

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**EFEITOS DO COMPOSTO**  
**3'3-DITRIFLUORMETILDIFENIL DISSELENETO**  
**EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS**

**Miriana da Silva Machado**

**Orientador: Dr. João Antonio Pêgas Henriques**

**Co-Orientador: Dr. Rafael Roesler**

**Porto Alegre**

**2006**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**EFEITOS DO COMPOSTO 3'3-DITRIFLUORMETILDIFENIL  
DISSELENETO EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS**

**Miriana da Silva Machado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador: Dr. João Antonio Pêgas Henriques**

**Co-Orientador: Dr. Rafael Roesler**

**Porto Alegre**

**2006**

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade, do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e no Laboratório de Radiobiologia Molecular do Departamento de Biofísica desta Universidade. Este trabalho foi financiado pelo GENOTOX – Laboratório de Genotoxicidade, contando ainda com o apoio da CAPES, CNPq e FAPERGS.

*Dedico este trabalho à minha mãe Marli que sempre se esforçou para nos mostrar os caminhos certos sendo um exemplo de luta, coragem e garra.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. João Antonio Pêgas Henriques pelo acolhimento, amizade, confiança, apoio e oportunidades geradas durante este trabalho.

Ao Prof. Rafael Roesler pela orientação, confiança e “injeções de energia”.

Ao Prof. Arthur Fett pela cuidadosa revisão deste trabalho.

À Banca examinadora Prof. Flávio Kapczinski, Prof<sup>a</sup> Jaqueline Picada, Prof. Arthur Fett e Juliana da Silva pela disposição de avaliar este trabalho.

Aos professores Antônio Luis Braga e Helmóz R. Appelt (UFSM) pela disponibilização do DFDD e por todos ensinamentos e discussões durante este trabalho.

À minha comissão de acompanhamento Prof<sup>a</sup> Juliana da Silva e Prof<sup>a</sup> Jenifer Saffi pelas críticas e sugestões.

Ao Prof. Claus Tröger Pich que, além de um grande amigo e professor, me incentivou e ajudou em vários momentos difíceis. Além disso, o Claus foi o responsável pela minha vinda para o GENOTOX.

Aos amigos do GENOTOX: Miriam, Izabel, Márcia, Jaqueline de Deos, Gabriel, Roseli, Sueli, Carlos e Ana Amélia que me receberam de braços abertos e além de muitos auxílios e paciência...muitos cafés, mates e cervejas inesquecíveis.

A todo grupo dos Laboratórios 210 e 212 do Departamento de Biofísica: Prof<sup>a</sup> Jenifer, Prof<sup>a</sup> Kátia, Dinara, Renato, Ana Cata, Nicolás, Santos, Albanin, Ana Ziles, Mateus, Fernanda, Nucha, Diego, Giovani, Cláudio, Duda, Knulp, Iuri e Bibiana pela ajuda e “recepção” na difícil fase pós-incêndio. Agradeço também pela companhia nas inúmeras festas e nos momentos de “carga” que todos participaram do mutirão “Vai Miriana”!!!

À equipe do Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (UCS) especialmente à Prof<sup>a</sup> Mirian Salvador que sempre, com muito carinho, me ajudou com seus ensinamentos, sugestões e críticas.

Aos amigos do Laboratório 219 do Centro de Biotecnologia (Cassiana, Jaque, Bacana, Renata, Fabrício), principalmente à Cassi pelo grande apoio no PROIN.

Aos amigos Daniel Prá, Sílvia “Pink”, Jaque Picada e Jane Boeira pelas parcerias e discussões durante este trabalho.

À grande amiga e eterna colega Andrea Dantas pelo apoio em várias “correrias”, carinho e conselhos.

Aos colegas Débora Flores, Gustavo Reolon, Thales Preissler e Carolina Meller pelas parcerias principalmente nos ensaios neurocomportamentais.

À Sílvia Centeno, ao Luciano Saucedo e à Graziela Ramos pelos inúmeros auxílios ao longo destes anos.

Ao grupo da cerveja (Mi, Bella, CamAila) pela amizade, paciência, apoio, companhia e muitas risadas.

À Simone, Ana Paula, Eve, Cecilia, Belela, Mary, Pris, June, Andréus, Daiane, Claudine, Ana Cláudia, Juliana, Denise, Flávia, Eugenia e Milene pela grande amizade, companheirismo, paciência e que tanto “escutaram” e sempre me motivaram nos períodos de incertezas.

À minha família “porto-alegrense” pela recepção, apoio e paciência pelas minhas ausências.

À minha irmã Milena que sempre, mesmo de longe, me apoiou nos momentos difíceis e é um exemplo de força e coragem.

À toda minha família de Bagé, principalmente meus dindos Neri, Silvana, Antônia e minha prima Cínthia que foram sempre incansáveis nos diversos “apertos”. Sem eles, com certeza, não seria possível a realização deste trabalho. Muito obrigada!

A Deus por me proporcionar tantas oportunidades...

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	IV
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>RESUMO</b> .....	XI
<b>ABSTRACT</b> .....	XIII
<b>I - INTRODUÇÃO</b> .....	01
1. Selênio.....	01
1.1 Efeitos tóxicos e biológicos do selênio.....	01
1.2 Efeitos do selênio no Sistema Nervoso Central (SNC).....	03
1.3 O selênio na prevenção do câncer.....	06
1.4 Biodisponibilidade.....	08
1.5 Ocorrência e metabolismo em mamíferos .....	09
1.6 Compostos orgânicos de selênio.....	12
1.7 Objeto de estudo: 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto .....	16
2. Estratégias experimentais utilizadas nesse estudo.....	17
2.1 Avaliação das atividades neurocomportamentais em camundongos.....	17
2.1.1 Estudo de memórias de curta e longa duração.....	17
2.1.1.1 Esquiva Inibitória.....	19
2.1.1.2 Habituação a um novo ambiente.....	20
2.1.2 Estudo do comportamento estereotipado.....	20
2.2 Avaliação da atividade genotóxica.....	21
2.2.1 Avaliação da genotoxicidade em procariotos - Teste <i>Salmonella</i> /microsoma.....	22
2.2.2 Avaliação da genotoxicidade em eucariotos.....	24
2.2.2.1 Avaliação da genotoxicidade em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
2.2.2.2 Avaliação da genotoxicidade em células de mamíferos.....	26

<b>II - OBJETIVOS</b> .....	29
<b>III - CAPÍTULO 1</b>	
“An organic selenium compound blocks the apomorphine-induced stereotypy in mice”.....	30
<b>IV - CAPÍTULO 2</b>	
“Differential genotoxic activities of a catalase-like organoselenium compound”.....	46
<b>V - DISCUSSÃO GERAL</b> .....	73
<b>VI - CONCLUSÃO</b> .....	76
<b>VII - PERSPECTIVAS</b> .....	78
<b>VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	79
<b>ANEXOS</b> .....	103



## ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
ALA-D	$\delta$ -aminolevulinato desidratase
APO	Apomorfina
Cat	Catalase
DFDD	3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto
DP	Doença de Parkinson
DPDS	Disseleneto de difenila
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EI	Esquiva Inibitória
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EC	Ensaio Cometa
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
LTM	Memória de longa duração (“long term memory”)
MA	Metanfetamina
MK-801	[3- <sup>3</sup> H]5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5- 10imina
MPTP	N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Selenito de sódio
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	Selenato de sódio
NER	Reparação por excisão de nucleotídeos
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Radical superóxido
OH <sup>·</sup>	Radical hidroxila
PBS	Tampão salina-fosfato
Se	Selênio

Se <sup>0</sup>	Selênio elementar
Se <sup>+4</sup>	Selenito
Se <sup>+6</sup>	Selenato
Se <sup>-2</sup>	Seleneto
SeIP	Selenoproteína P
SeIW	Selenoproteína W
SNC	Sistema nervoso central
Sod	Superóxido dismutase
STM	Memória de curta duração (“short term memory”)
<i>t</i> -BOOH	Hidroperóxido de <i>tert</i> -butila
Trx	Tiorredoxina

## RESUMO

O 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto (DFDD) é um composto organoselenado análogo ao disseleneto de difenila (DPDS). No entanto, diferentemente do DPDS, maiores estudos em relação às atividades biológicas do DFDD ainda permanecem escassos na literatura.

Com o objetivo de ampliar o conhecimento dos efeitos biológicos do DFDD, nesse estudo investigou-se a interferência desta molécula no neurocomportamento em camundongos. Além disso, as atividades genotóxicas deste organoselenado em linhagens de *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* e em células de mamíferos em cultura (células V79) também foram avaliadas.

Nos ensaios neurocomportamentais em camundongos, o DFDD apresentou uma interessante atividade bloqueadora da estereotipia induzida por apomorfina, que é um modelo animal de esquizofrenia, sem agir sobre outros parâmetros importantes como a memória, ansiedade, exploração e locomoção detectados nas tarefas de esquiva inibitória, campo aberto e habituação a um novo ambiente.

Demonstrou-se também neste trabalho que o DFDD não foi mutagênico no Teste *Salmonella*/microsoma tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica. Entretanto, em linhagens de *S. cerevisiae*, o DFDD induziu mutações “forward” e reversa, porém locus não-específico. Diferentemente do seu análogo estrutural DPDS, o DFDD não foi capaz de induzir mutações “frameshift” em *S. typhimurium* ou *S. cerevisiae* mesmo quando as linhagens foram tratadas em condições de crescimento. Deste modo, sugere-se que o DFDD não é capaz de se intercalar entre as bases do DNA e que, possivelmente, este efeito seja provocado por um impedimento alostérico causado pelos grupamentos CF<sub>3</sub> presentes neste organoselenado. Além disso, o DFDD mostrou-se um fraco agente citotóxico e genotóxico em *S. cerevisiae* e células V79.

Por outro lado, como foi demonstrado no Teste *Salmonella*/microsoma, o DFDD apresentou um efeito protetor contra a mutagenicidade induzida por peróxido de hidrogênio. De maneira interessante, utilizando um ensaio *in vitro*, mostrou-se que o DFDD possui uma atividade “catalase-like” até o momento não apresentada por nenhum outro composto organoselenado.

No presente trabalho tornou-se evidente também que o DFDD atua de maneira distinta do seu análogo DPDS em vários modelos experimentais e que, provavelmente, os grupamentos  $\text{CF}_3$  presentes no DFDD sejam de fundamental importância para as interessantes atividades demonstradas por este disseleneto.

## ABSTRACT

The organoselenium compound 3,3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide (DFDD) is a structural analog of diphenyl diselenide (DPDS). However, in contrast of DPDS, the biologic activities of the DFDD have been poorly studied. The aim of this work was to investigate the neurobehavioral activities of DFDD in mice. In addition, we also evaluated the genotoxic profile of this compound in *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae* strains, and cultured mammalian cells – V79.

In the neurobehavioral studies, we demonstrated that the systemic administration of DFDD at the highest dose used (25.0  $\mu\text{mol/kg}$ ) significantly reduced apomorphine-induced stereotyped behaviors. Moreover, a series of control experiments showed that the same dose of DFDD did not affect open field behavior, habituation, or aversively motivated memory.

Using the *Salmonella*/microsome assay DFDD did not show mutagenic effects, even in the presence of metabolic activation. Whereas DPDS was able to induce frameshift mutation when the TA97a *S. typhimurium* and XV185-14c *S. cerevisiae* strains were treated during growth, probably by a DNA intercalating activity, DFDD did not induce this mutation. Thus, we suggest that DFDD, in contrast to its analog DPDS, did not intercalate at the DNA base pairs. Nevertheless, DFDD induced forward and LYS<sup>+</sup> reverse mutations in *S. cerevisiae* strains. Moreover, DFDD has also shown a weak and dose-nondependent cytotoxic and genotoxic effects in *S. cerevisiae* strains and V79 cells, respectively.

On the other hand, in the *Salmonella*/microsome assay, this organoselenium compound presented protective actions against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- but not *t*-BOOH-induced mutagenic effects. Furthermore, we have shown that DFDD has a Cat-like activity. These results suggest that DFDD might induce genotoxic effects and protective actions against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage by mimicking the catalase activity.

Furthermore, we have shown that the DFDD presents some opposite features to those observed for its structural analog DPDS in several assays. Therefore, it is tempting to suggest that the different and interesting activities demonstrated by DFDD in the present work are related to its CF<sub>3</sub> functional groups, since this is the only structural difference between these diselenides.

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Selênio

#### 1.1 Efeitos tóxicos e biológicos do selênio

O elemento químico selênio (Se), nominado em homenagem à deusa grega da lua, Selene, foi descoberto pelo químico suíço Jons Jakob Berzelius e seu colega Gahn em 1817, enquanto examinavam um precipitado avermelhado no sedimento sulfúrico de uma planta. O selênio é um elemento pertencente ao grupo 16 da tabela periódica, apresentando-se em três formas alotrópicas incluindo o selênio cinza, vermelho e preto e nos seguintes estados de oxidação: selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ) e seleneto ( $\text{Se}^{-2}$ ) (PORCIÚNCULA, 2003). O primeiro interesse em relação à atividade biológica deste elemento sempre esteve ligado à sua toxicidade (MOXON & RHIAN, 1943).

O estudo do mecanismo de ação do selênio foi iniciado devido à sua alta toxicidade em várias espécies de mamíferos (PAINTER, 1941; PENRITH, 1995). No século 13, provavelmente entre o período de 1271-1295, Marco Pólo, enquanto viajava na rota da seda no oeste da China, fez importantes relatos sobre uma planta venenosa que afetava qualquer animal de carga que dela se alimentasse (SPALLHOLZ, 1994). Em seus relatos, essa planta tóxica pertencente ao gênero *Astragalus sp.* foi responsável pela intoxicação de dezenas de cavalos de mercadores que atravessavam a região. Mais de 1500 espécies de *Astragalus* são conhecidas e estão distribuídas pelo oeste da China, oeste dos Estados Unidos e outras regiões áridas e semiáridas. A toxicidade do selênio foi confirmada primeiramente em 1933, em bovinos que tinham se alimentado de plantas da região oeste dos Estados Unidos (SPALLHOLZ, 1994). Na década seguinte, PAINTER (1941) enfatizou que a toxicidade do selênio inorgânico poderia estar relacionada à oxidação de tióis endógenos com a concomitante formação de dissulfetos e intermediários instáveis chamados de selenotrisulfetos (RS-Se-SR). Após a proposta desta teoria, vários pesquisadores confirmaram a interação entre o selênio inorgânico e tióis (STEKOL, 1942; TSEN & TAPPEL, 1958; GANTHER, 1968, 1971; SEKO *et al.*, 1989; KITAHARA *et al.*, 1993). Além disso, SEKO e colaboradores, em 1989, sugeriram que o selenito ( $\text{Se}^{4+}$ )

poderia reagir com glutathiona reduzida (GSH) formando o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Esta observação foi reproduzida por SPALLHOLZ (1994) que demonstrou que outros tióis reagem com selenito e selenocistina para produzir superóxido e hidroperóxidos. De acordo com estes autores, a toxicidade do selênio seria manifestada aguda ou cronicamente quando os danos oxidativos excedessem as defesas antioxidantes.

Além do conhecido efeito genotóxico do selênio em células de mamíferos, o elemento reduz a mutagenicidade de vários mutágenos em culturas de linfócitos humanos. Selenito de sódio ( $Na_2SeO_3$ ) preveniu a indução de troca de cromátides-irmãs causadas por cloreto de mercúrio e metilmercúrio. Contudo, selenato de sódio ( $Na_2SeO_4$ ) aumentou o nível de quebras cromossomais causadas por cloreto de metilmercúrio no mesmo sistema celular. Entretanto, o selenato de sódio reduziu a genotoxicidade provocada por dicromato de potássio na linhagem TA102 no Teste *Salmonella*/microsossoma, enquanto que o selenito de sódio não demonstrou este efeito (CEMELI *et al.*, 2003). Neste mesmo trabalho, os autores também avaliaram a ações destes compostos de selênio no dano ao DNA de linfócitos humanos pelo Ensaio Cometa usando o dicromato de potássio como agente genotóxico. Neste ensaio, somente o selenato de sódio protegeu contra o dano ao DNA enquanto o selenito de sódio exacerbou a genotoxicidade causada pelo dicromato de potássio (CEMELI *et al.*, 2003). Demonstrou-se assim que além da concentração, a forma química portadora de selênio é crucial para os efeitos biológicos (SHAMBERGER, 1971; SHAMBERGER *et al.*, 1973; RAY *et al.*, 1978; STAHL *et al.*, 1984). Em ensaios *in vivo*, o composto selenito aumentou a frequência de aberrações cromossômicas e induziu troca de cromátides irmãs em células da medula óssea de hamster. Entretanto, somente quantidades supranutricionais foram responsáveis por estes resultados (SHELBY & WITT, 1985).

Em relação ao potencial carcinogênico do selênio, vários estudos não conclusivos foram realizados e, em 1957, a Agência Internacional de Pesquisa contra o Câncer divulgou a inexistência de dados relevantes para considerar este elemento como um carcinógeno ao homem. Além disso, no mesmo ano, o selênio começou a ser descrito como um elemento essencial para os mamíferos (SCHWARTZ & FOLTZ, 1957a, 1957b).

O selênio desempenha importantes papéis no crescimento, desenvolvimento e metabolismo de mamíferos (STANDMAN, 1996, 2002; HOLBEN & SMITH, 1999; GLADYSHEV & HATFIELD, 1999; BURK & HILL, 1999; SCHOMBURG *et al.*, 2004).

