide. *Mutat Res*.
- Halliwell B (2006) Oxidative stress e neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**, 1634-1658.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hartmann A, Elhajouji A, Kiskinis E, Poetter F, Martus H, Fjallman A, Frieauff W, Suter W (2001) Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol* **39**, 843-858.
- Hartwig A, Blessing H, Schwerdtle T, Walter I (2003) Modulation of DNA repair processes by arsenic e selenium compounds. *Toxicology* **193**, 161-169.
- Helgason C, Miller C (2004) 'Basic Cell Culture Protocols.' (Humana Press: Totowa).
- Higuchi Y, McTiernan CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO, Feldman AM (2004) Tumor necrosis factor receptors 1 e 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, e remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor-alpha-induced cardiomyopathy. *Circulation* **109**, 1892-1897.
- Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Burk RF (2004) Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene. *J Nutr* **134**, 157-161.
- Hoang BX, Levine SA, Pham P, Shaw DG (2007) Hypothesis of the cause e development of neoplasms. *Eur J Cancer Prev* **16**, 55-61.
- Hoffmann PR, Hoge SC, Li PA, Hoffmann FW, Hashimoto AC, Berry MJ (2007) The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic Acids Res*.
- Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lonn ME, Hudemann C, Lillig CH (2005) Thiol redox control via thioredoxin e glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans* **33**, 1375-1377.
- Hoque A, Albanes D, et al. (2001) Molecular epidemiologic studies within the Selenium e Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Cancer Causes Control* **12**, 627-633.

- Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ (2006) A concise review of DNA damage checkpoints e repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med* **7**, 165-172.
- Hu H, Jiang C, Ip C, Rustum YM, Lu J (2005a) Methylseleninic acid potentiates apoptosis induced by chemotherapeutic drugs in androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* **11**, 2379-2388.
- Hu ML, Spallholz JE (1983) In vitro hemolysis of rat erythrocytes by selenium compounds. *Biochem Pharmacol* **32**, 957-961.
- Hu Y, Benya RV, Carroll RE, Diamond AM (2005b) Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. *J Nutr* **135**, 3021S-3024S.
- Hu Y, Kabler SL, Tennant AH, Townsend AJ, Kligerman AD (2006) Induction of DNA-protein crosslinks by dichloromethane in a V79 cell line transfected with the murine glutathione-S-transferase theta 1 gene. *Mutat Res* **607**, 231-239.
- Hu YJ, Diamond AM (2003) Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity e allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* **63**, 3347-3351.
- Hucker HB (1970) Species differences in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol* **10**, 99-118.
- Hwang ES, Kim GH (2007) Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, e proteins in vitro e in vivo cancer research. *Toxicology* **229**, 1-10.
- Imai H, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM (2003) Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* **34**, 56-63.
- Ip C (1998) Lessons from basic research in selenium e cancer prevention. *J Nutr* **128**, 1845-1854.
- Ip C, Thompson HJ, Zhu Z, Ganther HE (2000) In vitro e in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer Res* **60**, 2882-2886.
- Iwakawa M, Goto M, *et al.* (2005) DNA repair capacity measured by high throughput alkaline comet assays in EBV-transformed cell lines e peripheral blood cells from cancer patients e healthy volunteers. *Mutat Res* **588**, 1-6.
- Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H (2003) Sulfur e selenium: the role of oxidation state in protein structure e function. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 4742-4758.
- Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB (2001) Diphenyl diselenide e ascorbic acid changes deposition of selenium e ascorbic acid in liver e brain of mice. *Pharmacol Toxicol* **88**, 119-125.
- Jagetia A, Jagetia GC, Jha S (2007) Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity e decline in survival. *J Appl Toxicol* **27**, 122-132.