Recentes estudos comprovam que o consumo insuficiente de selênio predispõe os mamíferos a uma variedade de doenças, como cardiomiopatias e miocardites (CHEN *et al.*, 1980; SCHOMBURG *et al.*, 2004). RAYMAN (2000, 2002) também cita que o selênio é importante para a função tireoideana, cardiovascular e cerebral, essencial para a fertilidade masculina e para o funcionamento do sistema imune aparecendo como um nutriente chave contra o desenvolvimento da virulência do vírus HIV e progressão da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Além disso, o selênio destaca-se por desempenhar um importante papel na proteção antioxidante contra danos causados por radicais livres em membranas celulares, lipoproteínas e ácidos nucléicos (RAYMAN, 2000). Esta atividade antioxidante poderia estar relacionada, em parte, ao fato de o selênio estar incorporado como um resíduo de selenocisteína no sítio catalítico de várias enzimas que são denominadas de selenoproteínas (KRYUKOV *et al.*, 2003). Aproximadamente 35 selenoproteínas e mais de 25 genes que expressam selenoproteínas já foram identificados em mamíferos (URSINI *et al.*, 1990; KOHRLE, 1999; KOHRLE *et al.*, 2000; RAYMAN, 2000; SCHWEIZER *et al.*, 2004a), sendo que a maioria destas proteínas são expressas no cérebro (SCHWEIZER *et al.*, 2004b) e possuem diversas atividades biológicas (KRYUKOV *et al.*, 2003). Elas incluem a família de enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase (GPx) (FLOHÉ *et al.*, 1973; ROTRUCK *et al.*, 1973; BOCK *et al.*, 1991; BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999; WINGLER & BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999; KRYUKOV *et al.*, 2003), fosfolípídeo-hidroperóxido-glutaciona peroxidase (URSINI *et al.*, 1982), tioredoxina redutase (GASDASKA *et al.*, 1999) e um número de proteínas recentemente identificadas, como por exemplo, selenoproteína X, selenoproteína N, selenoproteína W e selenoproteína P, que estão em processo de caracterização (BURK *et al.*, 2003; KRYUKOV *et al.*, 2003).

### 1.2 Efeitos do selênio no Sistema Nervoso Central (SNC)

O cérebro é um órgão que se destaca por possuir altas quantidades de selênio, as quais se mantêm até mesmo em condições de deficiência deste elemento (SCHWEIZER *et al.*, 2004). Ratos alimentados com dietas deficientes em selênio por muitas gerações apresentaram uma pequena redução nos níveis deste micronutriente nas células cerebrais (SAVASKAN *et al.*, 2003). Além disso, no SNC o selênio é encontrado principalmente



associado a proteínas e exerce seus efeitos biológicos predominantemente após a incorporação em selenoproteínas (PROHASKA & GANTHER, 1976; STADTMAN, 1996). Contudo, vários trabalhos estão sendo feitos com o objetivo de elucidar o papel do selênio nas funções cerebrais.

Em modelos animais de doenças neurológicas, WILLMORE e RUBIN demonstraram que a administração de selênio teve efeitos benéficos após a epilepsia induzida por ferro em ratos (RUBIN & WILLMORE, 1980; WILLMORE & RUBIN, 1981). Outros estudos relataram que roedores alimentados com dietas pobres em selênio apresentavam uma maior sensibilidade à degeneração nigro-estriatal induzida por metanfetamina (KIM *et al.*, 1999; 2000). Além disso, a administração de ácido kaínico em ratos alimentados com dietas pobres em selênio levou ao aumento da morte celular hipocampal e altos índices de episódios epiléticos (SAVASKAN *et al.*, 2003). No entanto, a suplementação com selênio impediu a perda de dopamina, a degeneração de neurônios da substância nigra e reduziu a peroxidação lipídica (AL DEEB *et al.*, 1995; IMAM *et al.*, 1999; ZAFAR *et al.*, 2003). Em adição, em camundongos, os níveis de selênio no tecido cerebral dependem fortemente da expressão da selenoproteína P (SelP), sugerindo que SelP possui um papel crucial no transporte do selênio para o cérebro (HILL *et al.*, 2003, SCHOMBURG *et al.*, 2003).

Os primeiros dados clínicos relacionando o selênio com doenças neurológicas, que pertencem a dois estudos não interligados, sugerem que no mínimo uma forma intratável de epilepsia em crianças estaria associada a baixos níveis de selênio no sangue (WEBER *et al.*, 1991; RAMAEKERS *et al.*, 1994) e que estes episódios poderiam ser controlados quando as crianças recebessem uma suplementação com este micronutriente. O fato mais importante foi que, com a retirada da suplementação com o selênio, os episódios epiléticos retornavam e novamente poderiam ser controlados somente com a suplementação com o selênio (RAMAEKERS *et al.*, 1994). Essas observações são suportadas, em parte, pelos resultados obtidos com camundongos deficientes na proteína SelP, que desenvolveram um fenótipo neurológico com desordens no movimento e eventual epilepsia (SCHOMBURG *et al.*, 2003). A ligação entre epilepsia e selênio também foi sugerida a partir de observações de pacientes sob nutrição parenteral que possuíam o risco de desenvolver epilepsia até o selênio ser incorporado nas formulações (KIEN & GANTHER, 1983; BROWN *et al.*, 1986).

SCHWEIZER *et al.*, em 2004, propuseram um modelo de ativação de alvos celulares e cascatas após danos no tecido cerebral, como os encontrados em epilepsia, isquemia e traumatismo, relacionando com os níveis de selênio. Neste modelo, o dano no tecido cerebral inicialmente induz a um aumento na liberação de glutamato, afetando os neurônios e ativando as células gliais. A prolongada duração desta liberação de glutamato leva ao aumento do influxo de cálcio e aumento do estresse oxidativo e, subseqüentemente, à morte celular. Entretanto, as células gliais (células microgliais e astrócitos) são diretamente ativadas pelos sinais mediados por neurônios injuriados ou mortos. Esta ativação potencializa o estresse oxidativo e o dano neural levando a uma segunda indução de morte celular, também chamado de “segundo ataque”. O aumento dos níveis de selênio, pelo seu status redox, balancearia o estado redox celular e controlaria a ativação de quinases e fatores de transcrição. Estes efeitos neuroprotetores podem, em princípio, ser mediados diretamente ou indiretamente pela incorporação do selênio em selenoproteínas e/ou aumentar a expressão destas. Entretanto, o modo pelo qual o selênio atua diretamente em células microgliais ou astrogliais ainda permanece desconhecido (SCHWEIZER *et al.*, 2004a).

Assim como na epilepsia, o selênio tem demonstrado efeitos protetores em modelos animais da Doença de Parkinson (DP). KIM *et al.* (1999; 2000) demonstraram que as lesões químicas no sistema dopaminérgico provocadas por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), metil-fenil-tetrahidropiridina (MPTP) ou metanfetamina (MA) em animais deficientes em selênio poderiam ser reduzidas pela administração deste micronutriente. O pré-tratamento com selênio também inibiu as alterações neurocomportamentais e reduziu os níveis de produtos provenientes de peroxidação lipídica provocadas por iminodipropionitrilo em camundongos (AL DEEB *et al.*, 1995). Já no modelo de MA, o selênio teve um efeito protetor contra a depleção de dopamina no estriado e a modulação de enzimas dependentes deste micronutriente (como a GPx), pela administração de selênio, atenuou de maneira dose-dependente a neurodegeneração em ratos tratados com 6-OHDA e em ratos e camundongos tratados com MA (IMAM *et al.*, 1999; SANCHEZ *et al.*, 2003; ZAFAR *et al.*, 2003).

Dados clínicos com pacientes possuidores da DP, entretanto, não sugeriram diretamente uma ligação entre esta doença neurodegenerativa e os níveis de selênio no líquido cefalorraquiano ou a atividade de GPx (CHEN & BERRY, 2003; BRAUER &

SAVASKAN, 2004). Certamente, a atual inabilidade de determinar os níveis de selênio ou as atividades de selenoenzimas no cérebro *in vivo* representa, por enquanto, o principal problema na elucidação do papel do selênio na Doença de Parkinson (SCHWEIZER *et al.*, 2004b).

Da mesma maneira, a direta correlação entre os níveis de selênio e estágios do Mal de Alzheimer não tem sido encontrada (CORNETT *et al.*, 1998; CHEN & BERRY, 2003). Curiosamente, foi observado em tecidos cerebrais de pacientes que possuíam o Mal de Alzheimer um aumento na atividade da enzima tiorredoxina redutase (TrxR), mas uma diminuição nos níveis transcricionais de tiorredoxina (Trx) (LOVELL *et al.*, 2000). Entretanto, no presente momento, está em andamento uma pesquisa clínica que examina o efeito do tratamento com o selênio em associação à vitamina E na incidência da demência de Alzheimer (PREADVISE). Esta pesquisa está sendo feita juntamente com a pesquisa SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) que avalia a ação do selênio e da vitamina E na prevenção do câncer de próstata.

Entretanto, vários pesquisadores têm encontrado co-relações entre alguns tipos de Esquizofrenia e níveis de selênio e/ou selenoproteínas no cérebro e sangue. BERRY, em 1994, cita que a selenoproteína P, que é uma proteína transportadora de selênio, possivelmente estaria envolvida na etiologia de uma forma de esquizofrenia. Já VADDADI *et al.* (2003) demonstraram que pacientes esquizofrênicos apresentam baixos níveis de selênio no cérebro. Mais recentemente, em 2005, GLATT *et al.* mostraram que o gene SELENBP1 (que codifica uma “selenium-binding protein”) é altamente expresso no tecido cerebral e sanguíneo de pacientes esquizofrênicos e, com isso, este gene poderia tornar-se um forte candidato a biomarcador da esquizofrenia (GLATT *et al.*, 2005).

### 1.3 O selênio na prevenção do câncer

Os estudos desenvolvidos por DOUGLAS FROST e RAYMOND SHAMBERGER nos Estados Unidos, em 1969, estimularam o interesse na pesquisa do selênio para a prevenção do câncer (SHAMBERGER & FROST, 1969). Após este trabalho, vários autores destacaram os efeitos anticarcinogênicos do selênio (SHAMBERGER & FROST, 1969; SHAMBERGER & WILLIS, 1971; SHAMBERGER *et al.*, 1976; SPALLHOLZ, 1994; BRONZETTI *et al.*, 1996; BLOCK, 1996; COMBS, 1997; STAPLETON *et al.*,

1997; MEUILLET *et al.*, 2004). Data de 1911 o primeiro relato do selênio como tratamento eficaz em tumores induzidos em camundongos (MUGESH *et al.*, 2001a). MILNER, em 1981, comprovou a ação anticarcinogênica de formas orgânicas de selênio em camundongos, explorando mais possibilidades de formas ativas deste micronutriente.

Alguns autores sugerem que a suplementação nutricional com o selênio diminuiria a incidência e a mortalidade causada por alguns tipos de tumores, por exemplo, cólon, próstata e pulmão (CLARK *et al.*, 1997; WHANGER, 2004). Esta ação seria possivelmente mediada pela reconhecida atividade antioxidante do selênio (SHAMBERGER *et al.*, 1976; NEVE, 1991; COMBS & GRAY, 1998) ou pela sua capacidade de interferir na expressão de selenoproteínas nesses órgãos, já que a redução da quantidade de selênio tecidual afeta a expressão de algumas selenoproteínas como a GPx e SelW (PAGMANTIDIS *et al.*, 2005). Além disso, o selênio ativa algumas enzimas importantes como MAP quinases (MAPKs) e fatores de transcrição, tais como, AP1 e NF- $\kappa$ B que influenciam na expressão gênica e crescimento celular (MAKROPOULOS *et al.*, 1996). A ação do selênio também poderia estar relacionada com a proteção contra danos ao DNA (LIU *et al.*, 1991; THIRUNAVUKKARASU & SAKTHISEKARAN, 2003), indução de enzimas detoxificantes (IP, 1998; CHAKRABORTY & SELVARAJ, 2000) e indução de apoptose via mecanismos redox (COMBS & GRAY, 1998; IP, 1998; GANTHER, 1999; EVANGELOU, 2002; VALKO *et al.*, 2006). Entretanto, um recente estudo sugere que a ação anticarcinogênica do selênio estaria relacionada a uma ação pró-oxidante e não antioxidante deste elemento (DRAKE, 2006). Embora o selênio seja um componente da importante enzima glutathiona peroxidase e, com isso, a remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO) fosse a principal função bioquímica do selênio (NEVE, 1991), VERNIE, em 1984, demonstrou que mesmo em concentrações maiores do que aquelas consideradas ótimas para a ação da GPx, o selênio segue apresentando um aumento na atividade anticarcinogênica. Segundo DRAKE, o selenito, composto inorgânico de selênio recentemente aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA), pode inativar diretamente enzimas contendo tióis (por exemplo a proteína quinase C – PKC), oxidando os grupamentos sulfidríla e produzindo ERO. Com isso, as células mutantes, que entram em apoptose mais facilmente do que células normais, desencadeariam o processo apoptótico (DRAKE, 2006). Os estudos feitos em mamíferos apontam que as formas inorgânicas são agentes antitumorais mais eficazes do que as

formas orgânicas (GREEDER & MILNER, 1980; THOMPSON, 1984; REDDY *et al.*, 2000; CORCORAN *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, o uso do selênio para a prevenção do câncer tem sido analisado em testes clínicos em humanos, sendo que o primeiro estudo foi desenvolvido na China. Um total de 20.847 chineses ingeriram aproximadamente 30-50 µg de selenito de sódio por dia durante 8 anos e a incidência de câncer primário de fígado foi significativamente reduzida (OGRA *et al.*, 2002). CLARK *et al.*, 1997, demonstraram que a suplementação com levedo de cerveja enriquecido com selênio diminuiu a morbidade e mortalidade relacionada ao câncer em aproximadamente 50%. Além disso, um estudo denominado SELECT, como citado anteriormente, está em andamento nos Estados Unidos, desde 2001, com aproximadamente 30 mil pacientes homens, no qual está sendo avaliada a ação anticarcinogênica do selênio usando o composto orgânico selenometionina (em associação ou não com a vitamina E) na prevenção do câncer de próstata. Este estudo continuará até o ano de 2013 e, com certeza, trará maiores esclarecimentos em relação ao uso de selênio como agente antitumoral (KLEIN *et al.*, 2003; HAMILTON *et al.*, 2006; DRAKE, 2006).

### 1.4 Biodisponibilidade

A recomendação de ingestão diária nos Estados Unidos sugere 70 e 55 µg/dia para homens e mulheres, respectivamente, sendo 350 µg/dia o limite máximo aceitável. Sendo o solo a fonte primária de selênio nos alimentos, os níveis do elemento em plantas e animais variam muito (REILLY, 1998; BIRNINGER *et al.*, 2002; WHANGER, 2002; ABDULAH *et al.*, 2005).

O selênio é um micronutriente cujas concentrações relacionadas com deficiência e intoxicação são muito próximas, diferindo entre si numa proporção menor que 100 vezes (JACOBS & FROST, 1981). Na forma de selenito ou selenometionina, funções de nutriente essencial são compatíveis com os níveis em torno de 0,1 ppm na dieta enquanto níveis tóxicos são atingidos a 8 ppm. Em geral, a DL50 de sais de selênio varia entre 0,4 a 6,4 mg Se/Kg dependendo do composto utilizado (IP & LISK, 1993).

### 1.5 Ocorrência e metabolismo em mamíferos

Em 1970, Klaus Schwarz e seu colega Arne Fredga desenvolveram 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 uma forma orgânica de baixo peso molecular de selênio, o primeiro selenocomposto de mamífero a ser identificado – a selenocisteína (SPALLHOLZ, 1994; FLOHÉ *et al.*, 2000).

Os animais podem sintetizar diversos metabólitos intermediários durante a conversão de selênio inorgânico em formas orgânicas e vice-versa, como mostra a figura 2.

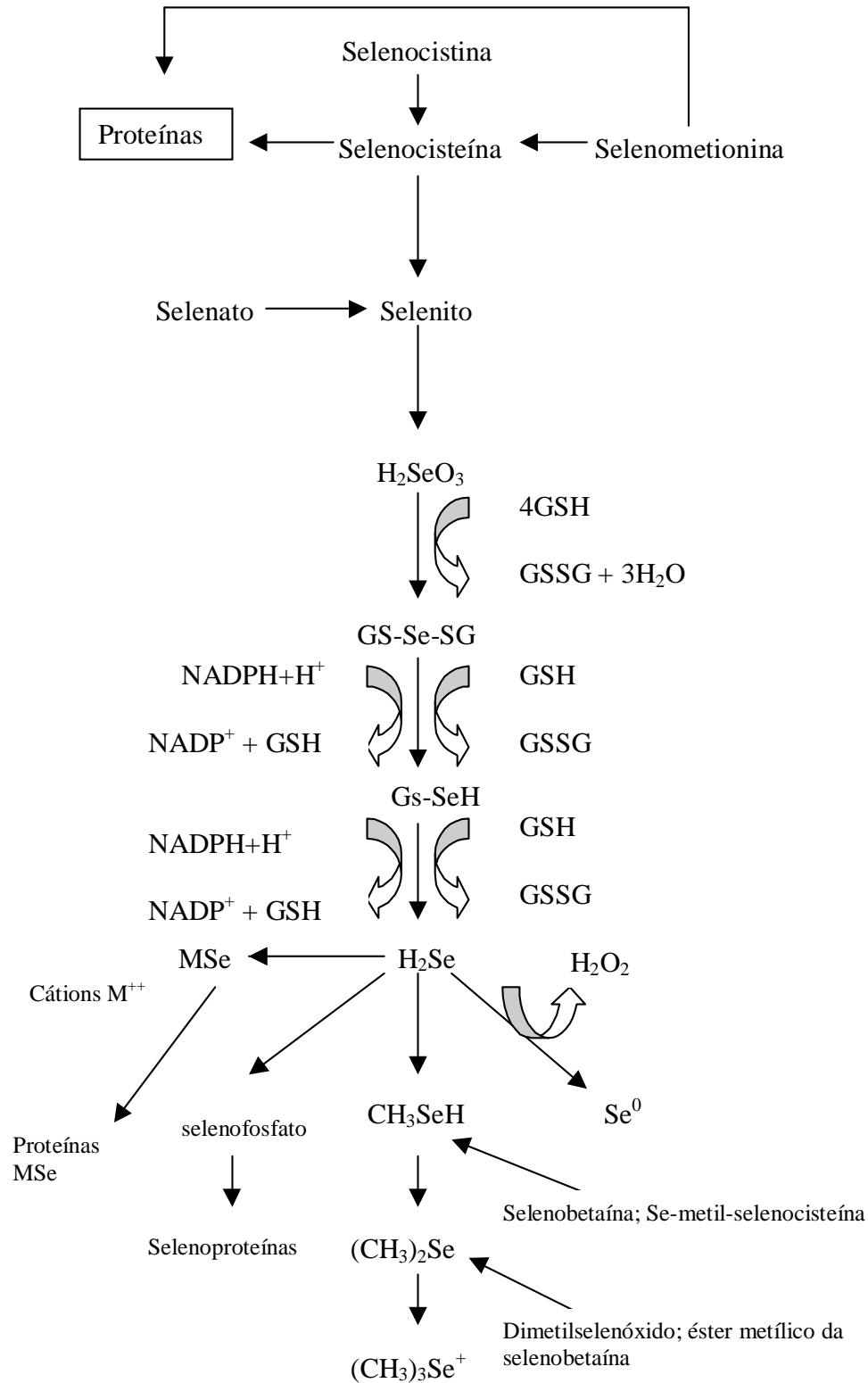
Formas inorgânicas como o selenato são convertidos em selenito e este é reduzido por proteínas tiol intracelulares, como a glutathiona, e redutases dependentes de NADPH e independentes de oxigênio. O produto final destas reações, via selenodiglutationa e persulfido de selenoglutationa, é o seleneto de hidrogênio que é um composto central nesse metabolismo, (GANTHER & LAWRENCE, 1997).

Selenometionina oriunda da dieta ou proteólise pode ser convertida por transulfuração em selenocisteína ou selenocistationa, a qual por ação de uma liase específica, forma seleneto de hidrogênio. Alguns compostos selenados metilados, como selenobetaína, seleno-metilselenocisteína e dimetilselenóxido, entram diretamente na rota de metabolismo de selênio aumentando o pool da forma inorgânica deste elemento (BIRINGER *et al.*, 2002).

O seleneto de hidrogênio é o intermediário comum para síntese de selenoproteínas e para síntese de produtos metilados para excreção. Uma atividade tiol metiltransferase forma metilselenol e diseleneto de dimetila, o qual é excretado via ventilação, e uma metilação sequencial por tioéter-metiltransferase forma o íon trimetilselenonium, excretado na urina. Uma via alternativa para este intermediário é a oxidação à selênio elementar com concomitante geração de ânion superóxido (YAN *et al.*, 1993).

Na via biossintética, seleneto de hidrogênio é ativado por conversão a selenofosfato, utilizado na síntese de aminoácidos selenados - especialmente selenocisteína

- finalmente incorporados em selenoproteínas durante a tradução por um tRNA especialmente modificado (BIRINGER *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Metabolismo do selênio em mamíferos (Adaptado de GANTHER & LAWRENCE, 1997).



### 1.6 Compostos orgânicos de selênio

Embora os compostos inorgânicos de selênio venham se destacando pelas suas promissoras propriedades antitumorais (DRAKE, 2006), as formas orgânicas deste elemento apresentam uma menor toxicidade, comparando com as formas inorgânicas, sendo também amplamente estudadas.

O conceito que moléculas contendo selênio são agentes nucleofílicos (e assim antioxidantes) melhores do que os compostos antioxidantes clássicos tem levado ao desenvolvimento de vários compostos organosselenados (MEOTTI *et al.*, 2004). Em adição, compostos orgânicos de selênio têm apresentado atividades biológicas muito interessantes (MORETTO *et al.*, 2005; FUNCHAL *et al.*, 2006).

O Ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona), sintetizado em 1984, foi intensamente estudado na última década (SIES, 1993). É um composto organosselenado não-tóxico, dotado de potente atividade mimética de GPx e portanto um excelente antioxidante, além de possuir ação antiinflamatória, antiaterosclerótica e citoprotetora em diversos modelos biológicos (MÜLLER *et al.*, 1984; MAIORINO *et al.*, 1988; TAKASAGO *et al.*, 1997). Ebselen e seus metabólitos reduzem hidroperóxidos orgânicos protegendo lipoproteínas e membranas, mimetizando assim a atividade da fosfolípídeo hidroperóxido glutathione peroxidase (SCHEWE, 1995).

Entre as drogas antioxidantes, ebselen parece ser o mais promissor devido à baixa toxicidade (PARNHAM & GRAF, 1991), carência de efeitos colaterais, estabilidade metabólica (a qual deve-se a uma série de interconversões cíclicas), metabólitos com ação biológica e múltiplas ações farmacológicas, como detoxificação de peróxidos, inibição de enzimas e modulação de processos de transdução de sinal e interações célula-célula. Além disso, e em vista destas características, o composto apresenta capacidade de reduzir a toxicidade de outros xenobióticos, propriedades cito e tecido-protetoras (principalmente contra estresse oxidativo) e também potencial antiinflamatório com diversos alvos moleculares, como a inibição de lipoxigenases, NO sintase, NADPH oxidase, proteína quinase C entre outras (SCHEWE, 1995).

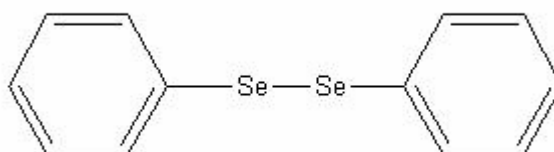
Evidências de atividade neuroprotetora para este poderoso antioxidante selenado também são extensas na literatura, principalmente em pacientes com aneurisma cerebral hemorrágico subaracnóideo, isquemia cerebral e Doença de Parkinson (SCHEWE, 1995;

SAITO *et al.*, 1998; YAMAGUCHI *et al.*, 1998; DAIBER *et al.*, 2000; PORCIÚNCULA *et al.*, 2001; ROSSATO *et al.*, 2002).

Após a descoberta de ebselen, uma série de outras estruturas organosselenadas candidatas a mímicos de GPx foi estudada, incluindo análogos de ebselen, benzoselenazolinonas, selenamidas e derivadas, disselenetos de diarila, vários disselenetos imidazólicos modificados e a enzima sintética selenosubtilisina. Até o momento, nenhuma nova estrutura conseguiu superar as qualidades e vantagens do ebselen (MUGESH *et al.*, 2001b).

Entretanto, o ebselen é uma molécula complexa e, conseqüentemente, sintetizada com alto custo. Já os disselenetos, que apresentam algumas características químicas e bioquímicas em comum com o ebselen, são estruturas mais simples, sintetizadas com maior facilidade e menor custo. Com isso, vários disselenetos começaram a ser sintetizados e estudados quanto às suas atividades biológicas (ROSSATO *et al.*, 2002; MEOTTI *et al.*, 2004).

O Disseleneto de Difenila [DPDS, (PhSe)<sub>2</sub>] é um composto selenado simples e extremamente estável (Figura 3), constituindo-se em um importante intermediário em reações de síntese orgânica, em especial de drogas contendo selênio. Dessa forma, esta molécula representa um risco ocupacional potencial para trabalhadores da indústria sintética (PAULMIER *et al.*, 1986; BRAGA *et al.*, 1997). Entretanto, o DPDS, que começou a ser estudado pelos seus possíveis efeitos tóxicos, vem se destacando pelas suas interessantes propriedades biológicas.



**Figura 2.** Disseleneto de difenila (DPDS)

Estudos prévios demonstraram que DPDS causa mínima toxicidade em roedores quando administrado nas mesmas doses em que exerce atividade antiinflamatória e antinociceptiva (NOGUEIRA *et al.*, 2003c, 2004; ZASSO *et al.*, 2005) e a pré-

administração de DPDS facilita a memória de longa duração na tarefa de reconhecimento de objeto em camundongos (ROSA *et al.*, 2003). Além disso, DPDS foi neuroprotetor em modelos de isquemia *in vitro* (GHISLENI *et al.*, 2003; PORCIÚNCULA *et al.*, 2003), protegeu contra o dano induzido por 2-nitropropano em fígado de ratos (BORGES *et al.*, 2005) e preveniu a hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto de células cerebrais de ratos jovens induzida pelos agentes neurotóxicos difenil ditelureto e metilmercúrio (MORETTO *et al.*, 2005; FUNCHAL *et al.*, 2006). Apesar deste disseleneto possuir interessantes atividades biológicas e neuroprotetoras, o DPDS também tem apresentado efeitos tóxicos em vários modelos experimentais.

DPDS é um potente inibidor da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D, rica em grupamentos sulfidríla e envolvida na síntese do grupamento heme) hepática, renal e cerebral de camundongos e ratos e sanguínea de humanos (BECHARA *et al.*, 1993; BARBOSA *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2003a). Esta inibição seria devida a oxidação dos grupamentos sulfidríla da enzima provocada pelo disseleneto. Com a inibição desta enzima, ocorre um impedimento na biossíntese do grupamento heme e, conseqüentemente, um acúmulo de aminolevulinato. Este, por sua vez, reage com proteínas celulares acarretando na produção de ERO. Outro estudo também mostrou que a reação entre o disseleneto de difenila e peróxido de hidrogênio conduzia à formação de ácido selenínico, composto mais tóxico que o DPDS, que também inibiu a ALA-D do fígado de ratos (FARINA *et al.*, 2002).

Em 2001, JACQUES-SILVA e colaboradores mostraram que o ácido ascórbico é capaz de reverter a deposição de selênio no cérebro de ratos tratados com DPDS, entretanto não era capaz de reverter a inibição de ALA-D. NOGUEIRA e colaboradores, em 2001, demonstraram que DPDS aumenta a atividade da adenilato ciclase e inibia a ligação de glutamato e MK-801 a membranas sinápticas de ratos, mostrando que este organosselenado é capaz de modificar a funcionalidade do sistema glutamatérgico *in vivo* e *in vitro*. DPDS também inibiu o influxo de cálcio em sinaptossomas cerebrais, provavelmente através da interação com grupamentos sulfidríla presentes na estrutura do canal de cálcio voltagem-dependente envolvido nesse processo (MORETTO *et al.*, 2003).

A neurotoxicidade potencial desse composto foi evidenciada por meio de episódios convulsivos em ratos e camundongos, os quais foram dependentes da via de administração da droga e, portanto, da metabolização (NOGUEIRA *et al.*, 2003b). Neste estudo, a DL<sub>50</sub>

do DPDS foi de 210  $\mu\text{mol/Kg}$  para os camundongos que receberam injeção via intraperitoneal e acima de 500  $\mu\text{mol/Kg}$  quando a via utilizada foi a subcutânea. Este mesmo grupo de pesquisadores também sugere que as propriedades toxicológicas destes organosselenados no cérebro podem estar relacionadas, pelo menos em parte, à inibição de sistemas de neurotransmissores excitatórios fisiológicos (NOGUEIRA *et al.*, 2001). A toxicidade renal e hepática também depende, principalmente, da via de administração testada, sendo a via subcutânea a menos danosa (MEOTTI *et al.*, 2003).

Similarmente aos compostos clássicos envolvidos em reações de oxi-redução, o DPDS apresenta tanto atividades pró como antioxidantes, sendo que tais efeitos dependem da dosagem e do modelo experimental utilizado. DPDS reduz a geração de ERO em homogenados de cérebro de camundongos e ratos, por redução da peroxidação lipídica (ROSSATO *et al.*, 2002; MEOTTI *et al.*, 2004). Entretanto, a atividade “glutathione peroxidase-like” ensaiada pela oxidação de grupamentos sulfidríla durante a redução do peróxido de hidrogênio é muito baixa (MUGESH *et al.*, 2001b). NOGUEIRA e colaboradores, em 2004, citaram que o DPDS, como outros organodisselenados, tem a capacidade de decompor peróxido de hidrogênio ou uma variedade de hidroperóxidos lipídicos à água ou aos seus álcoois equivalentes usando GSH ou outros tióis reduzidos sintéticos como doadores de elétrons (NOGUEIRA *et al.*, 2004). Entretanto, como citado anteriormente, DPDS inibe a ALA-D por meio de sua ação pró-oxidante sobre os grupamentos sulfidríla da enzima (NOGUEIRA *et al.*, 2003a).

Além disso, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e glutathione peroxidase, tratadas com DPDS, foram mais sensíveis a agentes oxidantes do que aquelas que não foram tratadas com o disseleneto. Ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que esse efeito pró-oxidante seria devido à capacidade do DPDS em diminuir o conteúdo de GSH celular por interagir não-enzimaticamente com o grupamento tiol da glutathione, provavelmente através da formação de adutos (ROSA *et al.*, 2005). Esta atividade pró-oxidante também foi encontrada em ensaios de antimutagenicidade em *Salmonella typhimurium*, onde o pré-tratamento da linhagem que detecta danos oxidativos com DPDS aumentou a mutagenicidade induzida por peróxido de hidrogênio (ROSA *et al.*, 2004).

Já os estudos que avaliaram o potencial mutagênico de DPDS em *Salmonella typhimurium* e *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que este composto, somente quando é

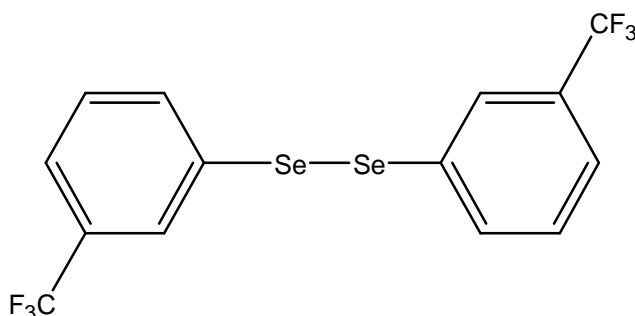
adicionado durante o crescimento, induz mutações do tipo “frameshift” e aumentou a frequência de “crossingover” e conversão gênica e, que tais efeitos seriam devido à sua capacidade de se intercalar entre os pares de bases do DNA e/ou pela sua ação pró-oxidante (ROSA *et al.*, 2004).

Além do DPDS, outros compostos organoselenados também apresentam interessantes efeitos mutagênicos ou antimutagênicos. Em ensaios que avaliaram a síntese não programada de DNA em fibroblastos humanos, os compostos orgânicos de selênio selenometionina e selenocistamina, diferentemente de alguns compostos inorgânicos deste elemento, não induziram síntese de DNA neste sistema, tanto na presença quanto na ausência de glutathione. Com estas observações, WHITING *et al.* (1980) propôs que a redução esteja envolvida na conversão de compostos selenados para as suas formas mutagênicas. A forma mutagênica de compostos inorgânicos seria selenol (GS-Se) e R-Se para compostos orgânicos, após a reação com glutathione (WHITING *et al.*, 1980). Estes pesquisadores explicaram que os danos ao DNA pela geração de radicais livres durante a reação entre compostos selenados inorgânicos e glutathione e pela formação de selenol entre outros metabólitos seriam responsáveis pelas lesões genotóxicas (WHITING *et al.*, 1980). Já em ensaios com a linhagem D7 de *Saccharomyces cerevisiae*, a selenometionina foi mutagênica, em âmbito de mutação reversa e conversão gênica, e antimutagênica, contra os efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio, em função da dose testada, sendo o efeito mutagênico novamente observado em doses altas (ANJARIA & MADHAVANATH, 2000). Os numerosos relatos das atividades mutagênicas e antimutagênicas do selênio e seus derivados, em diversos modelos biológicos, conduzem a dois fatores determinantes: a concentração e a forma química portadora de selênio (SHAMBERGER, 1970; SHAMBERGER *et al.*, 1973; RAY *et al.*, 1978; STAHL *et al.*, 1984).

### 1.7 Objeto de estudo: 3’3-ditrifluormetildifenil disseleneto

3’3-ditrifluormetildifenil disseleneto [DFDD, (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] (Figura 3) é um composto orgânico de selênio que possui um peso molecular de 448 g e uma estrutura química similar ao DPDS (PhSe)<sub>2</sub>. No entanto, diferentemente do seu análogo DPDS, este composto tem sido pouco estudado. NOGUEIRA e colaboradores, em 2003, fizeram um estudo comparativo entre vários organoselenados e demonstraram que DFDD reagiu de

maneira diferente ao DPDS, não induzindo episódios convulsivos em camundongos. Além disso, a DL<sub>50</sub> do DFDD em camundongos (administração via intraperitoneal) foi superior à 500 µmol/Kg, enquanto o DPDS apresentou uma DL<sub>50</sub> de 210 µmol/Kg. Os autores atribuíram tal efeito aos dois grupamentos CF<sub>3</sub> presentes em DFDD e ausentes em DPDS (NOGUEIRA *et al.*, 2003b). Esses resultados corroboram outro estudo que comparou os efeitos do DFDD e DPDS na proteção contra a lipoperoxidação em células cerebrais de camundongos e ratos, onde somente o composto DPDS demonstrou uma potente ação antioxidante (MEOTTI *et al.*, 2004).