- Jeggo PA, Lobrich M (2006) Contribution of DNA repair e cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst)* **5**, 1192-1198.
- Jeong D, Kim TS, Chung YW, Lee BJ, Kim IY (2002) Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. *FEBS Lett* **517**, 225-228.
- Jiang C, Jiang W, Ip C, Ganther H, Lu J (1999) Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. *Mol Carcinog* **26**, 213-225.
- Jiang C, Wang Z, Ganther H, Lu J (2001) Caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (anoikis) of DU-145 prostate cancer cells. *Cancer Res* **61**, 3062-3070.
- Juchimiuk J, Gnys A, Maluszynska J (2006) DNA damage induced by mutagens in plant e human cell nuclei in acellular comet assay. *Folia Histochem Cytobiol* **44**, 127-131.
- Kaina B (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation e signaling. *Biochem Pharmacol* **66**, 1547-1554.
- Kaina B, Ochs K, Grosch S, Fritz G, Lips J, Tomicic M, Dunkern T, Christmann M (2001) BER, MGMT, e MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity e apoptosis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**, 41-54.
- Kalweit S, Utesch D, von der Hude W, Madle S (1999) Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutat Res* **439**, 183-190.
- Kang KA, Bu HD, Park DS, Go GM, Jee Y, Shin T, Hyun JW (2005) Antioxidant activity of ethanol extract of *Callophyllis japonica*. *Phytother Res* **19**, 506-510.
- Karp DD (2005) ECOG 5597: Phase III Chemoprevention Trial of Selenium Supplementation in Persons With Resected Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* **3**, 313-315.
- Karpinets TV, Foy BD (2005) Tumorigenesis: the adaptation of mammalian cells to sustained stress environment by epigenetic alterations e succeeding matched mutations. *Carcinogenesis* **26**, 1323-1334.
- Kil J, Pierce C, Tran H, Gu R, Lynch ED (2007) Ebselen treatment reduces noise induced hearing loss via the mimicry e induction of glutathione peroxidase. *Hear Res* **226**, 44-51.
- Kim KT, Yoo KM, Lee JW, Eom SH, Hwang IK, Lee CY (2007) Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J Ethnopharmacol* **111**, 443-450.
- Kim TS, Yun BY, Kim IY (2003) Induction of the mitochondrial permeability transition by selenium compounds mediated by oxidation of the protein thiol groups e generation of the superoxide. *Biochem Pharmacol* **66**, 2301-2311.
- Kim YJ, Chai YG, Ryu JC (2005) Selenoprotein W as molecular target of methylmercury in human neuronal cells is down-regulated by GSH depletion. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 1095-1102.

- Klein EA, Thompson IM, Lippman SM, Goodman PJ, Albanes D, Taylor PR, Coltman C (2000) SELECT: the Selenium e Vitamin E Cancer Prevention Trial: rationale e design. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **3**, 145-151.
- Kohrle J (1999) The trace element selenium e the thyroid gland. *Biochimie* **81**, 527-533.
- Krause R, Matulla-Nolte B, Essers M, Brown A, Hopfenmuller W (2006) UV radiation e cancer prevention: what is the evidence? *Anticancer Res* **26**, 2723-2727.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **300**, 1439-1443.
- Kuehnelt D, Juresa D, Francesconi KA, Fakhri M, Reid ME (2007) Selenium metabolites in urine of cancer patients receiving L-selenomethionine at high doses. *Toxicol Appl Pharmacol* **220**, 211-215.
- Kumar S, Johansson H, Engman L, Valgimigli L, Amorati R, Fumo MG, Pedulli GF (2007) Regenerable chain-breaking 2,3-dihydrobenzo[b]selenophene-5-ol antioxidants. *J Org Chem* **72**, 2583-2595.
- Kunwar A, Mishra B, Barik A, Kumbhare LB, Pandey R, Jain VK, Priyadarsini KI (2007) 3,3'-Diselenodipropionic Acid, an Efficient Peroxyl Radical Scavenger e a GPx Mimic, Protects Erythrocytes (RBCs) from AAPH-Induced Hemolysis. *Chem Res Toxicol* **20**, 1482-1487.
- Labunskyy VM, Ferguson AD, Fomenko DE, Chelliah Y, Hatfield DL, Gladyshev VN (2005) A novel cysteine-rich domain of Sep15 mediates the interaction with UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J Biol Chem* **280**, 37839-37845.
- Lan L, Zhao F, Wang Y, Zeng H (2007) The mechanism of apoptosis induced by a novel thioredoxin reductase inhibitor in A549 cells: possible involvement of nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Eur J Pharmacol* **555**, 83-92.
- Lawson T (1989) Nicotinamide e selenium stimulate the repair of DNA damage produced by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine. *Anticancer Res* **9**, 483-486.
- Lawson T, Birt DF (1983) Enhancement of the repair of carcinogen-induced DNA damage in the hamster pancreas by dietary selenium. *Chem Biol Interact* **45**, 95-104.
- Le Ferrec E, Chesne C, *et al.* (2001) In vitro models of the intestinal barrier. The report e recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim* **29**, 649-668.
- Lee RF, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine e freshwater) animals. *Mutat Res* **544**, 43-64.
- Leonetti C, Zupi G (2007) Targeting different signaling pathways with antisense oligonucleotides combination for cancer therapy. *Curr Pharm Des* **13**, 463-470.
- Letavayova L, Vlckova V, Brozmanova J (2006) Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology* **227**, 1-14.