**Figura 3.** 3,3'-ditrifluormetildifenil disseleneto (DFDD)

## 2. Estratégias experimentais utilizadas nesse estudo

### 2.1 Avaliação das atividades neurocomportamentais em camundongos

#### 2.1.1 Estudo de memórias de curta e de longa duração

A memória é um processo dinâmico que pode ser dividido em três etapas principais: (1) aquisição da informação; (2) consolidação e armazenamento, que é o processo de filtração e fixação progressiva da informação inicialmente adquirida e (3) evocação (“retrieval”), processo de resgate ou expressão dos eventos consolidados (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; CAHILL *et al.*, 2001). A consequência dos três processos envolvidos na memória seria a aprendizagem (aquisição de novas memórias) e formação de um novo comportamento, ou modificação de um pré-existente. Pode-se definir memória como a conservação e evocação de informações

adquiridas através de experiências vividas (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000). Os indivíduos apresentam capacidade de adaptação e modificação de seu comportamento quando expostos a novas experiências e a capacidade de recordar eventos depende de modificações induzidas no sistema nervoso pela percepção destes eventos (IZQUIERDO, 1989; THOMPSON & KIM, 1996; MARKOWITSCH, 1997).

A capacidade de adquirir novas informações é uma das mais importantes funções do sistema nervoso e a expressão de memórias previamente adquiridas é crucial para a evolução das espécies (MCGAUGH, 2000). Evidências clínicas e experimentais há muito demonstram que as memórias não consistem em um processo único, variando, por exemplo, em conteúdo e duração (MCGAUGH & IZQUIERDO, 2000). De acordo com seu conteúdo, as memórias são classificadas em declarativas ou explícitas (são conscientemente adquiridas e evocadas, podendo variar amplamente em sua duração) e procedurais ou implícitas (são adquiridas gradativamente e uma vez estabelecidas são evocadas de maneira inconsciente e constituem traços duradouros) (THOMPSON & KIM, 1996; MARKOWITSCH, 1997). De acordo com o tempo durante o qual são armazenadas, as memórias também podem ser divididas em dois tipos principais: memórias de curta duração (“Short-term memory” – STM) e memória de longa duração (“Long-term memory” – LTM). As STM são aquelas retidas dentro de alguns segundos até algumas horas após o aprendizado e as LTM são aquelas cuja consolidação é mais demorada e persistem dias, anos ou mesmo uma vida inteira (IZQUIERDO *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 1999; BIANCHIN *et al.*, 1999; ROSA *et al.*, 2003).

Acredita-se que o substrato neural das memórias, tanto de curta quanto de longa duração, reside em alterações nas conexões sinápticas entre neurônios de regiões cerebrais específicas e a natureza de tais modificações induzidas pela aquisição de novas memórias tem atraído muita atenção nas últimas décadas (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; ROESLER *et al.*, 2000). Estudos dos mecanismos neurais das LTM demonstram que sua formação é um processo gradual que envolve substratos neuroanatômicos, celulares e moleculares específicos. LTM não são imediatamente adquiridas sob sua forma estável, sendo necessário serem consolidadas. Durante o período que se segue à sessão de aprendizado, enquanto as LTM são consolidadas, as STM são funcionais (GOELET *et al.*, 1986; IZQUIERDO *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 1999; PICADA, 2003). Estudos utilizando tratamentos farmacológicos específicos capazes de cancelar a formação de STM

sem afetar a LTM para a tarefa de esquiva inibitória, demonstraram que memórias de curta e de longa duração são processadas em paralelo, compartilhando estruturas cerebrais e mecanismos celulares, porém de maneira independente (IZQUIERDO *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 1999; IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000). Além disso, as memórias de longa duração podem ser divididas em associativas e não associativas, dependendo do mecanismo requerido para a sua formação. As memórias associativas são baseadas na aquisição prévia de uma associação entre um evento específico e um estímulo. A tarefa de esquiva inibitória é um exemplo de aprendizado associativo (IZQUIERDO *et al.*, 1997; ROESLER *et al.*, 1999). Já as memórias não associativas são adquiridas quando a exposição repetida ou contínua a um novo estímulo modifica o comportamento inicial (VIANNA *et al.*, 2000). Uma das mais elementares tarefas de aprendizagem não associativa e não aversiva é a da habituação a um novo ambiente.

### 2.1.1.1 Esquiva Inibitória

Na tarefa de esquiva inibitória (EI), o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas (IZQUIERDO, 1989; ROESLER *et al.*, 1998, ROESLER *et al.*, 2000). Com isso, numa segunda exposição à caixa de esquiva inibitória, ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa. O aprendizado de EI, que é associativo, envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade à dor, acompanhados de um componente emocional amplamente modulado pela amígdala e por hormônios relacionados ao estresse (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; WALZ *et al.*, 2000). A EI é uma tarefa ideal para estudar processos de memórias iniciados durante e após o treino pois (1) em geral pode ser aprendida com uma única sessão de treino; (2) não é um aprendizado inato; (3) a farmacologia envolvida na sua modulação é bastante conhecida.

O método principal do estudo consiste em administrar uma substância minutos antes da sessão treino ou logo após essa, na qual o animal é colocado sobre uma plataforma e o tempo de permanência (latência) é contado até que ele desça com todas as 4 patas a uma grade onde ele recebe o choque. Nas sessões de teste, o animal é recolocado na plataforma, porém não recebe o choque, sendo que o tempo de latência em que o animal permanece na plataforma é cronometrado e usado como medida de retenção (ROESLER *et*



*al.*, 1998; 1999; 2000). A primeira sessão teste ocorre 1,5 h após o treino, a fim de medir a STM, e a segunda 24 - 48 h após o treino, para medir a LTM. A retenção (memória) de curta e de longa duração da tarefa de EI pode ser prejudicada ou melhorada pela substância administrada; os efeitos observados nos dois tipos de memória são independentes, portanto, uma substância pode bloquear uma das memórias sem afetar a outra ou ainda apresentar efeitos de melhora numa e prejuízo na outra (IZQUIERDO *et al.*, 1999; IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000).

### 2.1.1.2 Habituação a um novo ambiente

A tarefa de habituação a um novo ambiente, que é um exemplo de aprendizagem não associativa e não aversiva, também tem a capacidade de avaliar a locomoção, exploração, motivação e ansiedade dos animais (ROESLER *et al.*, 1998). Este teste consiste em colocar os animais em um campo aberto, um compartimento semelhante a uma caixa de madeira (50 X 50 X 30 cm), com uma parede de vidro frontal, e com o piso marrom dividido com linhas pretas em 12 quadrados iguais. O animal é observado durante 5 min nos quais ele pode explorar livremente a caixa. Neste período, o número de cruzamentos das linhas pretas (“crossings”), o número de vezes em que o animal levanta as duas patas dianteiras (“rearings”), o tempo de latência para o início da locomoção e o número de bolos fecais são contados durante os 5 min. Estas contagens são utilizadas como medida de locomoção, exploração, motivação e ansiedade (ROESLER *et al.*, 1998; 1999a, 2000). A habituação é medida pela diminuição da atitude exploratória que está associada ao número de “crossings” e “rearings” numa sessão teste realizada 24 h após a primeira exposição ao campo aberto (sessão treino) (VIANNA *et al.*, 2000).

### 2.1.2. Estudo do comportamento estereotipado

O comportamento estereotipado é descrito como um comportamento no qual um indivíduo exibe atividade motora repetitiva, rítmica e invariável, e sem uma finalidade ou propósito real. Geralmente as informações sobre a base neurobiológica do comportamento estereotipado são obtidas pelo estudo em modelos animais do comportamento induzido por fármacos ou associado a um determinado ambiente (POWELL *et al.*, 1999; PRESTI *et al.*,

2002). Este comportamento pode ser induzido em diversas espécies de mamíferos pela administração de agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina (APO), e fármacos que indiretamente afetam a transição dopaminérgica, como anfetamina. Uma injeção direta de dopamina ou de um agonista dopaminérgico no estriado induz comportamento estereotipado em ratos. Este comportamento pode ser inibido por antagonistas dopaminérgicos, como o haloperidol, ou pela inibição da síntese de dopamina, usando  $\alpha$ -metil-p-tirosina, ou ainda pela destruição de neurônios que contém dopamina com a neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (POWELL *et al.*, 1999; PRESTI *et al.*, 2002). Em humanos, o comportamento estereotipado ocorre em distúrbios neurológicos e psiquiátricos como a esquizofrenia e na compulsão obsessiva, na Doença de Parkinson, no autismo, entre outras, e está tipicamente associado ao aumento na atividade dopaminérgica (GOLDMAN *et al.*, 1998).

Este comportamento pode ser estudado em modelos que utilizam camundongos, no qual é definido por movimentos rápidos e repetitivos da cabeça e/ou membros dianteiros, que persistem por no mínimo 30 s, dentro de um período de um minuto de observação (HITRI *et al.*, 1993; RIDLEY, 1994; BATTISTI *et al.*, 2000; MELLER *et al.*, 2004). Geralmente, o animal é colocado numa caixa, após a administração de uma substância, e observado durante 1 min., com intervalos de 10 min entre cada observação.

### 2.2 Avaliação da atividade genotóxica

Os testes de genotoxicidade detectam efeitos de substâncias tóxicas para o genoma. Os mais utilizados são aqueles que detectam mutações em células germinativas ou somáticas, por exemplo, mutação gênica, associada a alterações na sequência de nucleotídeos do DNA, ou ao nível cromossômico, como aberrações cromossômicas e micronúcleos (WATERS *et al.*, 1999; MACGREGOR *et al.*, 2000; DEARFIELD *et al.*, 2002).

Os métodos que são mais amplamente empregados para a detecção de mutações são aqueles que utilizam as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (DEARFIELD *et al.*, 2002). Para se obter dados sobre mutações em eucariotos empregam-se testes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em células de mamíferos, em *Drosophila sp.*, ou mesmo mutações somáticas em camundongos. Para a detecção de

mutações cromossômicas, os testes mais utilizados incluem aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que estes testes exigem que a célula esteja em estado proliferativo (TICE *et al.*, 1988; MCGREGOR *et al.*, 2000).

Recentemente o teste alcalino eletroforético de célula única ou Ensaio Cometa, que detecta quebras no DNA de células individuais, também tem sido recomendado para a avaliação de genotoxicidade em eucariotos (SINGH, 2000).

### 2.2.1 Avaliação da genotoxicidade em procariotos – Teste *Salmonella*/microsoma

O teste *Salmonella*/microsoma, desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70 (AMES *et al.*, 1975; AMES, 1979) é um ensaio bacteriano de curta duração que busca identificar substâncias causadoras de danos genéticos que possam levar a mutações (para revisão, ver MARON & AMES, 1983 E MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Este ensaio baseia-se na indução de mutações reversas em linhagens de *Salmonella typhimurium*, auxotróficas para o aminoácido histidina e que conduzem as mesmas à prototrofia. O teste usa linhagens de *Salmonella typhimurium* com mutações pré-existentes onde a bactéria fica impossibilitada de sintetizar o aminoácido histidina e não forma colônias na sua ausência no meio de cultura. Observa-se porém que novas mutações nos sítios das mutações pré-existentes podem restaurar a função do gene para a síntese de histidina e, conseqüentemente, as células mutadas passam a crescer na ausência de histidina formando colônias. Por esta razão este teste é referido como de mutação reversa (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Nas linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella*/microsoma, a resposta aos danos ao DNA é otimizada pela presença do plasmídeo pKM101, o qual permite a síntese translesão de DNA, levando portanto à mutagênese (LEITÃO & ALCÂNTARA GOMES, 1997; BHAMRE *et al.*, 2001). Estas linhagens ainda contam com outras mutações que também auxiliam a identificação de substâncias que lesam o DNA: mutação *rfa*, que torna defectiva a membrana polissacarídica, aumentando a permeabilidade e permitindo a passagem de moléculas maiores na célula; e, deleção dos genes *uvrA/uvrB*, responsáveis pelo sistema de reparação por excisão de nucleotídeos (NER) do DNA, que impede que esta via de reparação esteja

atuante nestas linhagens, possibilitando a fixação das mutações (MARON & AMES, 1983; HENRIQUES *et al.*, 1987; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Cada linhagem é mutada de forma diferente no operon da histidina, o que permite a especificidade na detecção de um determinado tipo de mutágeno: (i) a linhagem TA98 detecta mutágenos que causam erro no quadro de leitura do DNA (“frameshift mutation”) apresentando como ponto preferencial oito resíduos repetitivos GC no operon do gene *his<sub>D3052</sub>* que codifica para enzima histidinol desidrogenase; (ii) a linhagem TA97a apresenta uma seqüência de seis citosinas no sítio de mutação do gene *his<sub>D6610</sub>* e a especificidade mutagênica desta linhagem é similar à da linhagem TA1537, mas sua sensibilidade é muito maior. A TA97a apresenta ainda uma seqüência de pares de bases G-C alternadas próxima à seqüência de citosinas, semelhante ao sítio da mutação *his<sub>D3052</sub>* nas linhagens TA98 e TA1537. Estas seqüências de bases repetitivas representam “hot-spots” para mutágenos que causam erro no quadro de leitura (“frameshift mutation”); (iii) a linhagem TA100 detecta mutágenos que causam substituição de pares de base do DNA, através de uma mutação no gene *his<sub>G46</sub>* que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina. Tem como ponto preferencial para a reversão o par GC, sendo a mutação a substituição de uma prolina por uma leucina; (iv) a linhagem TA102, diferindo das outras linhagens descritas, contém pares de bases AT no sítio mutante *his<sub>G428</sub>*. Esta mutação foi introduzida no plasmídeo multicópia pAQ1, com objetivo de amplificar o número de sítios alvo. A mutação *his<sub>G428</sub>* é uma mutação ocre (TAA) no gene *hisG*, a qual pode ser revertida por todas as seis possibilidades de trocas de pares de bases (transversão/transcrição). Esta mutação também é revertida por agentes que causam danos oxidativos. Como o gene *uvrB* não foi deletado, a bactéria é proficiente no sistema de reparação NER, aumentando assim a sua habilidade para detectar agentes indutores de pontes entre cadeias do DNA (“interstrand DNA cross-linking”) (BARNES *et al.*, 1982; LEVIN *et al.*, 1982a; LEVIN *et al.*, 1982b; MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Em testes com procaríotos, um componente importante é o sistema de indução microsossomal. Este sistema enzimático é extraído de células de fígado de ratos pré-tratados com um indutor enzimático e tem a função de mimetizar o metabolismo de mamíferos, permitindo que também seja avaliada a ação genotóxica dos metabólitos dos agentes testados. A função primária do sistema microsossomal é proteger a célula degradando fisiologicamente substâncias inerentes ao metabolismo celular e desativando substâncias

estranhas à célula. Porém, algumas substâncias (pró-mutágenos) inativas quando em contato direto com a célula, podem gerar metabólitos eletrofílicos que reagem com os centros nucleofílicos do DNA formando adutos (CROSBY, 1998; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

A combinação de testes com presença e ausência de sistema metabólico e linhagens bacterianas sensíveis a diferentes agentes possibilita determinar tanto substâncias com ação genotóxica direta como monitorar a atividade, positiva ou negativa, dos metabólitos gerados pela biotransformação.

### 2.2.2 Avaliação da genotoxicidade em eucariotos

#### 2.2.2.1 Avaliação da mutagênese em *Saccharomyces cerevisiae*.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular do tipo ascomicete, com ciclo eucarioto típico e completo, podendo ser cultivado facilmente em condições adequadas, tanto na fase haplóide como na diplóide. *S. cerevisiae* possui todo seu genoma sequenciado e é geneticamente bem caracterizada, especialmente quanto à sua resposta a agentes causadores de danos ao DNA. Com isso, este organismo eucarioto constitui-se ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (MARIS *et al.*, 2000; MARIS *et al.*, 2001; BOEIRA *et al.*, 2002; PUNGARTNIK *et al.*, 2002).

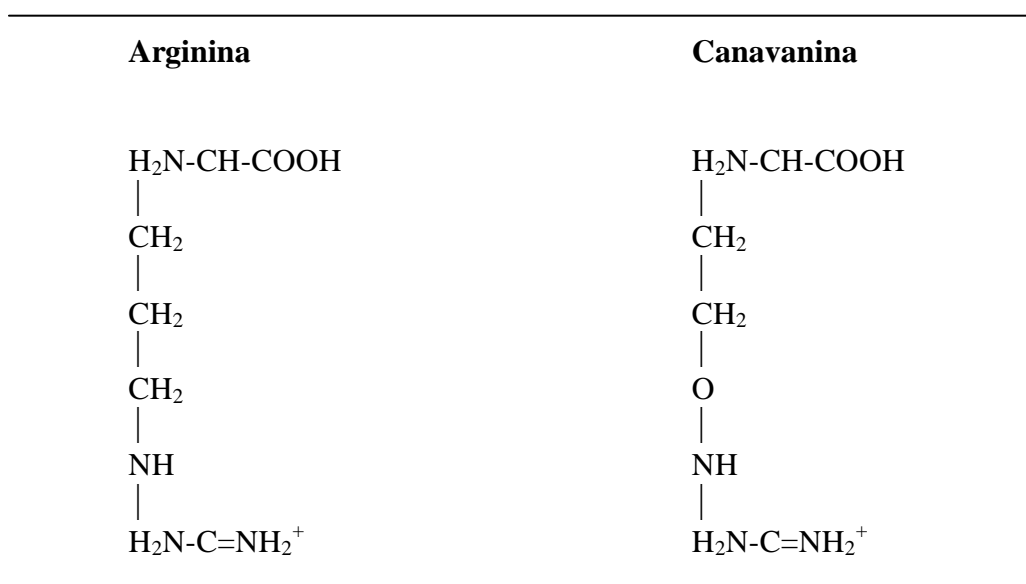
Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (HENRIQUES *et al.*, 1987). Esses ensaios são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação biológica. Além disto, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído por um complexo enzimático (citocromo P-450) e detoxificação, sem a necessidade de adição de um sistema exógeno, sendo, desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (MORENO *et al.*, 1991; PAULA-RAMOS *et al.*, 1991).

Experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Estes se baseiam na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (ZIMMERMANN, 1975; ZIMMERMANN & SCHEEL, 1984).

A restauração se deve à uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido à uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos “nonsense” (HAWTHORNE & LEOPOLD, 1974). Para que seja identificada a mutação reversa é necessário a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV 185-14c (VON BORSTEL *et al.*, 1971). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações locus específicas: reversões do alelo ocre *lys1-1* ou do alelo “missense” *his1-7*, e reversões por deslocamento de quadro de leitura do DNA “frameshift” verificadas no locus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um “background” de crescimento.

As mutações gênicas resultantes de um tratamento mutagênico também podem ser facilmente quantificadas usando-se um marcador fenotípico, como por exemplo, a sensibilidade à canavanina. Muitas linhagens selvagens expressam um transportador de arginina chamado *Can1p*. A canavanina é um análogo estrutural tóxico da arginina (Figura 4). O mesmo transportador que internaliza a arginina, faz a importação de canavanina do ambiente levando as células à morte. Neste sentido, mutações no gene *CAN1*, induzidas por drogas mutagênicas, podem tornar as células resistentes aos efeitos tóxicos da canavanina, aumentando a sobrevivência das células em presença de canavanina quando comparadas a tratamentos não mutagênicos (GRENSON *et al.*, 1966; HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980; BRENDDEL & HENRIQUES, 2001).

A linhagem N123 permite a detecção deste tipo de mutação, chamada mutação “forward” ou mutação “para frente” (HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980). As células revertentes podem ser detectadas pelo semeamento em placas contendo meio seletivo na presença de canavanina.



**Figura 4.** Estrutura química dos análogos arginina e canavanina.

#### 2.2.2.2 Avaliação da genotoxicidade em células de mamíferos

Os ensaios em células de mamíferos são frequentemente citados como sendo os mais relevantes para a análise do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (TICE *et al.*, 1994; MÜLLER & SOFUNI, 2000). Os organismos preferidos para análise *in vivo* e *in vitro* são os roedores, devido a uma correlação elevada entre mutações em humanos e roedores (TICE *et al.*, 1994; MACGREGOR *et al.*, 2000).

Células V79, fibroblastos de pulmão de hamster Chinês, correspondem a uma das linhagens de células de mamíferos mais utilizadas em testes citogenéticos de curta duração (BRADLEY *et al.*, 1981). Em geral, o tempo de duplicação destas células é de 12-16 horas, a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Apresentam um cariótipo estável com 22 ± 1 cromossomos (de fácil identificação através de microscópio óptico) e uma baixa frequência de mutações (BRADLEY *et al.*, 1981).

Os ensaios de genotoxicidade, com algumas alterações metodológicas, também podem ser empregados para identificar compostos que estariam envolvidos na proteção do DNA, com uma atividade antígenotóxica (WEISBURGER, 2001). Neste sentido, utilizamos o ensaio cometa para determinar o potencial genotóxico e anti-genotóxico em células de mamífero.

O Ensaio Cometa (EC) ou “single cell gel electrophoresis assay” é utilizado na avaliação da genotoxicidade de novas drogas, no monitoramento de contaminação ambiental por genotoxinas, no biomonitoramento humano e epidemiologia molecular e na pesquisa sobre danos e reparo no DNA (HARTMANN *et al.*, 2003; COLLINS, 2004). O EC é um teste promissor para a detecção de lesões e reparo no DNA de células individuais (HARTMANN & SPEIT, 1995). Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, como: (a) versatilidade em relação ao tipo de célula a ser analisada, sendo que o método já foi adaptado a inúmeros tipos de células, além de ser aplicado a diversos organismos; (b) necessidade de somente um pequeno número de células; e (c) não ser necessário a utilização de células em divisão. Pode ser usado em testes *in vitro* e *in vivo* de indução de danos ao DNA (COLLINS *et al.*, 1997; TICE *et al.*, 2000; SEKIHASHI *et al.*, 2002; VALVERDE *et al.*, 2002). Os danos que são facilmente mensurados pelo teste são quebras no DNA (simples e duplas), danos álcali-lábeis, ligações cruzadas e quebras resultantes de reparo por excisão não concluídas (SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIN *et al.*, 1995; HARTMANN & SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Em testes utilizando animais, é possível avaliar o potencial genotóxico de uma substância em células de órgãos e/ou tecidos alvo específicos (SASAKI *et al.*, 2002), como por exemplo, a atividade genotóxica de uma neurotoxina no cérebro (MORRIS *et al.*, 1999; MARTIN & LIU, 2002).

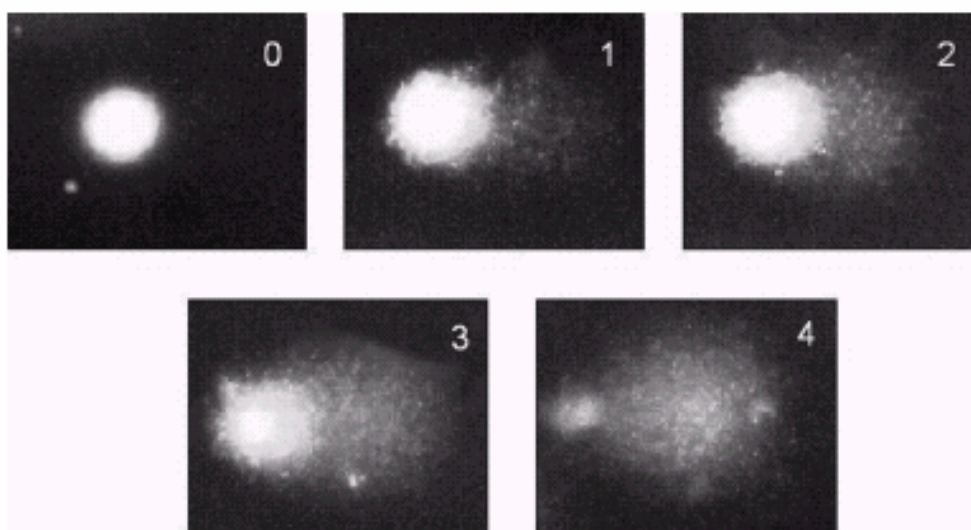
Existem dois tipos de protocolos para a realização do Ensaio Cometa: (a) tratamento neutro, que detecta dupla quebra no DNA; e (b) tratamento alcalino, que detecta simples e dupla quebra e danos álcali-lábeis (FAIRBAIN *et al.*, 1995). Esta técnica tem sido modificada também para detectar adutos no DNA (dímeros de timina, danos oxidativos), usando anticorpos específicos (SAUVAIGO *et al.*, 1998) ou enzimas de reparo do DNA (SPEIT & HARTMANN, 1999).

A técnica consiste em submeter as células, embebidas em gel de agarose sobre uma lâmina, a uma eletroforese que faz migrar pela corrente elétrica os segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível ao DNA. As células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (Figura 5). Estes fragmentos podem se



apresentar em diferentes tamanhos e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (FAIRBAIN *et al.*, 1995).

A identificação do dano pode ser feita por diferentes maneiras, uma forma é medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular micrométrica, outra é classificar visualmente as células com dano em diferentes classes (0-4), podendo obter um valor arbitrário, que expresse o dano geral que uma população de células sofreu (COLLINS *et al.*, 1993, 1997; BOEIRA *et al.*, 2001; HARTMANN *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Visualização da imagem de células “cometa”, onde a cabeça representa o núcleo original e a “cauda” os fragmentos de DNA. As imagens representam as diferentes classes de dano (0 – 4) (COLLINS, 2004).

O crescente interesse e importância do EC levou o desenvolvimento de um analisador de imagens, que serve para quantificar a cromatina que migrou para fora do núcleo. Contudo, o método de classificação visual das células apresenta uma alta correlação com as análises computadorizadas (TICE *et al.*, 2000; HARTMANN *et al.*, 2003; FRANKE *et al.*, 2005).

## II. OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

Tendo em vista as inúmeras atividades biológicas importantes dos compostos orgânicos de selênio, bem como a similaridade do 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto ao interessante composto disseleneto de difenila, pretende-se avaliar as atividades neurocomportamentais do DFDD em camundongos e o potencial genotóxico deste composto organoselenado em *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* e em cultura de células de pulmão de hamster chinês (células V79).

### 2. Objetivos específicos

- Estudar os efeitos do DFDD no Sistema Nervoso Central, analisando principalmente os efeitos sobre a memória, locomoção, exploração, motivação, ansiedade e sobre o comportamento estereotipado em camundongos.
- Avaliar o potencial mutagênico do DFDD em *Salmonella typhimurium*.
- Verificar o efeito antimutagênico do DFDD contra a mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e hidroperóxido de tert-butil (*t*-BOOH) em *Salmonella typhimurium*.
- Avaliar o potencial mutagênico do DFDD em *Saccharomyces cerevisiae*.
- Analisar a genotoxicidade do DFDD em células V79 utilizando o Ensaio Cometa.
- Verificar a ação antigenotóxica do DFDD contra os danos causados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no DNA de células de mamíferos em cultura (linhagem V79), utilizando o Ensaio Cometa.

### **III. CAPÍTULO 1**

## **An organic selenium compound blocks apomorphine- induced stereotypy in mice**

*Submetido à Neuroscience Letters*

An organic selenium compound blocks apomorphine-induced  
stereotypy in mice

Miriana S. Machado<sup>a,\*</sup>, Renato M. Rosa<sup>a</sup>, Andrea S. Dantas<sup>a</sup>, Gustavo K.  
Reolon<sup>a</sup>, Helmóz R. Appelt<sup>b</sup>, Antônio Luiz Braga<sup>b</sup>, João Antonio Pêgas  
Henriques<sup>a,c</sup>, Rafael Roesler<sup>a,d,e</sup>

<sup>a</sup> *Graduate Program in Cellular and Molecular Biology and Center for Biotechnology,  
Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria,  
RS, Brazil*

<sup>c</sup> *School of Pharmacy, Lutheran University of Brazil, 92420-280 Canoas, RS, Brazil*

<sup>d</sup> *Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Department of  
Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do  
Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>e</sup> *Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of  
Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316-6069; fax: +55 51 3316-6084.

*E-mail address:* miriana@cbiot.ufrgs.br (M.S. Machado).

## **Acknowledgements**

This research was supported by GENOTOX Laboratory (J.A.P.H., R.R.), and the South American Office for Anticancer Drug Development (R.R.).

## **Abstract**

Selenium compounds display neuroprotective activities that might be mediated by their antioxidant actions. Oxidative damage has been implicated in psychiatric disorders including schizophrenia, and an alteration in expression of selenium-binding protein-1 (*SELENBP-1*) has been recently reported in both the blood and brain of schizophrenic patients. In the present study we examined the effects of the organic selenium compound 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide ( $(F_3CPhSe)_2$ ) on apomorphine-induced stereotypy in mice, an animal model of schizophrenic psychosis. Systemic administration of  $(F_3CPhSe)_2$  at the highest dose used (25.0  $\mu\text{mol/kg}$  in a 10.0 ml/kg injection volume) significantly reduced apomorphine-induced stereotyped behaviors. A series of control experiments showed that the same dose of  $(F_3CPhSe)_2$  did not affect open field behavior, habituation, or aversively motivated memory. The results indicate that organic selenium compounds should be further investigated as agents with possible antipsychotic properties.

*Keywords:* 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide, Organic selenium compounds; Neuroprotective drugs; Antipsychotic drugs; Stereotyped behaviors; Schizophrenia

Selenium compounds display neuroprotective activities that might be mediated by antioxidant and antiinflammatory actions, inhibition of apoptotic mechanisms, and inhibition of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor-mediated excitotoxicity [12,25]. The organic selenium compound ebselen has been shown to display neuroprotective activities in animal models of ischemic stroke [21, 25, 9], spinal cord injury [11], Parkinson's disease [16], as well as in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage [32] or occlusive cerebral ischaemia [20]. Another organic selenium compound, diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>, has been shown to protect rat hippocampal neurons from damage induced by oxygen-glucose deprivation [6]. In addition, we have previously shown that systemic administration of (PhSe)<sub>2</sub> might induce cognitive enhancement in mice [30].

Oxidative damage has been implicated in the pathogenesis of schizophrenia, and the development of novel therapeutic strategies based on antioxidant compounds has been proposed [33, 38]. A recent seminal study evaluating gene expression in the blood and brain of patients with schizophrenia has shown that expression of selenium-binding protein-1 (*SELENBP-1*) was significantly up-regulated in schizophrenia, and *SELENBP-1* was the strongest candidate schizophrenia biomarker revealed in that study [7]. Thus, the evidence reviewed above indicates that selenium compounds should be investigated as potential novel therapeutic agents in schizophrenia.

Animal models of schizophrenic psychosis used in preclinical testing of novel agents with possible antipsychotic activity include stereotyped behaviors induced by amphetamine or the non-selective dopamine receptor agonist apomorphine in rodents [4, 26, 28]. In the present study we verified whether the organic selenium compound 3'-trifluoromethyldiphenyl diselenide [(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] antagonizes apomorphine-induced

stereotypy in mice. (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> is structurally related to (PhSe)<sub>2</sub> but lacks its proconvulsant activity when injected in mice [18]. Additional experiments were carried out to examine the effects of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> on memory and open field behavior.

Adult male CF-1 mice (25-30 g) obtained from the State Health Research Foundation (FEPPS-RS) were housed five to a cage and maintained on a 12-h light/dark cycle with food and water available *ad libitum*. Behavioral procedures were conducted during the light phase of the cycle between 9:00 and 17:00. Different animals were used for the different behavioral tests used. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23 revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> was synthesized as previously described [22, 5, 2] and dissolved in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in saline (0.9% NaCl). Thirty minutes prior to the behavioral procedures, animals were given an intraperitoneal (i.p.) injection of vehicle (10% DMSO in saline) or (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> (1.0, 5.0, and 25.0 µmol/kg in an injection volume of 10.0 ml/kg body weight). All solutions were prepared immediately before injections.

For the first experiment (antagonism of apomorphine-induced stereotypy), mice were given an injection of vehicle or (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> followed by a 10 ml/kg i.p. injection of vehicle or apomorphine (20.0 mg/kg) dissolved in vehicle 30 min later. Immediately after drug injections, mice were placed three per cage and evaluated for stereotyped behavior as described in a previous report [14]. Animals were observed for 1 min at 10-min intervals during one hour. Stereotypy was defined as rapid, repetitive head and forelimb movements. Behaviors scored were sniffing, grooming, head-bobbing, nail biting, and circling.



In order to control for general effects of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> on behavior, an open field behavior test was carried out as described in previous reports [29, 27]. The open field was a 50 X 25-cm arena, surrounded by 50-cm high walls, made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Mice were put in the apparatus, placed on its left rear quadrant, and left to freely explore the arena for 5 min. Crossings of the black lines, rearings performed, latency to start locomotion, and the number of fecal pellets were counted. The number of crossings and rearings were used respectively as measures of locomotor activity and exploratory behavior, whereas the latency to start locomotion and the number of fecal pellets were used as measures of anxiety.

Twenty-four h after the first open field exploration session, mice were placed again in the open field and tested for habituation. Habituation to an open-field is a model of non-emotional, non-associative memory [36]. Crossings of the black lines and rearings performed in both sessions were counted. The decrease in the number of crossings and rearings between the two sessions was taken as a measure of habituation, as previously described [23, 13].

Inhibitory avoidance in rodents is a widely used animal model of aversively motivated conditioning [10]. The step-down inhibitory avoidance apparatus and procedures were described in previous studies [29, 27]. The inhibitory avoidance training box was a 50 X 25 X 25 cm acrylic box whose floor consisted of parallel stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 10-cm<sup>2</sup> wide, 2-cm high platform was placed on the center of the floor. Animals were placed on the platform and their latency to step-down on the grid with all four paws was recorded with an automated device. In the training trial, immediately after stepping down on the grid, animals were given a 0.4 mA, 2.0 s

footshock. In retention test sessions, carried out 1.5 h (short-term memory retention) and 24 h (long-term memory retention) after training, no footshocks were given and a ceiling of 180 s was imposed in the step-down latency. Different mice were used for short- and long-term memory measurements. Differences between retention test and training trial step-down latencies were used as memory retention scores.

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Differences among groups were analyzed with a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by LSD post-hoc tests when necessary. In all comparisons,  $p \leq 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

Results for apomorphine-induced stereotypy are shown in Fig. 1. Systemic administration of 25.0  $\mu\text{mol/kg}$  ( $\text{F}_3\text{CPhSe}$ )<sub>2</sub> significantly attenuated apomorphine-induced stereotypy (Fig. 1A and Fig. 1B). Animals given ( $\text{F}_3\text{CPhSe}$ )<sub>2</sub> alone showed no stereotypy (data not shown). Administration of ( $\text{F}_3\text{CPhSe}$ )<sub>2</sub> did not affect other aspects of behavior (Table 1). There were no significant differences among groups in the number of crossings or rearings performed, latency to start locomotion, or number of fecal pellets produced during open field exploration, indicating that ( $\text{F}_3\text{CPhSe}$ )<sub>2</sub> did not affect locomotion, exploratory behavior, motivation, or anxiety. In the habituation test, there was no significant difference among groups in the number of rearings performed in the 24-h habituation test session. Neither short-term inhibitory avoidance retention tested 1.5 h after training nor long-term retention tested 24-h after training were affected by ( $\text{F}_3\text{CPhSe}$ )<sub>2</sub>. There were no significant differences among groups in training trial performance, 1.5-h retention, or 24-h retention. Together, the results indicate that systemic administration of ( $\text{F}_3\text{CPhSe}$ )<sub>2</sub> in mice significantly attenuated apomorphine-induced stereotypy at a dose that did not affect locomotion, exploration, anxiety, nonassociative learning, or aversive conditioning.