- Levander OA, Morris VC, Higgs DJ (1973) Selenium as a catalyst for the reduction of cytochrome c by glutathione. *Biochemistry* **12**, 4591-4595.
- Levander OA, Morris VC, Higgs DJ (1974) Selenium catalysis of swelling of rat liver mitochondria e reduction of cytochrome c by sulfur compounds. *Adv Exp Med Biol* **48**, 405-423.
- Li S, Zhou Y, Wang R, Zhang H, Dong Y, Ip C (2007) Selenium sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis through modulation of phospho-Akt e its downstream substrates. *Mol Cancer Ther* **6**, 1031-1038.
- Liu H, Colavitti R, Rovira, II, Finkel T (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* **97**, 967-974.
- Loflin J, Lopez N, Whanger PD, Kiousi C (2006) Selenoprotein W during development e oxidative stress. *J Inorg Biochem* **100**, 1679-1684.
- Longtin R (2003) Selenium for prevention: eating your way to better DNA repair? *J Natl Cancer Inst* **95**, 98-100.
- Luch A (2005) Nature e nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **5**, 113-125.
- Luchese C, Brandao R, de Oliveira R, Nogueira CW, Santos FW (2007a) Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral e pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol Lett*.
- Luchese C, Stangherlin EC, Ardais AP, Nogueira CW, Santos FW (2007b) Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. *Toxicology* **230**, 189-196.
- Lv SW, Wang XG, Mu Y, Zang TZ, Ji YT, Liu JQ, Shen JC, Luo GM (2007) A novel dicyclodextrinyl diselenide compound with glutathione peroxidase activity. *Febs J* **274**, 3846-3854.
- Machida K, Tanaka T, Taniguchi M (1999) Depletion of glutathione as a cause of the promotive effects of polygodial, a sesquiterpene on the production of reactive oxygen species in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **88**, 526-530.
- Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JB (2000) Diphenyl diselenide e diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, e brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* **14**, 310-319.
- Mark SD, Qiao YL, *et al.* (2000) Prospective study of serum selenium levels e incident esophageal e gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1753-1763.
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* **424**, 83-95.
- Marnett LJ, Plastaras JP (2001) Endogenous DNA damage e mutation. *Trends Genet* **17**, 214-221.
- Marrot L, Belaidi JP, Lejeune F, Meunier JR, Asselineau D, Bernerd F (2004) Photostability of sunscreen products influences the efficiency of protection with regard

- to UV-induced genotoxic or photoageing-related endpoints. *Br J Dermatol* **151**, 1234-1244.
- McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA (2001) Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms e clinical relevance. *Lancet Oncol* **2**, 483-490.
- McKenzie RC, Arthur JR, Beckett GJ (2002) Selenium e the regulation of cell signaling, growth, e survival: molecular e mechanistic aspects. *Antioxid Redox Signal* **4**, 339-351.
- Meotti FC, Borges VC, Perottoni J, Nogueira CW (2007) Toxicological evaluation of subchronic exposure to diphenyl diselenide in rats. *J Appl Toxicol*.
- Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW (2003) Potential renal e hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride e Ebselen for rats e mice. *Toxicol Lett* **143**, 9-16.
- Metanis N, Keinan E, Dawson PE (2006) Synthetic seleno-glutaredoxin 3 analogues are highly reducing oxidoreductases with enhanced catalytic efficiency. *J Am Chem Soc* **128**, 16684-16691.
- Meuillet E, Stratton S, Prasad Cherukuri D, Goulet AC, Kagey J, Porterfield B, Nelson MA (2004) Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials e preclinical findings. *J Cell Biochem* **91**, 443-458.
- Miyagoshi M, Fujikawa-Yamamoto K (2006) The reversion to diploid cells from established triploid V79 cells. *Cell Prolif* **39**, 421-428.
- Moreira Rosa R, de Oliveira RB, Saffi J, Braga AL, Roesler R, Dal-Pizzol F, Fonseca Moreira JC, Brendel M, Pegas Henriques JA (2005) Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sci* **77**, 2398-2411.
- Moriarty-Craige SE, Jones DP (2004) Extracellular thiols e thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* **24**, 481-509.
- Mu Y, Lv S, Ren X, Jin G, Liu J, Yan G, Li W, Shen J, Luo G (2003) UV-B induced keratinocyte apoptosis is blocked by 2-selenium-bridged beta-cyclodextrin, a GPX mimic. *J Photochem Photobiol B* **69**, 7-12.
- Mueller-Klieser W (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* **273**, C1109-1123.
- Mugesh G, du Mont WW, Sies H (2001a) Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev* **101**, 2125-2179.
- Mugesh G, Klotz LO, du Mont WW, Becker K, Sies H (2003) Selenenyl iodide: a new substrate for mammalian thioredoxin reductase. *Org Biomol Chem* **1**, 2848-2852.
- Mugesh G, Panda A, Singh HB, Puneekar NS, Butcher RJ (2001b) Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study. *J Am Chem Soc* **123**, 839-850.
- Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, Tsuchimoto D, Tsuzuki T, Nakatsu Y (2006) Mutagenesis e carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem* **387**, 373-379.

- Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* **278**, 31426-31433.
- Nilsson G, Sun X, Nystrom C, Rundlof AK, Potamitou Fernandes A, Bjornstedt M, Dobra K (2006) Selenite induces apoptosis in sarcomatoid malignant mesothelioma cells through oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **41**, 874-885.
- Nogueira CW, Meotti FC, Curte E, Pilissao C, Zeni G, Rocha JB (2003) Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice e rats. *Toxicology* **183**, 29-37.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2004) Organoselenium e organotellurium compounds: toxicology e pharmacology. *Chem Rev* **104**, 6255-6285.
- Novoselov SV, Kryukov GV, Xu XM, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J Biol Chem* **282**, 11960-11968.
- O'Brien LE, Zegers MM, Mostov KE (2002) Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 531-537.
- Ochi T, Suzuki T, Isono H, Kaise T (2004) In vitro cytotoxic e genotoxic effects of diphenylarsinic acid, a degradation product of chemical warfare agents. *Toxicol Appl Pharmacol* **200**, 64-72.
- Oda T (2006) Effects of 2'-demethoxy-2'-propoxygriseofulvin on microtubule distribution in Chinese hamster V79 cells. *J Antibiot (Tokyo)* **59**, 114-116.
- Olive PL, Banath JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* **1**, 23-29.
- Osada Y, Kumagai T, Masuda K, Suzuki T, Kanazawa T (2005) Mutagenicity evaluation of Schistosoma spp. extracts by the umu-test e V79/HGPRT gene mutation assay. *Parasitol Int* **54**, 29-34.
- Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**, 291-298.
- Pages V, Fuchs RP (2002) How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* **21**, 8957-8966.
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, e their role in human health. *Antioxid Redox Signal* **9**, 775-806.
- Park YJ, Koketsu M, Kim JM, Yeo JH, Ishihara H, Lee KG, Kim SY, Kim CK (2003) 1,3-selenazol-4-one derivatives inhibit inducible nitric oxide-mediated nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced BV-2 cells. *Biol Pharm Bull* **26**, 1657-1660.
- Parnham M, Sies H (2000) Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 607-619.
- Parnham MJ, Graf E (1991) Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog Drug Res* **36**, 9-47.

Pathak R, Dey SK, Sarma A, Khuda-Bukhsh AR (2007) Genotoxic effects in M5 cells e Chinese hamster V79 cells after exposure to 7Li-beam (LET=60 keV/microm) e correlation of their survival dynamics to nuclear damages e cell death. *Mutat Res* **628**, 56-66.

Penninckx MJ (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res* **2**, 295-305.

Perottoni J, Rodrigues OE, Paixao MW, Zeni G, Lobato LP, Braga AL, Rocha JB, Emanuelli T (2004) Renal e hepatic ALA-D activity e selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury e organoselenium compounds. *Food Chem Toxicol* **42**, 17-28.

Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* **571**, 19-31.

Plazar J, Hreljac I, Pirih P, Filipic M, Groothuis GM (2007) Detection of xenobiotic-induced DNA damage by the comet assay applied to human e rat precision-cut liver slices. *Toxicol In Vitro*.

Powis G, Kirkpatrick DL, Angulo M, Baker A (1998) Thioredoxin redox control of cell growth e death e the effects of inhibitors. *Chem Biol Interact* **111-112**, 23-34.

Prigol M, Wilhelm EA, Schneider CC, Rocha JB, Nogueira CW, Zeni G (2007) Involvement of oxidative stress in seizures induced by diphenyl diselenide in rat pups. *Brain Res* **1147**, 226-232.

Psotova J, Svobodova A, Kolarova H, Walterova D (2006) Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* e rosmarinic acid on human keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* **84**, 167-174.

Puntel RL, Roos DH, Paixao MW, Braga AL, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JB (2007) Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver e kidney: effect of diphenyl diselenide e diphenyl ditelluride. *Chem Biol Interact* **165**, 87-98.

Rafferty TS, Beckett GJ, Walker C, Bisset YC, McKenzie RC (2003a) Selenium protects primary human keratinocytes from apoptosis induced by exposure to ultraviolet radiation. *Clin Exp Dermatol* **28**, 294-300.

Rafferty TS, Green MH, Lowe JE, Arlett C, Hunter JA, Beckett GJ, McKenzie RC (2003b) Effects of selenium compounds on induction of DNA damage by broadband ultraviolet radiation in human keratinocytes. *Br J Dermatol* **148**, 1001-1009.

Ramoutar RR, Brumaghim JL (2007) Effects of inorganic selenium compounds on oxidative DNA damage. *J Inorg Biochem* **101**, 1028-1035.

Rao BS, Shanbhoge R, Upadhya D, Jagetia GC, Adiga SK, Kumar P, Guruprasad K, Gayathri P (2006) Antioxidant, anticlastogenic e radioprotective effect of *Coleus aromaticus* on Chinese hamster fibroblast cells (V79) exposed to gamma radiation. *Mutagenesis* **21**, 237-242.

Rao CV, Cooma I, Rodriguez JG, Simi B, El-Bayoumy K, Reddy BS (2000) Chemoprevention of familial adenomatous polyposis development in the APC(min)

mouse model by 1,4-phenylene bis(methylene)selenocyanate. *Carcinogenesis* **21**, 617-621.

Rao CV, Wang CQ, Simi B, Rodriguez JG, Cooma I, El-Bayoumy K, Reddy BS (2001) Chemoprevention of colon cancer by a glutathione conjugate of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, a novel organoselenium compound with low toxicity. *Cancer Res* **61**, 3647-3652.

Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**, 233-241.

Rayman MP (2005) Selenium in cancer prevention: a review of the evidence e mechanism of action. *Proc Nutr Soc* **64**, 527-542.

Redman C, Scott JA, Baines AT, Basye JL, Clark LC, Calley C, Roe D, Payne CM, Nelson MA (1998) Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer Lett* **125**, 103-110.

Redman C, Xu MJ, Peng YM, Scott JA, Payne C, Clark LC, Nelson MA (1997) Involvement of polyamines in selenomethionine induced apoptosis e mitotic alterations in human tumor cells. *Carcinogenesis* **18**, 1195-1202.

Reilly C (1998) Selenium: a new entrant into the functional food arena. *Food science e technology* **9**, 114-118.

Ren X, Yang L, *et al.* (2001) A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity. *Arch Biochem Biophys* **387**, 250-256.

Richie JP, Jr., Kleinman W, Desai DH, Das A, Amin SG, Pinto JT, El-Bayoumy K (2006) The organoselenium compound 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate inhibits 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced tumorigenesis e enhances glutathione-related antioxidant levels in A/J mouse lung. *Chem Biol Interact* **161**, 93-103.

Rikiishi H (2007) Apoptotic cellular events for selenium compounds involved in cancer prevention. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 91-98.

Rojas E, Valverde M, Kala SV, Kala G, Lieberman MW (2000) Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in gamma-glutamyltranspeptidase. *Mutat Res* **447**, 305-316.

Roos WP, Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**, 440-450.

Rosa RM, Sulzbacher K, Picada JN, Roesler R, Saffi J, Brendel M, Henriques JA (2004) Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria e yeast. *Mutat Res* **563**, 107-115.

Russell GR, Nader CJ, Partick EJ (1980) Induction of DNA repair by some selenium compounds. *Cancer Lett* **10**, 75-81.

Saito I, Asano T, Sano K, Takakura K, Abe H, Yoshimoto T, Kikuchi H, Ohta T, Ishibashi S (1998) Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **42**, 269-277; discussion 277-268.

Saito Y, Takahashi K (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur J Biochem* **269**, 5746-5751.

Sakai A, Iwase Y, Nakamura Y, Sasaki K, Tanaka N, Umeda M (2002) Use of a cell transformation assay with established cell lines, e a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumour promoters: a review. *Altern Lab Anim* **30**, 33-59.

Sakurai T, Kanayama M, Shibata T, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, Uchida K (2006) Ebselen, a seleno-organic antioxidant, as an electrophile. *Chem Res Toxicol* **19**, 1196-1204.

Sambruy Y, Ferruzza S, Ranaldi G, De Angelis I (2001) Intestinal cell culture models: applications in toxicology e pharmacology. *Cell Biol Toxicol* **17**, 301-317.

Sanderson JT, Aarts JM, Brouwer A, Froese KL, Denison MS, Giesy JP (1996) Comparison of Ah receptor-mediated luciferase e ethoxyresorufin-O-deethylase induction in H4IIE cells: implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* **137**, 316-325.

Santos FW, Graca DL, Zeni G, Rocha JB, Weis SN, Favero AM, Nogueira CW (2006) Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. *Reprod Toxicol* **22**, 546-550.

Santos FW, Zeni G, Rocha JB, Weis SN, Fachinetto JM, Favero AM, Nogueira CW (2005) Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact* **151**, 159-165.

Sarma BK, Mugesh G (2005) Glutathione peroxidase (GPx)-like antioxidant activity of the organoselenium drug ebselen: unexpected complications with thiol exchange reactions. *J Am Chem Soc* **127**, 11477-11485.

Savegnago L, Jesse CR, Moro AV, Borges VC, Santos FW, Rocha JB, Nogueira CW (2006a) Bis selenide alkene derivatives: A class of potential antioxidant e antinociceptive agents. *Pharmacol Biochem Behav* **83**, 221-229.

Savegnago L, Jesse CR, Pinto LG, Rocha JB, Barancelli DA, Nogueira CW, Zeni G (2007a) Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like e anxiolytic-like effects in mice: Involvement of l-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. *Pharmacol Biochem Behav*.

Savegnago L, Jesse CR, Pinto LG, Rocha JB, Nogueira CW (2007b) Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia e persistent inflammatory e neuropathic pain behavior in mice. *Brain Res* **1175**, 54-59.

Savegnago L, Jesse CR, Pinto LG, Rocha JB, Nogueira CW, Zeni G (2007c) Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**, 1261-1269.