Previous studies have indicated that organoselenium compounds might display a range of neuroprotective activities, although they might also induce neurotoxic effects under certain experimental conditions [18, 19]. Organoselenium compounds such as ebselen have shown promising neuroprotective effects in animal models of acute brain injury and neurodegenerative disorders [16, 21, 25, 9, 11], as well as on human studies of ischaemia and aneurismal subarachnoid hemorrhage [32, 20]. In addition, the organoselenium compound (PhSe)<sub>2</sub> has been previously shown to display neuroprotective actions in vitro [6] and cognitive-enhancing properties in mice [30]. [(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] is a compound structurally related to (PhSe)<sub>2</sub> [18]. The actions of organoselenium compounds on the central nervous system might be related to their antioxidant properties [3, 1, 8, 15].

The data reviewed above indicates that organoselenium compounds might have therapeutic effects in a range of acute and chronic neurological and psychiatric disorders involving oxidative damage to the brain. Oxidative reactions have been proposed to play a role in schizophrenic disorders [33, 38]. In addition, recent evidence suggests that the selenium binding protein *SELENBP-1* might be an important schizophrenia biomarker. However, previous studies have not proposed a possible role for organoselenium compounds in the treatment of schizophrenia. Our results indicate that systemic administration of the organoselenium compound [(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] attenuated behavioral features associated with a mouse model of schizophrenic psychosis at a dose that did not affect other behavioral parameters. This finding suggests that organoselenium compounds should be further investigated in other animal models as candidate antipsychotic drugs.

**References**

- [1] G. Anderson, R. Brattsand, A. Hallberg, Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems, *Free Rad. Res.* 20 (1994) 401-410.
- [2] A.L. Braga, G. Zeni, L.H. Andrade, C.C. Silveira, H.A. Stefani, Stereospecific formation of chalcogens via palladium catalysed cross-coupling reaction of  $\alpha$ -bromovinyl chalcogens, *Synthesis* 1 (1998) 39-41.
- [3] R.F. Burk, J.M. Lane, Modification of chemical toxicity by selenium deficiency, *Fund. Appl. Toxicol.* 3 (1983) 218-221.
- [4] B.A. Ellenbroek, A.R. Cools, Apomorphine susceptibility and animal models for psychopathology: genes and environment. *Behav. Genet.* 32(2002) 349-61.
- [5] L. Engman, Expedient synthesis of Ebselen and related compounds, *J. Org. Chem.* 54 (1989) 2964-2966.
- [6] G. Ghisleni, L.O. Porciúncula, H. Cimarosti, J.B.T. Rocha, C.G. Salbego, D.O. Souza, Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immuncontent, *Brain Res.* 986 (2003)196-199.
- [7] S.J. Glatt, I.P. Everall, W.S. Kremen, J. Corbeil, R. Sasik, N. Khanlou, M. Han, C.C. Liew, M.T. Tsuang, Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (2005)15533-15538.
- [8] A.R. Green, T. Ashwood, Free radical trapping as a therapeutic approach to neuroprotection in stroke: experimental and clinical studies with NXY-059 and free radical scavengers, *Curr. Drug Targets* 4 (2005)109-18.
- [9] H. Imai, D.I. Graham, H. Masayasu, I.M. Macrae, Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 56-63.

- [10] I. Izquierdo, J.H. Medina, Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures, *Neurobiol. Learn Mem.* 68 (1997) 285-316.
- [11] M. Kalayci, O. Coskun, F. Cagavi, M. Kanter, F. Armutcu, S. Gul, B. Acikgoz, Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats, *Neurochem. Res.* 30 (2005) 403-410.
- [12] E.N. Maciel, R.C. Bolzan, A.L. Braga, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of mice, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14 (2000) 310-319.
- [13] M.R. Martins, A. Reinke, S.S. Valvassori, R.A. Machado, J. Quevedo, G. Schwartsmann, R. Roesler, Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095, *Peptides* 26 (2005) 2525-2529.
- [14] C.A. Meller, J.A. Henriques, G. Schwartsmann, R. Roesler, The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice, *Peptides* 25(2004) 585-588.
- [15] M.B. Moretto, C. Funchal, G. Zeni, J.B.T. Rocha, R. Pessoa-Pureur, Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats, *Toxicology* 210 (2005) 213-222.
- [16] S. Moussaoui, M.C. Obinu, N. Daniel, M. Reibaud, V. Blanchard, A. Imperato, The antioxidant ebselen prevents neurotoxicity and clinical symptoms in a primate model of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* 166 (2000) 235-245.
- [17] A. Müller, E. Cadenas, P. Graf, H. Sies, A novel biologically active seleno-organic compound I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen), *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 3235-3239.

- [18] 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.
- [19] C.W. Nogueira, L.N. Rotta, M.L. Perry, D.O. Souza, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo, *Brain Res*. 906 (2001) 157-163.
- [20] A. Ogawa, T. Yoshimoto, H. Kikuchi, K. Sano, I. Saito, T. Yamaguchi, H. Yasuhara, Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial, *Cerebrovasc. Dis.* 9 (1999) 112-118.
- [21] M. Parnham, H. Sies, Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia, *Expert Opin. Investig. Drugs* 9 (2000) 607-619.
- [22] C. Paulmier, Selenoorganic functional groups, In Paulmier, C., (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, First ed. Pergamon Press, Oxford, England (1986) pp. 25-51.
- [23] J.N. Picada, N. Schroder, I. Izquierdo, J.A. Henriques, R. Roesler, Differential neurobehavioral deficits induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 443 (2002) 105-111.
- [24] L.O. Porciúncula, J.B.T. da Rocha, C.R. Boeck, D. Vendite, D.O. Souza, Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons, *Neurosci. Lett.* 299 (2001) 217-220.
- [25] L.O. Porciúncula, J.B. Rocha, H. Cimarosti, L. Vinade, G. Ghisleni, C.G. Salbego, D.O. Souza, Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immuncontent of inducible nitric oxide synthase, *Neurosci. Lett.* 346 (2003) 101-104.
- [26] A. Randrup, I. Munkvad, Pharmacology and physiology of stereotyped behavior, *J. Psychiatr. Res.* 11 (1974) 1-10.

- [27] G.K. Reolon, L.M. Braga, M. Camassola, T. Luft, J.A. Henriques, N.B. Nardi, R. Roesler, Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua(-/-)* mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I, *Brain Res.* 1076 (2006) 225-230.
- [28] R.M. Ridley, The psychology of perseverative and stereotyped behaviour, *Prog. Neurobiol.* 44 (1994) 221-231.
- [29] R. Roesler, R. Walz, J. Quevedo, F. de-Paris, S.M. Zanata, E. Graner, I. Izquierdo, V.R. Martins, R.R. Brentani, Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C), *Mol. Brain Res.* 71 (1999) 349-353.
- [30] 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.
- [31] J.I. Rossato, L.A. Ketzer, F.B. Centuriao, S.J. Silva, D.S. Ludtke, G. Zeni, A.L. Braga, M.A. Rubin, J.B. Rocha, Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain, *Neurochem. Res.* 27 (2002) 297-303.
- [32] I. Saito, T. Asano, K. Sano, K. Takakura, H. Abe, T. Yoshimoto, H. Kikuchi, T. Ohta, S. Ishibashi, Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *Neurosurgery* 42 (1998) 269-278.
- [33] J.R. Smythies, Oxidative reactions and schizophrenia: a review-discussion, *Schizophr. Res.* 24 (1997) 357-364.
- [34] S.R. Stapleton, G.L. Garlock, L. Foellmi-Adams, R.F. Kletzien, Selenium: potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase, *Biochem. Biophys. Acta* 1355 (1997) 259-269.
- [35] T. Takasago, E.E. Peters, D.I. Graham, H. Masayasu, I.M. Macrae, Neuroprotective efficacy of ebselen, an antioxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion, *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) 1251-1256.

- [36] M.R. Vianna, M. Alonso, H. Viola, J. Quevedo, F. de Paris, M. Furman, M.L. de Stein, J.H. Medina, I. Izquierdo, Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat, *Learn Mem.* 7 (2000) 333-340.
- [37] T. Yamaguchi, K. Sano, K. Takakura, I. Saito, Y. Shinohara, T. Asano, H. Yasuhara, Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial, *Stroke* 29 (1998) 12-17.
- [38] J.K. Yao, R.D. Reddy, D.P. van Kammen, Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications, *CNS Drugs* 15 (2001) 287-310.
- [39] C. Watanabe, T. Suzuki, T. Ohba, Y. Dejima, Transient hypothermia and hyperphagia induced by selenium and tellurium compounds in mice, *Toxicol. Lett.* 50 (1990) 319-326.



Table 1. Administration of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> (1.0, 5.0, or 25.0 μmol/kg) 30 min prior to behavioral test in an open field or step-down inhibitory avoidance training does not affect open field behavior, habituation, or inhibitory avoidance retention in mice. There were no significant differences among groups.

<b>Open field behavior</b>					
Group	<i>n</i>	latency to start locomotion (s)	# of crossings	# of rearings	# of fecal pellets
Vehicle	10	11.20 ± 2.87	85.00 ± 7.3	34.00 ± 5.39	1.60 ± 0.6
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 1.0 μmol/kg	10	14.47 ± 1.34	74.80 ± 8.39	30.60 ± 3.87	1.00 ± 1.00
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 5.0 μmol/kg	10	14.65 ± 4.98	89.50 ± 5.61	36.30 ± 3.78	2.20 ± 0.6
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 25.0 μmol/kg	10	9.34 ± 1.74	98.90 ± 11.38	47.80 ± 4.99	0.50 ± 0.22

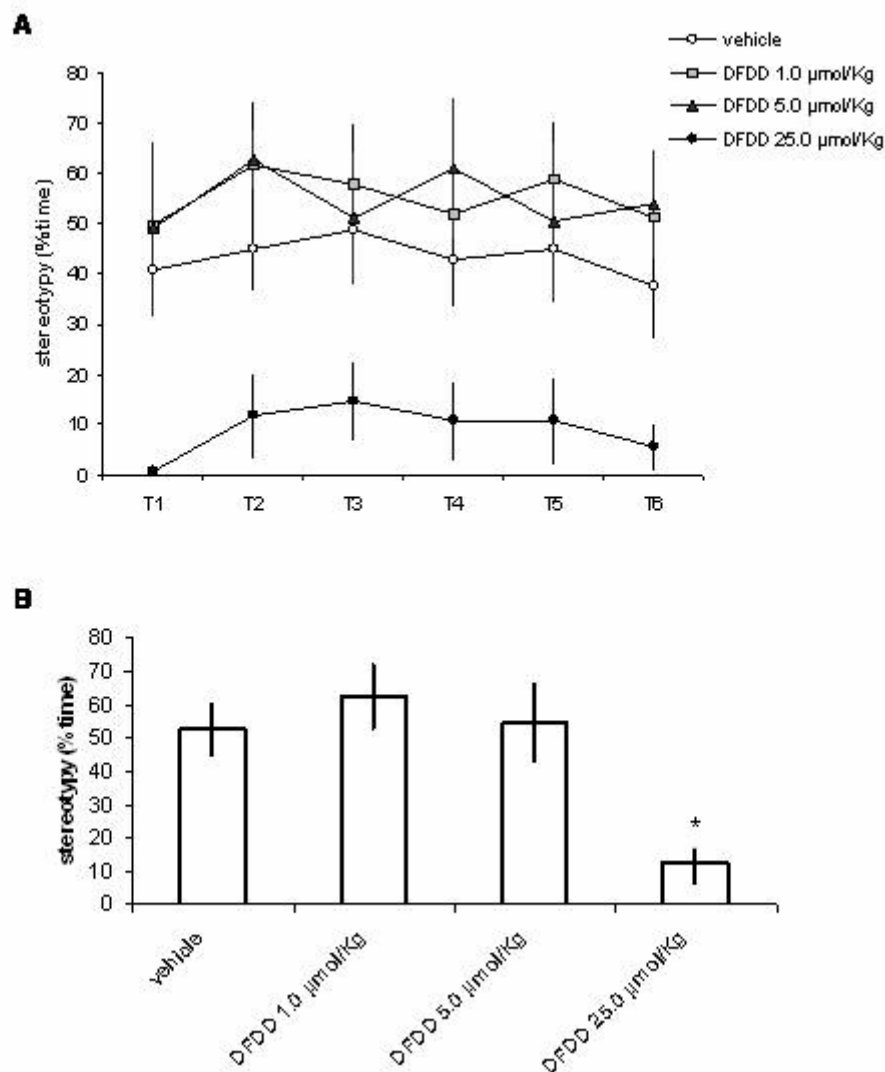
  

<b>Habituation</b>			
Group	<i>n</i>	# of crossings	# of rearings
Vehicle	10	81.30 ± 11.12	31.00 ± 5.47
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 1.0 μmol/kg	10	60.90 ± 6.89	22.30 ± 3.38
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 5.0 μmol/kg	10	71.20 ± 7.14	29.40 ± 4.4
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 25.0 μmol/kg	10	79.30 ± 11.93	34.90 ± 6.02

<b>Inhibitory avoidance (mean ± S.E.M. latencies to step down (s))</b>				
Group	<i>n</i>	Training	1.5 h retention	24 h retention
Vehicle	11	9.94 ± 2.41	19.60 ± 3.72	16.48 ± 2.33
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 1.0 μmol/kg	12	7.50 ± 1.27	17.61 ± 6.22	14.88 ± 5.18
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 5.0 μmol/kg	12	9.58 ± 1.84	25.76 ± 7.93	29.33 ± 11.20
(F <sub>3</sub> CPhSe) <sub>2</sub> 25.0 μmol/kg	07	15.74 ± 2.97	22.92 ± 4.02	11.24 ± 2.26

Fig. 1. Systemic administration of (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> attenuates apomorphine-induced stereotyped behavior in mice. Animals were given an intraperitoneal (i.p.) injection of vehicle (10% DMSO in saline) or (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub> (1.0, 5.0, and 25.0 μmol/kg) followed by an i.p. injection of apomorphine (20.0 mg/kg) 30 min later. Results are shown as mean + S.E. % time showing stereotypy (A) in each 1-min observation interval or (B) in all observation intervals; *n* = 9 - 11 animals per group; \* *P* ≤ 0.05 compared to the vehicle-treated group.



## **IV. CAPÍTULO 2**

### **Differential genotoxic activities of a catalase-like organoselenium compound**

*A ser submetido à Mutation Research*

## Differential genotoxic activities of a catalase-like organoselenium compound

Miriana da Silva Machado<sup>a</sup>, Izabel Vianna Villela<sup>a</sup>, Renato Moreira Rosa<sup>a</sup>,  
Dinara Jaqueline Moura<sup>a</sup>, Gabriele G. Souza<sup>b</sup>, Carina Cassini<sup>b</sup>, Mirian  
Salvador<sup>b</sup>, Rafael Roesler<sup>d,e</sup>, Jenifer Saffi<sup>a,c</sup>, João Antonio P. Henriques<sup>a, b, c\*</sup>.

<sup>a</sup>*Departamento de Biofísica / Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup>*Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil*

<sup>c</sup>*Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil*

<sup>d</sup>*Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>e</sup>*Laboratório de Pesquisas em Câncer, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

\*Corresponding author

Prof. João Antonio Pêgas Henriques

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 51 33166069

Fax: +55 5133167003

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

## Abstract

The trace element Selenium (Se), once known only for its potential toxicity, is now well established as an essential micronutrient for mammals. The organoselenium compound diphenyl diselenide (DPDS) has displayed interesting antioxidant and neuroprotective activities. On the other hand, this compound has also shown pro-oxidant and mutagenic effects. 3,3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide (DFDD) is a structural analog of diphenyl diselenide that has been poorly studied. Here we report the genotoxic and mutagenic potentials and the protective actions against the hydrogen peroxide-induced damage of the organoselenium compound DFDD in *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* and cultured mammalian – V79 cells. DFDD has not shown mutagenic effects in the *Salmonella*/microsome assay. Nevertheless, this compound was able to induce forward and LYS<sup>+</sup> reverse mutations in haploid *S. cerevisiae* strains. Moreover, DFDD has also showed genotoxic effects in V79 cells in the Comet assay. However, this organoselenium compound presents protective actions against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- but not *t*-BOOH-induced mutagenic effects. Furthermore, we have shown that DFDD presents a Cat-like activity but it has not Sod-like action. These results suggest that DFDD might induce genotoxic effects and protective actions against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage by mimicking catalase activity.

## 1. Introduction

The trace element Selenium (Se), once known only for its potential toxicity, is now well established as an essential micronutrient for mammals [1]. Selenium is a constituent of several selenoproteins, including glutathione peroxidase, thioredoxin reductase, selenoprotein P and selenoprotein R, which are primarily involved in oxidant function and redox state [2-4]. The interest in organoselenides chemistry and biochemistry has increased in the last two decades mainly due to the fact that a variety of organoselenium compounds revealed molecules that could be used as antioxidants, enzyme inhibitors, neuroprotective, anti-tumor and anti-infectious agents, cytokine inducers and immunomodulators [1,5,6]. Diphenyl diselenide (DPDS) (Fig. 1A) is an organoselenium compound with interesting biological activities. Recently the biological activities of DPDS have been studied and these compounds have become good candidates for therapeutic tests, since they present very interesting pharmacological effects. Studies have shown the antioxidant, hepatoprotective, neuroprotective, anti-inflammatory and antinociceptive effects of this organoselenide [6-8].

Besides of these pharmacological properties, DPDS presents some toxic effects. The chronic exposure to high doses of DPDS causes central effects in mouse brain and there is also evidence for liver and renal toxicity besides teratogenic evidence [9-11]. Recently, it has been shown that DPDS acts as pro-oxidant by depleting free glutathione (GSH) and it was able to induce frameshift mutations in *Salmonella typhimurium* and in *Saccharomyces cerevisiae* and increased crossing over and gene conversion frequencies in diploid strains of *S. cerevisiae* [12]. Several organoselenium diselenides have been developed to find molecules with pharmacological potential and low toxic effects. Using DPDS as a prototype compound, the derivative DFDD was developed. Machado *et al.* (2006) [13] have shown that the diphenyl diselenide-structural analog 3'3'-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide [(F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>, DFDD, Fig. 1B] is able to attenuate the apomorphine-induced stereotypy at a dose in which it did not affect other behavioral parameters [13].