Savegnago L, Pinto LG, Jesse CR, Alves D, Rocha JB, Nogueira CW, Zeni G (2007d) Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. *Eur J Pharmacol* **555**, 129-138.

Savegnago L, Pinto LG, Jesse CR, Rocha JB, Nogueira CW, Zeni G (2007e) Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide. *Brain Res* **1162**, 32-37.

- Savegnago L, Trevisan M, Alves D, Rocha JBT, Nogueira CW, Zeni G (2006b) Antisecretory e antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environmental Toxicology e Pharmacology* **21**, 86-92.
- Scharpf M, Schweizer U, Arzberger T, Roggendorf W, Schomburg L, Kohrle J (2007) Neuronal e ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. *J Neural Transm* **114**, 877-884.
- Scheuenpflug J, Krebsfanger N, Doehmer J (2005) Heterologous co-expression of human cytochrome P450 1A2 e polymorphic forms of N-acetyltransferase 2 for studies on aromatic amines in V79 Chinese hamster cells. *Altern Lab Anim* **33**, 561-577.
- Schewe T (1995) Molecular actions of ebselen--an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* **26**, 1153-1169.
- Schumacher DM, Metzler M, Lehmann L (2005) Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, e its modulation by intracellular glutathione. *Arch Toxicol* **79**, 110-121.
- Schwartz TR, Kmiec EB (2007) Reduction of gene repair by selenomethionine with the use of single-stranded oligonucleotides. *BMC Mol Biol* **8**, 7.
- Schweizer U, Brauer AU, Kohrle J, Nitsch R, Savaskan NE (2004) Selenium e brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev* **45**, 164-178.
- Sekiguchi A, Nishina A, Kimura H, Fukumoto RH, Kogami M, Ishihara H, Koketsu M (2006) Bis-(2-amino-5-selenazoyl) ketone as a superoxide anion-scavenger. *Biol Pharm Bull* **29**, 1404-1407.
- Seo YR, Kelley MR, Smith ML (2002a) Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14548-14553.
- Seo YR, Sweeney C, Smith ML (2002b) Selenomethionine induction of DNA repair response in human fibroblasts. *Oncogene* **21**, 3663-3669.
- Shamberger RJ (1970) Relationship of selenium to cancer. I. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **44**, 931-936.
- Shamberger RJ, Frost DV (1969) Possible protective effect of selenium against human cancer. *Can Med Assoc J* **100**, 682.
- Sheikh-Hamad D, Timmins K, Jalali Z (1997) Cisplatin-induced renal toxicity: possible reversal by N-acetylcysteine treatment. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1640-1644.
- Shen H, Yang C, Liu J, Ong C (2000) Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress e apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radic Biol Med* **28**, 1115-1124.
- Shen HM, Ding WX, Ong CN (2002) Intracellular glutathione is a cofactor in methylseleninic acid-induced apoptotic cell death of human hepatoma HEPG(2) cells. *Free Radic Biol Med* **33**, 552-561.

Shi CJ, Zeng HH, Li HW, Yang FG, Wu XQ, Yu LZ (2003) [Induction of apoptosis in prostate cancer cell line PC-3 by BBSKE, a novel organoselenium compound, e its effect in vivo]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **83**, 1984-1988.

Short MD, Xie Y, Li L, Cassidy PB, Roberts JC (2003) Characteristics of selenazolidine prodrugs of selenocysteine: toxicity e glutathione peroxidase induction in V79 cells. *J Med Chem* **46**, 3308-3313.

Sies H (1993) Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* **14**, 313-323.

Sinha R, El-Bayoumy K (2004) Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention e chemotherapy by selenium compounds. *Curr Cancer Drug Targets* **4**, 13-28.

Slamenova D, Horvathova E, Sramkova M, Marsalkova L (2007) DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol e thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma* **54**, 108-112.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE (2003) The interacting pathways for prevention e repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* **531**, 231-251.

Smith ML, Lancia JK, Mercer TI, Ip C (2004) Selenium compounds regulate p53 by common e distinctive mechanisms. *Anticancer Res* **24**, 1401-1408.

Snyder RD (1987) Effects of sodium selenite on DNA e carcinogen-induced DNA repair in human diploid fibroblasts. *Cancer Lett* **34**, 73-81.

Snyder RD, Gillies PJ (2002) Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, e topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen* **40**, 266-276.

Soriano-Garcia M (2004) Organoselenium compounds as potential therapeutic e chemopreventive agents: a review. *Curr Med Chem* **11**, 1657-1669.

Spallholz JE (1994) On the nature of selenium toxicity e carcinostatic activity. *Free Radic Biol Med* **17**, 45-64.

Spector A, Wilson SR, Zucker PA, Huang RR, Raghavan PR (1989) The synthesis of glutathione peroxidase analogs. *Lens Eye Toxic Res* **6**, 773-780.

Speit G, Schutz P, Hoffmann H (2007) Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutat Res* **626**, 42-47.

Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P (2006a) Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* **40**, 1513-1523.

Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, Sies H, Brenneisen P (2006b) Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression e activity. *Free Radic Res* **40**, 936-943.

Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC (1999) Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress e induce apoptosis. *Free Radic Biol Med* **26**, 42-48.

Su D, Novoselov SV, Sun QA, Moustafa ME, Zhou Y, Oko R, Hatfield DL, Gladyshev VN (2005) Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation e sperm maturation. *J Biol Chem* **280**, 26491-26498.

Sun Y, Mu Y, Ma S, Gong P, Yan G, Liu J, Shen J, Luo G (2005) The molecular mechanism of protecting cells against oxidative stress by 2-selenium-bridged beta-cyclodextrin with glutathione peroxidase activity. *Biochim Biophys Acta* **1743**, 199-204.

Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators e helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 739-750.

Suzuki KT, Kurasaki K, Suzuki N (2007) Selenocysteine beta-lyase e methylselenol demethylase in the metabolism of Se-methylated selenocompounds into selenide. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 1053-1061.

Swanson RL, Morey NJ, Doetsch PW, Jinks-Robertson S (1999) Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, e translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 2929-2935.

Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM, Tse MM (2005) A buccal cell model comet assay: development e evaluation for human biomonitoring e nutritional studies. *Mutat Res* **578**, 371-381.

Takahashi H, Nishina A, Fukumoto RH, Kimura H, Koketsu M, Ishihara H (2005) Selenoureas e thioureas are effective superoxide radical scavengers in vitro. *Life Sci* **76**, 2185-2192.

Thielen S, Baum M, Hoffmann M, Loepky RN, Eisenbrand G (2006) Genotoxicity of glycidamide in comparison to (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide e alpha-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood e in mammalian V79-cells. *Mol Nutr Food Res* **50**, 430-436.

Tice RR, Agurell E, *et al.* (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **35**, 206-221.

Tice RR, Strauss GH (1995) The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* **13 Suppl 1**, 207-214.

Tiffany-Castiglioni E, Ehrich M, Dees L, Costa LG, Kodavanti PR, Lasley SM, Oortgiesen M, Durham HD (1999) Bridging the gap between in vitro e in vivo models for neurotoxicology. *Toxicol Sci* **51**, 178-183.

Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Zhang JG, Fariss MW (2000) Glutathione depletion e the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. *Chem Biol Interact* **127**, 201-217.

Tomascik-Cheeseman LM, Coleman MA, Marchetti F, Nelson DO, Kegelmeyer LM, Nath J, Wyrobek AJ (2004) Differential basal expression of genes associated with

- stress response, damage control, e DNA repair among mouse tissues. *Mutat Res* **561**, 1-14.
- Tsao AS, Kim ES, Hong WK (2004) Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin* **54**, 150-180.
- Tsuzuki T, Nakatsu Y, Nakabeppu Y (2007) Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. *Cancer Sci* **98**, 465-470.
- Uddin AN, Burns FJ, Rossman TG (2005) Vitamin E e organoselenium prevent the cocarcinogenic activity of arsenite with solar UVR in mouse skin. *Carcinogenesis* **26**, 2179-2186.
- Urig S, Becker K (2006) On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* **16**, 452-465.
- Vadhanavikit S, Kraus RJ, Ganther HE (1987) Metabolism of selenocyanate in the rat. *Arch Biochem Biophys* **258**, 1-6.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage e cancer incidence. *Mol Cell Biochem* **266**, 37-56.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals e antioxidants in normal physiological functions e human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals e antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1-40.
- VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y, Marnett LJ (2003) Induction of frameshift e base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14247-14252.
- Vedaldi D, Caffieri S, Frank S, Dall'Acqua F, Jakobs A, Piette J (1995) Sulphur e selenium analogues of psoralen as novel potential photochemotherapeutic agents. *Farmaco* **50**, 527-536.
- Vernie LN (1984) Selenium in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* **738**, 203-217.
- von der Hude W, Kalweit S, *et al.* (2000) In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat Res* **468**, 137-163.
- Walmsley RM (2005) Genotoxicity screening: the slow march to the future. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**, 261-268.
- Wang L, Roy SK, Eastmond DA (2007) Differential cell cycle-specificity for chromosomal damage induced by merbarone e etoposide in V79 cells. *Mutat Res* **616**, 70-82.
- Watrach AM, Milner JA, Watrach MA, Poirier KA (1984) Inhibition of human breast cancer cells by selenium. *Cancer Lett* **25**, 41-47.
- Watson WP, Munter T, Golding BT (2004) A new role for glutathione: protection of vitamin B12 from depletion by xenobiotics. *Chem Res Toxicol* **17**, 1562-1567.