The aim of this study was to investigate the genotoxic activities of 3'3'-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide using several experimental models in bacteria, yeast

and cultured mammalian cells. Additionally, we have evaluated the Cat-like and Sod-like activities of this organoselenium compound.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Chemicals

DFDD was synthesized as described [14-16]. All the solvents were bi-distilled and stored in dark flasks. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO), D-biotin, aflatoxin B1, aminoacids (L-histidine, L-threonine, L-metionine, L-tryptophan, L-leucine, L-lysine), nitrogen bases (adenine and uracil), L-canavanine and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma (St. Louis, USA). The S9 fraction, prepared with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 was purchased from Moltox (Annapolis, MD, USA) and glucose-6-phosphate and NADP was obtained from Sigma (St.Louis, USA). The S9 metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to [17]. Oxoid nutrient broth No.2, used in Ames test, was obtained from Oxoid USA Inc. (Maryland, USA). Yeast extract, Bacto-peptone and Bacto-agar were obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA).

### 2.2 Strains

*Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 and TA102 [17,18] were kindly provided by B.M. Ames (University of California, Berkeley, CA, USA). *Saccharomyces cerevisiae* haploid strains N123 (MATa *his1-7*) and XV185-14c (MATα *ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*, R.C. Von Borstel, Edmonton, Canada) were used in mutagenicity tests.

### 2.3 *Salmonella*/microsome mutagenicity assay

Mutagenicity was assayed by the pre-incubation procedure proposed by [17]. DFDD was dissolved in dimethyl sulfoxide immediately prior to use. One hundred microliter of test bacterial cultures ( $1 \times 10^9 - 2 \times 10^9$  cells/mL) were incubated in the dark at 37°C with different amounts of DFDD (1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 µg per plate) in the presence or absence of S9 mix for 20 min, without shaking. Subsequently, 2 mL of soft

agar (0.6% agar, 50 µM histidine, 50 µM biotin, pH 7.4, 45° C) were added to the test tube and poured immediately onto a plate of minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose). For positive controls we used aflatoxin B<sub>1</sub> (1 µg/plate) for all strains (in the presence of metabolic activation with S9 mix) and 4-nitroquinoline-oxide (0.5 µg/plate) for TA97a, TA98 and TA102 or sodium azide (5 µg/plate) for TA100 (absence S9 mix). To improve DNA intercalation analysis, a minor modification of the standard method was used: strain TA97a was treated with DFDD for 4 h at 37° C in culture media (0.8% Oxoid nutrient broth No 2) before plating on minimal agar.

### 2.4 Antimutagenicity assay

*Salmonella typhimurium* TA102 (detects oxidative, alkylating mutagens, and reactive oxygen species) was used to assess DFDD antimutagenicity against the oxidative mutagens *t*-BOOH (25 µg/plate) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100 µg/plate). The pre-incubation procedure was as follows: DFDD was incubated with the culture at 37° C without shaking, in the presence or absence of S9 mix, for 20 min. An oxidative mutagen was then added and the mixture further incubated at 37° C for 20 min, followed by plating on the appropriate media. Plates were incubated in the dark at 37° C for 48 h before counting the revertant colonies.

### 2.5 Assays with *Saccharomyces cerevisiae*

Media, solutions and buffers were prepared as previously described [19]. Complete medium YPD containing 0.5% yeast extract, 2% bacto-peptone and 2% glucose was used for routine growth of yeast cells. For plates, the medium was solidified with 2% bactoagar. The minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without aminoacids, 2% glucose and 2% bacto-agar was supplemented with the appropriate amino acids. The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil, 2 mg tryptophan and 24 mg threonine per 100 mL MM. For mutagenesis in the strain XV-185-14c, the omission media lacking lysine (SC-lys), histidine (SC-his), or homoserine (Sc-hom) were used. For determination of forward mutation frequency induced by DFDD, in strain N123, cells treated with this chemical were plated onto SC plates lacking arginine and supplemented with canavanine 60 µg/mL.



### 2.5.1. Detection of DFDD-induced reverse and frameshift mutations in *Saccharomyces cerevisiae*

Mutagenesis was measured in *S. cerevisiae* strain XV185-14c. A suspension of  $2 \times 10^8$  cells/mL treated in PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.8 g per litre  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.4) or YEL, either stationary or exponential phases, was incubated for 18 h at 30°C with various concentrations of DFDD (10, 20, 30, and 40  $\mu\text{M}$ ). Survival was determined on SC (3-5 days, 30°C) and mutation induction (LYS, HIS or HOM revertants) on the appropriate omission media (7-10 days, 30°C). Whereas *his1-7* is a non-suppressible missense allele and reversions result from mutation at the locus itself [20], *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele [21], which can be reverted either by locus-specific or by a forward mutation in a suppressor gene [22]. True reversions and forward (suppressor) mutations at the *lys1-1* locus were differentiated according to Schuller and Von Borstel [23], where the reduced adenine content of the medium SC-lys shows locus reversions as red and suppressor mutations as white colonies. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a range of diagnostic mutagens [22]. Assays were repeated at least four times and plating was in triplicate for each dose. Media, solutions and buffers were prepared according to Burke *et al.* [19]. Complete medium (YPD) was used for routine growth of yeast cells and minimal medium (MM) was supplemented with the appropriate amino acids (synthetic complete medium, SC).

### 2.5.2 Detection of DFDD- induced forward mutation in *Saccharomyces cerevisiae*

Mutagenesis was measured in *S. cerevisiae* strain N123. Stationary phase cultures were obtained by inoculation of an isolated colony in liquid YEL medium (glucose 2%). Cells in stationary or exponential phases were harvested and washed twice with saline, treated in buffer saline (PBS) with growing concentrations of the DFDD (40, 80 and 120  $\mu\text{M}$ ) for 2 h at 30 °C in term mixer. Further the cells were washed and suitable aliquots were plated onto SC (synthetic complete medium) with or without canavanine (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

## 2.6 Comet assay using V79 cells

Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells) possess a number of desirable properties for mutagenesis assays. They are characterized by a rapid growth rate and short lag period. V79 cells double every 12-16 h and are able to start exponential growth from a

small inoculum. Rapid growth rates allow experiments to be done quickly. V79 cells also have a high cloning efficiency of 75-95%; the results are, therefore, not compromised by potential interactions between the low cloning efficiency of the cell culture itself and the toxicity of the test compounds. These cells have a stable karyotype with a modal chromosome number of  $22 + 1$  and are male. V79 cells recover rapidly from storage in liquid nitrogen, allowing the maintenance of large stocks of cells with similar and reproducible characteristics (e.g., low mutation frequency).

V79 cells were cultivated under standard condition in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine and antibiotics [24]. Cells were maintained in tissue culture flasks at 36 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and were harvested by treatment with 0.15% trypsin and 0.08% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS).  $2 \times 10^5$  cells were seeded into each flask and culture one day prior to treatment. For the Comet assay the cells were treated for 2 h with DFDD followed by 0.5 h incubation with the oxidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The culture flasks were protected from direct light during treatment with DFDD and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh *et al.* [25] with minor modifications [26]. At the end of treatment, cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized with 100 µL trypsin (0.15%). Immediately after, cells suspension ( $\sim 10^6$  cells/mL) were dissolved in low melting point agarose (LMA) and spread on agarose-precoated microscope slides. The cells were lysed (2.5M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1 % Triton X-100 and 10 % DMSO) and an electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to electrophoresis the DNA. Slides were stained with silver nitrate and analyzed using an optic microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed per group. Cells were also scored visually into five classes, according to tail size (from undamaged-0, to maximally damaged-4).

International guidelines and recommendations for the Comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method. It has a high correlation with computer-based image analysis [27,28]. The damage index is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail and is considered a sensitive measure of DNA. According to [27], the damage frequency, or the proportion of cells that show tails after the electrophoresis, is less informative than the damage index (DI), because it does

not consider the extent of the DNA damage in the cells. Image length or migration length gives information only about the size of DNA fragments and is largely dependent upon electrophoresis conditions (i.e. voltage and duration) [29]. Thus, damage index (DI) is emphasized in our analyses. Damage index (DI) thus was assigned to each comet according to its class and ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4) [30,31]. Results are presented as mean and range of four independent experiments. The vehicle (DMSO) was used as negative control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) was used as positive control.

### 2.7 *Cat-like and Sod-like activities*

The assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation ability was performed according to the method described by [33]. Its principle is based on the determination of hydrogen peroxide decomposition rate at 240 nm. This reaction was conducted in a constant temperature (30 °C) for 1 min. One unit of catalase decomposed 1 µmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per mg of protein in one minute at pH 7.4. Superoxide quenching ability of DFDD was spectrophotometrically determined by measuring the inhibition of the auto catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm, in a reaction medium containing 1 mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2). This reaction was kept at 30 °C for 3 min [34]. One unit is defined the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50% per gram of protein.

### 2.8 *Data analysis*

Mutagenicity data were analyzed with Salmonel software [35]. A compound was considered positive for mutagenicity only when: (a) the number of revertants was at least double the spontaneous yield (MI ≥ 2; mutagenic index (MI): number of induced colonies in the sample/number of spontaneous in the negative control); (b) a significant response for analysis of variance ( $P \leq 0.05$ ) was found; and (c) a reproducible positive dose-response ( $P \leq 0.01$ ) was present, evaluated by the Salmonel software [36-38]. A cytotoxic effect was considered when MI ≤ 0.6.

The percentage of inhibition of each antimutagen against each mutagen was calculated as: % Inhibition = [1- (B/A)] X 100, where A represents the number of revertants on the plate containing mutagen only and B represents the number of revertants

on the plate containing mutagen and antimutagen. The number of spontaneous revertants on the negative control was subtracted from each of A and B [39]. The dose inhibiting 50% of mutagenicity can be calculated from the dose-response curve and can be used as an indicator of antimutagenic potency.

Data from mutagenesis assays in *S. cerevisiae* were expressed as means and standard deviation from three independent experiments and statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's Multiple Comparison Test. Differences are considered significant when  $P \leq 0.05$  [40].

The comet assay, Cat-like and Sod-like activities statistical evaluations were also analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's Multiple Comparison Test.

### 3. Results

#### 3.1 *Salmonella/microsome assay*

No mutagenicity of DFDD was seen, even at higher concentration (5000  $\mu\text{g}$  per plate), in TA97a (detects frameshift mutation in DNA target –C-C-C-C-C-C-; + 1 cytosine), TA98 (detects frameshift mutation in DNA target –C-G-C-G-C-G-C-G-), TA100 (base pair substitution mutation results from the substitution of a leucine [GAG] by a proline [GGG]), nor TA102 in the absence or presence of metabolic activation (Table 1). Moreover, DFDD did not show mutagenicity on the frameshift mutation-detecting strain TA97a when incubated during growth (Table 2).

#### 3.2 *Protection against oxidants in bacteria*

DFDD was indeed antimutagenic for TA102 strain for all doses tested inhibiting by up to 70% the mutagenicity induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Table 3). However, this compound did not show the same effect against organic hydroperoxide *t*-BOOH-induced oxidative mutagenesis (Table 3).

### 3.3 Cytotoxic and mutagenic effects in *S. cerevisiae*

DFDD was a weak and dose-nondependent cytotoxic for XV185-14c and N123 *S. cerevisiae* strains (Tables 4 and 5). In the mutagenesis assays, the treatment with this organoselenium compound was able to induce just locus non-specific mutation in XV185-14c strain after treatment with 10  $\mu\text{M}$  (Table 4). In the haploid N123 yeast strain, DFDD induced forward mutation at all doses tested (Table 5).

### 3.4 Comet assay in V79 cells

DFDD was able to generate significant DNA damage in all concentrations tested and the DNA damage increases in dose-nondependent manner. These results indicate that DFDD induces chromosomal DNA strand breaks in cultured mammalian cells as shown in Table 6.

When the cells were pre-treated with the lower dose of DFDD (50  $\mu\text{M}$ ) and, subsequently exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the damage index strongly increased in relation to the genotoxicity induced by the oxidant  $\text{H}_2\text{O}_2$ . However, DFDD in the others doses (100 and 150  $\mu\text{M}$ ) induced a slight decreasing in the genotoxicity induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Table 6).

### 3.5 Cat-like and Sod-like assays

DFDD presented significant Cat-like activity at all doses tested (Table 7). However, this compound has not displayed any Sod-like activities (data not shown).

## 4. Discussion

The importance of selenium as an essential trace element has progressively emerged during the last years due to the analysis of selenium deficiency diseases and to the identification and characterization of a number of selenoenzymes [41]. In addition, low concentrations of selenium may have anticarcinogenic effects, whereas in high concentrations it can be genotoxic and carcinogenic [42]. The interest in organoselenides chemistry and biochemistry has increased in the last two decades mainly due to the fact that a variety of organoselenium compounds possess antioxidant activity [43]. Diphenyl

diselenide (DPDS) is an organoselenium compound that has shown interesting biological activities [44].

In the present study, we have evaluated the genotoxic activities of the organoselenium compound DFDD that is a structural analogue of DPDS (Fig. 1A and 1B).

In previous work, our group showed that DPDS, only when present during the growth, induced a high level of frameshift mutation in *Salmonella typhimurium* and in *Saccharomyces cerevisiae* haploid strains presenting a similar behavior to that of an intercalating agent [12]. In contrast to DPDS, DFDD did not induce frameshift mutation in *S. typhimurium* and *S. cerevisiae* haploid strains, even under growth conditions (Tables 1, 2 and 4). These results indicate that DFDD is unable to intercalate into DNA. This effect might be probably due to a spatial impediment caused by the CF<sub>3</sub> group present in DFDD. Indeed, DFDD was able to induce a weak cytotoxic and mutagenic effect in *S. cerevisiae* strains (Table 4 and 5). DFDD has induced forward and LYS<sup>+</sup> reverse mutation, locus non-specific, in N123 and XV185-14c *S. cerevisiae* strains, respectively (Tables 4 and 5).

As demonstrated in the Tables 4-6, DFDD induced a weak and dose non-dependent cytotoxicity and genotoxicity in *S. cerevisiae* strains and V79 cells. Thus, we suppose that the cytotoxic and genotoxic effects of the DFDD might be resulting from an indirect action of this compound or some damage caused by the highest eletrofilic CF<sub>3</sub> group on the nucleofilic DNA molecule.

On the other hand, DFDD showed protective actions only against the oxidative mutagenesis induced by hydrogen peroxide in TA102 *S. typhimurium* strain (Table 3), while, its analog DPDS was able to strongly enhance the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mutagenesis in the same test [12]. The proposed mechanism for the DPDS pro-mutagenic effect involves its glutathione depleting and DNA intercalating properties [12,45]. Nevertheless, DFDD was not an intercalating agent and it did not interact with GSH (data not shown), and such effects might, in part, explain the different activities showed by DFDD and DPDS in this assay.

Additionally, DFDD was able to attenuate the apomorphine-induced stereotypy [13]. It is known that apomorphine can act as a pro-oxidant by leading to the formation of reactive oxygen species such as superoxide and hydrogen peroxide [46,47]. Once DFDD has also shown protective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage, we have tested the DFDD

Cat-like and Sod-like activities. As demonstrated in the Table 7, this organoselenium compound showed only Cat-like activity at all doses tested. Indeed, this property could explain the protective effects of DFDD against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage in the TA102 *S. typhimurium*. However, the mechanisms involved in the reaction of the DFDD with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> still remain unclear.

Furthermore, in this work we showed that DFDD, a structural analog of DPDS, presents some opposite features to those observed for DPDS in several assays (Table 8). Indeed, others reports have also demonstrated some differences between structure-activity of these diselenides [9,43]. Therefore, it is tempting to suggest that the differential genotoxic and Cat-like activities showed by DFDD are related to its CF<sub>3</sub> functional groups, since this is the only structural difference between these diselenides (Fig. 1A and B).

Clearly, this paper demonstrated that the new organoselenium compound DFDD is an interesting molecule, and these results warrant further studies to characterize the modulatory effects of DFDD on the cellular redox state and to collect more information about its genotoxic activities.

## 5. Acknowledgments

This work was supported by the following Brazilian agencies: CNPq, FAPERGS and GENOTOX/Centro de Biotecnologia/UFRGS.

## 6. References

- [1] L. Schomburg, U. Schweizer, J. Kohrle, Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic, *Cell Mol. Life Sci.* 61 (2004) 1988-1995.
- [2] A.U. Brauer, N.E. Savaskan, Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element, *Rev. Neurosci.* 15 (2004) 19-32.

- [3] Y. Saito, K. Takahashi, Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 5746-5751.
- [4] G.V. Kryukov, R.A. Kumar, A. Koc, Z. Sun, V.N. Gladyshev, Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 4245-4250.
- [5] G. Muges, W. du Mont, H. Sies, Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2125-2179.
- [6] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 255-285.
- [7] C.W. Nogueira, E.B. Quinhones, E.Q. Jung, G. Zeni, J.B. Rocha, Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide, *Inflamm. Res.* 52 (2003) 56-63.
- [8] G. Ghisleni, L. Porciuncula, H. Cimarosti, J.B.T. Rocha, C.G. Salbego, D.O. Rocha, Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immuncontent, *Brain Res.* 986 (2003) 196-199.
- [9] C.W. Nogueira, F.C. Meotti, E. Curte, C. Pilissão, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats, *Toxicology* 183 (2003) 29-37.
- [10] 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.
- [11] A.M. Favero, S.N. Weis, E.C. Stangherlin, G. Zeni, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats, *Reprod. Toxicol.* 20 (2005) 561-568.
- [12] 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.