- Wei H, Cai Q, Rahn R, Zhang X (1997) Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA. *Free Radic Biol Med* **23**, 148-154.
- Whanger PD (1989) China, a country with both selenium deficiency e toxicity: some thoughts e impressions. *J Nutr* **119**, 1236-1239.
- Whanger PD (2000) Selenoprotein W: a review. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1846-1852.
- Whanger PD (2002) Selenocompounds in plants e animals e their biological significance. *J Am Coll Nutr* **21**, 223-232.
- Whanger PD (2004) Selenium e its relationship to cancer: an update dagger. *Br J Nutr* **91**, 11-28.
- Williams GM (2001) Mechanisms of chemical carcinogenesis e application to human cancer risk assessment. *Toxicology* **166**, 3-10.
- Wilson DM, 3rd, McNeill DR (2007) Base excision repair e the central nervous system. *Neuroscience* **145**, 1187-1200.
- Wise C (2002) 'Epithelial cell culture protocols.' (Humana Press: Totowa).
- Witkiewicz-Kucharczyk A, Bal W (2006) Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol Lett* **162**, 29-42.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004) Environmental e chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **14**, 473-486.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism e its implications for health. *J Nutr* **134**, 489-492.
- Wu W, Murakami K, Koketsu M, Yamada Y, Saiki I (1999) Induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells by two novel organoselenium compounds, TS-2 e TS-6. *Anticancer Res* **19**, 5375-5381.
- Wyatt MD, Pittman DL (2006) Methylating agents e DNA repair responses: Methylated bases e sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* **19**, 1580-1594.
- Xue Z, Hou AX, Kwong DW, Wong WK (2007) Novel ebselen-porphyrin conjugates: synthesis e nucleic acid interaction study. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 4266-4270.
- Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, Asano T, Yasuhara H (1998) Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke* **29**, 12-17.
- Yan L, Spallholz JE (1993) Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols e mammary tumor cells. *Biochem Pharmacol* **45**, 429-437.
- Yang CF, Liu J, Wasser S, Shen HM, Tan CE, Ong CN (2000a) Inhibition of ebselen on aflatoxin B(1)-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats. *Carcinogenesis* **21**, 2237-2243.

- Yang CF, Shen HM, Ong CN (1999) Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity e DNA damage in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* **57**, 273-279.
- Yang CF, Shen HM, Ong CN (2000b) Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols. *Arch Biochem Biophys* **374**, 142-152.
- Yang CF, Shen HM, Ong CN (2000c) Intracellular thiol depletion causes mitochondrial permeability transition in ebselen-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **380**, 319-330.
- Yang JG, Hill KE, Burk RF (1989) Dietary selenium intake controls rat plasma selenoprotein P concentration. *J Nutr* **119**, 1010-1012.
- Yeager TR, Reddel RR (1999) Constructing immortalized human cell lines. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 465-469.
- Zadzinski R, Fortuniak A, Bilinski T, Grey M, Bartosz G (1998) Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. *Biochem Mol Biol Int* **44**, 747-759.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* **60**, 6-20.
- Zhang JG, Nicholls-Grzemeski FA, Tirmenstein MA, Fariss MW (2001) Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I e III by alkylating agents. *Chem Biol Interact* **138**, 267-284.
- Zhao F, Yan J, Deng S, Lan L, He F, Kuang B, Zeng H (2006) A thioredoxin reductase inhibitor induces growth inhibition e apoptosis in five cultured human carcinoma cell lines. *Cancer Lett* **236**, 46-53.
- Zhao R, Holmgren A (2002) A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin e thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **277**, 39456-39462.
- Zhou N, Xiao H, Li TK, Nur EKA, Liu LF (2003) DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. *J Biol Chem* **278**, 29532-29537.
- Zhu Z, Jiang W, Ganther HE, Ip C, Thompson HJ (2000) In vitro effects of Se-allylselenocysteine e Se-propylselenocysteine on cell growth, DNA integrity, e apoptosis. *Biochem Pharmacol* **60**, 1467-1473.
- Zu K, Ip C (2003) Synergy between selenium e vitamin E in apoptosis induction is associated with activation of distinctive initiator caspases in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **63**, 6988-6995.
- Zucco F, De Angelis I, Testai E, Stamatii A (2004) Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicol In Vitro* **18**, 153-163.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação entre o íon selenito e glutathione com formação de seleneto de hidrogênio e geração de ânion superóxido (Adaptado de Spallholz 1994).

Figura 2. Mecanismo catalítico proposto para glutathione peroxidase (Adaptado de Mugesh et al., 2001)

Figura 3. Esquema de redução de tioredoxina com uso de NADPH pela selenoproteína tioredoxina redutase (Adaptado de Birringer et al., 2002).

Figura 4. Principais rotas do metabolismo de selênio em mamíferos (Adaptado de Gromer e Gross, 2002).

Figura 5. Mecanismos dos efeitos anticarcinogênicos do selênio (Adaptada de Combs e Grey 1998).