- [13] M.S. Machado, R.M. Rosa, A.S. Dantas, G.K. Reolon, H.R. Appelt, A.L. Braga, J.A.P. Henriques, R. Roesler, An organic selenium compound blocks apomorphine-induced stereotypy in mice, *Neurosci. Lett.* 000 (2006) 000 [submitted].
- [14] C. Paulmier, Selenoorganic functional groups. In Paulmier, C., (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, First ed. Pergamon Press, Oxford, England (1986) pp. 25-51.
- [15] A.L. Braga, G. Zeni, L.H. Andrade, C.C. Silveira, H.A. Stefani, Stereospecific formation of chalcogens via palladium catalysed cross-coupling reaction of  $\alpha$ -bromovinylic chalcogens, *Synthesis* 1 (1998) 39-41.
- [16] L. Engman, Expedient synthesis of Ebselen and related compounds, *J. Org. Chem.* 54 (1989) 2964-2966.
- [17] K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455 (2000) 29-60.
- [18] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173-215.
- [19] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, *Methods in yeast genetics*, in: Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 2000.
- [20] S. Snow, Absence of suppressible alleles at the *his1* locus of yeast, *Mol. Gen. Genet.* 164 (1978) 341-342.
- [21] D. C. Hawthorne, Identification of nonsense codons in yeast, *J. Mol. Biol.* 43 (1969) 71-75.
- [22] R. C. Von Borstel, K. T. Cain, C. M. Steinberg. Inheritance of spontaneous mutability in yeast, *Genetics* 69 (1971) 17-27.
- [23] R. C. Schuller, R. C. Von Borstel, Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration, *Mutat. Res.* 24 (1974) 17-23.

- [24] G. Speit, B. Habermeier, R. Helbig, Differences in the responses to mutagens between two V79 sublines, *Mutat. Res.* 325 (1994) 105-111.
- [25] 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 cell, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [26] A. Hartman, G. Speit, The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183-188.
- [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, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, in: *Proceedings of the Fourth International Comet Assay Workshop*, *Mutagenesis* 18 (2003) 45-51.
- [29] S.I.R. Franke, D. Prá, J. Da Silva, B. Erdtmann, J.A.P. Henriques, Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and Cu SO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo, *Mutat. Res.* 583 (2005) 75-84.
- [30] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.
- [31] J. Silva, T.R.O. Freitas, V. Heuser, J.R. Marinho, B. Erdtmann, Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by assay and micronucleus test, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 270–278.
- [32] M. Miki, H. Tamai, M. Mino, Y. Yamamoto, E. Niki, Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by a  $\alpha$ -tocoferol, *Arch. Biochem. Biophys.* 186 (1987) 343-355.
- [33] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121-126.

- [34] H.P. Mirsa, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170-3175.
- [35] L. Myers, N. Adams, L. Kier, T.K. Rao, B. Shaw, L. Williams, Microcomputer software for data management and statistical analysis of the Ames/*Salmonella* test. In: D. Krewski, C.A. Franklin (Eds.), *Statistics in Toxicology*, Gordon and Breach, New York, 1991, pp. 264-279.
- [36] J.N. Picada, K.V.C.L. da Silva, B. Erdtmann, A.T. Henriques, J.A.P. Henriques, Genotoxic effects of structurally related  $\beta$ -carboline alkaloids, *Mutat. Res.* 379 (1997) 135-149.
- [37] J.N. Picada, A.F. Maris, K. Ckless, M. Salvador, N.N. Khromov-Borisov, J.A.P. Henriques, Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacterial and yeast, *Mutat. Res.* 539 (2003) 29-41.
- [38] A.A.M. Cavalcante, G. Rubensam, J.N. Picada, E.G. da Silva, J.C.F. Moreira, J.A.P. Henriques, Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina, *Environ. Mol. Mutagen.* 41 (2003) 360-369.
- [39] G. Cabrera, Effect of five dietary antimutagens on the genotoxicity of six mutagens in the Microscreen Prophage-induction assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 36 (2000) 206-220.
- [40] A. Camussi, F. Moller, M. Ottaviano, S. Gorla, *Distribuzione campionarie e stima dei parametri in una popolazione*, Zanichelli, Bologna, 1986.
- [41] K. Forchhammer, A. Bock, *Biology and biochemistry of selenium*, *Naturwissenschaften*, 78 (1991) 497-504.
- [42] J.A. Milner, J.A. Hsu, Inhibitory effect of selenium on the growth of L1210 leukemic cells, *Cancer Res.* 41 (1981) 1652-1656.

[43] F.C. Meotti, E.C. Stangherlin, G. Zeni, C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation, *Environ. Res.* 94 (2004) 276-282.

[44] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 255-285.

[45] R.M. Rosa, R.B. de Oliveira, J. Saffi, A.L. Braga, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, J.C.F. Moreira, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions, *Life Sci.* 77 (2005) 2398-411.

[46] S.Y. Sit, Dopamine agonists in the treatment of Parkinson's disease-past, present and future, *Curr. Pharm. Des.* 6 (2000) 1211-1248.

[47] R.S. El-Bachá, J.L. Daval, V. Koziel, P. Netter, A. Minn, Toxic effects of apomorphine on rat cultured neurons and glial C6 cells, and protection with antioxidants, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2001) 73-85.

TABLES

**Table 1. Mutagenicity of DFDD in the *Salmonella*/microsome Assay**

		TA98				TA97a				TA100				TA102			
<i>S. typhimurium</i>		- S9		+ S9		- S9		+ S9		- S9		+ S9		- S9		+ S9	
Substance	Dose µg/plate	Rev./plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI	Rev./plate	MI
NC <sup>c</sup>		24 ± 0.6		25 ± 1		147 ± 29		153 ± 27		153 ± 15		134 ± 7		315 ± 45		403 ± 11	
DFDD	1000	22 ± 4	0.9	27 ± 7	1.1	132 ± 27	0.9	155 ± 2	1.0	117 ± 8	1.2	132 ± 23	1.0	344 ± 51	1.1	374 ± 52	0.9
	2000	21 ± 4	0.8	31 ± 7	1.3	148 ± 25	1.0	182 ± 2	1.2	201 ± 5	0.8	138 ± 7	1.0	336 ± 15	1.1	381 ± 62	0.9
	3000	20 ± 1	0.8	24 ± 3	1.0	159 ± 6	1.1	195 ± 26	1.3	108 ± 16	0.7	140 ± 3	1.0	317 ± 35	1.0	416 ± 184	0.9
	4000	29 ± 1	1.2	30 ± 5	1.2	131 ± 26	0.9	165 ± 20	1.1	131 ± 13	0.9	122 ± 15	0.9	367 ± 28	1.2	325 ± 79	0.8
	5000	24 ± 4	1.0	21 ± 3	0.8	119 ± 21	0.8	179 ± 41	1.2	128 ± 12	0.8	123 ± 27	0.9	330 ± 15	1.0	349 ± 39	0.9
PC <sup>d</sup>		346 ± 45	14.2	1031 ± 139	12	735 ± 195	5.0	709 ± 214	4.6	1175 ± 199	5.0	844 ± 109	5.6	1364 ± 367	4.3	972 ± 233	2.2

<sup>a</sup> Number of revertant/plate: mean of three independent experiments ± SD; <sup>b</sup> MI mutagenic index : n° of *his*<sup>+</sup> induced in the sample / n° of spontaneous *his*<sup>+</sup> in the negative control; <sup>c</sup> NC negative control: dimethyl sulfoxide (DMSO, 25 µL) used as a solvent for DFDD; <sup>d</sup> PC positive control: (-S9) 4-nitroquinoline 1-oxide (0.5 µg/plate) for TA98, TA97a and TA102 or sodium azide (1 µg/plate) for TA100; (+S9) aflatoxin B1 (1 µg/plate) for all strains.

**Table 2. Mutagenicity of DFDD in the TA97 strain of *Salmonella*/microsome Assay treated during growth in absence of metabolic activation**

Substance	Dose (µg/plate)	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>
NC <sup>c</sup>		139 ± 25	
DFDD	1000	139 ± 23	1.0
	2000	123 ± 12	0.9
	3000	121 ± 8	0.9
	4000	125 ± 8	0.9
	5000	130 ± 6	0.9
PC <sup>d</sup>		3380 ± 201	14.6

<sup>a</sup> Number of revertants/plate: mean of three independent experiments ± SD; <sup>b</sup> MI mutagenic index : n° of *his*<sup>+</sup> induced in the sample / n° of spontaneous *his*<sup>+</sup> in the negative control; <sup>c</sup> NC negative control: dimethyl sulfoxide (DMSO, 25 µL) used as a solvent for DFDD; <sup>d</sup> PC positive control: 4-nitroquinoline 1-oxide (0.5 µg/plate).

**Table 3. Effects of DFDD on induced mutagenicity by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and *t*-butylhydroperoxide (*t*-BOOH) in TA102 strain of *Salmonella*/microsome Assay.**

Substance	Doses (µg/plate)	Rev/plate <sup>a</sup>	I (%) <sup>b</sup>
<i>t</i> -BOOH + DFDD	25 + 0	2878 ± 326	
	25 + 1000	2231 ± 590	25.1
	25 + 2000	2527 ± 488	13.6
	25 + 3000	2611 ± 413	9.3
	25 + 4000	2154 ± 276	28.1
	25 + 5000	2404 ± 91	18.4
	NC <sup>c</sup>		297 ± 15
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DFDD	100 + 0	502 ± 16	
	100 + 1000	279 ± 40*	78.0
	100 + 2000	287 ± 10*	75.1
	100 + 3000	304 ± 30*	69.0
	100 + 4000	301 ± 42*	70.1
	100 + 5000	289 ± 44*	74.5
	NC <sup>c</sup>		216 ± 42*

<sup>a</sup> Number of revertants/plate: mean of three independent experiments ± SD; <sup>b</sup> I= % Inhibition= [1-(B/A)] x 100, where A represents the number of revertants on the plate containing mutagen only and B represents the number of revertants on the plate containing mutagen and antimutagen. The number of revertants on the NC plate was subtracted from each A and B; <sup>c</sup> NC negative control: dimethyl sulfoxide (DMSO, 25 µL) used as a solvent for DFDD; \* data significant in relation to positive control group (hydrogen peroxide) at  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$  / One-way ANOVA-Tukey.

**Table 4. Induction of point mutation for (*his1-7*), ochre allele (*lys1-1*) and frameshift mutations (*hom3-10*) in haploid XV185-14c strain of *S. cerevisiae* after DFDD treatment during 18 h in exponential phase and non-growth conditions.**

Substance	Treatment	Survival (%)	HIS1/10 <sup>7</sup> survivors <sup>a</sup>	LYS1/10 <sup>7</sup> survivors <sup>b</sup>	HOM3/10 <sup>7</sup> survivors <sup>a</sup>
NC <sup>d</sup>	0	100	10.44 ± 8.36 <sup>c</sup>	20.93 ± 4.22 <sup>c</sup>	5.22 ± 1.48 <sup>c</sup>
4NQO <sup>e</sup>	0.5 µg/ml	61.63	69.51 ± 2.4***	58.78 ± 7.06*	22.04 ± 2.4**
DFDD	0	100	10.44 ± 8.36	20.93 ± 4.22	5.22 ± 1.48
	10 µM	96.60	10.55 ± 1.66	54.77 ± 10.84*	5.86 ± 1.66
	20 µM	98.80	11.76 ± 2.77	51.96 ± 6.93	5.88 ± 2.77
	30 µM	89.24	8.68 ± 0.00	43.42 ± 24.57	5.79 ± 1.02
	40 µM	70.47	8.57 ± 4.92	41.82 ± 13.65	7.50 ± 4.91

<sup>a</sup> Locus-specific revertants; <sup>b</sup> locus non-specific revertant; <sup>c</sup> mean and standard deviation per three independent experiments; <sup>d</sup> negative control; <sup>e</sup> positive control; \* data significant in relation to negative control group (solvent) at  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$  / One-way ANOVA-Tukey.



**Table 5. Mutagenic effects of DFDD in haploid N123 strain of *Saccharomyces cerevisiae*.**

Substance	Treatment	Survival (%)	Can/10 <sup>7</sup> survivors <sup>a</sup>
Stationary – treatment during non-growth conditions (PBS)			
NC <sup>b</sup>		100	9.98 ± 1.43 <sup>d</sup>
4-NQO <sup>c</sup>	0.5 µM	74.50 ± 0.31	157.90 ± 15.35***
DFDD	40 µM	30.28 ± 1.18	44.91 ± 5.26*
	80 µM	27.22 ± 0.78	55.05 ± 3.59*
	120 µM	19.17 ± 6.68	58.04 ± 12.81*
Exponential - treatment during non-growth conditions (PBS)			
NC <sup>b</sup>		100	2.38 ± 0.05 <sup>d</sup>
4-NQO <sup>c</sup>	0.5 µM	70.14 ± 0.02	83.25 ± 0.41***
DFDD	40 µM	66.95 ± 4.75	5.60 ± 2.50
	80 µM	52.64 ± 0.63	4.66 ± 0.51
	120 µM	29.37 ± 0.95	13.95 ± 0.70*
Exponential – treatment during growth conditions (YEL)			
NC <sup>b</sup>		100	2.38 ± 0.05 <sup>d</sup>
4-NQO <sup>c</sup>	0.5 µM	30.14 ± 0.02	68.25 ± 0.41***
DFDD	40 µM	42.37 ± 4.75	12.4 ± 0.52*
	80 µM	26.00 ± 1.26	13.5 ± 0.24*
	120 µM	13.67 ± 1.58	21.95 ± 1.62*

<sup>a</sup> Locus-specific revertants; <sup>b</sup> Negative Control (dimethyl sulfoxide); <sup>c</sup> Positive control; <sup>d</sup> Mean and standard deviation per three experiments independents; \* data significant in relation to positive control group at \**P*<0.05; \*\* *P*<0.01; \*\*\* *P*<0.001/ One-way ANOVA-Tukey.

**Table 6. Effect of DFDD in V79 cells exposed for 2 hours plus oxidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0.5 h and evaluated by Comet Assay.**

Substance	Treatment	Damage Index <sup>c</sup>
NC <sup>a</sup>	0	32.87 ± 16.63
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>b</sup>	100 µM	122.50 ± 38.79 <sup>###</sup>
DFDD	50 µM	102.40 ± 20.19 <sup>##</sup>
	100 µM	155.80 ± 16.83 <sup>###</sup>
	150 µM	145.33 ± 29.25 <sup>###</sup>
DFDD	50 µM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	219.67 ± 37.57 <sup>***</sup>
	100 µM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	85.00 ± 23.25
	150 µM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	117.67 ± 13.43

<sup>a</sup> Negative control (solvent); <sup>b</sup> positive control (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); <sup>c</sup> mean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experimental – total of three experiments for each substance; \* data significant in relation to positive control (oxidant) group at  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; # data significant in relation to negative control (solvent) at  $P \leq 0.05$ , ##  $P \leq 0.01$ , ###  $P \leq 0.001$  / One-way ANOVA-Tukey.

**Table 7. Cat-like activity of the DFDD.**

Substance	Dose ( $\mu\text{M}$ )	Cat-like activity (UCat/mg protein)
DFDD	2500	$1.36 \times 10^4 \pm 0.07^a$
	1000	$0.43 \times 10^4 \pm 0.09^b$
	500	$0.45 \times 10^4 \pm 0.04^b$
	120	$0.21 \times 10^4 \pm 0.07^c$
	100	$0.18 \times 10^4 \pm 0.04^c$
	80	$0.12 \times 10^4 \pm 0.04^c$
	40	$0.07 \times 10^4 \pm 0.02^c$
	25	$0.07 \times 10^4 \pm 0.03^c$

\* Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-test, for  $p \leq 0.01$ . One-way ANOVA-Tukey.

**Table 8. Comparative evaluation between 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide (DFDD) and diphenyl diselenide (DPDS) in various biologic models.**

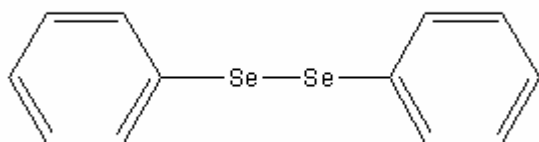
---

<b>Activities</b>	<b>DFDD</b>	<b>DPDS</b>
Neurotoxic for mouse and rat	No [9]	Yes [9]
Antioxidant against lipid peroxidation in mice	No [43]	Yes [43]
Effects on H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mutagenesis in <i>S. typhimurium</i>	Antimutagenic	Pro-mutagenic [12]
Interaction with glutathione	No	Yes [47]
Induction of frameshift mutations in <i>S. typhimurium</i>	No mutagenic	Mutagenic [12]
Induction of frameshift mutation in <i>S. cerevisiae</i>	No mutagenic	Mutagenic [12]
Induction of reverse mutation in <i>S. cerevisiae</i>	Mutagenic	No mutagenic [12]

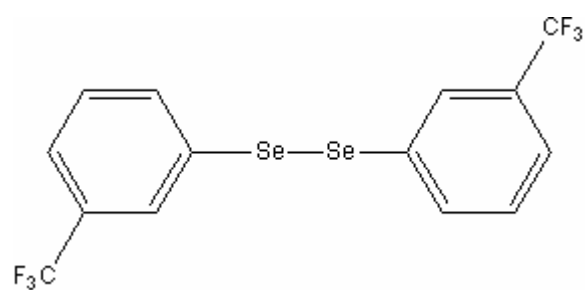
---

**Figure 1. (A) Chemical structure of diphenyl diselenide (DPDS); (B) Chemical structure of 3'3'-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide (DFDD).**

A



B



## V. DISCUSSÃO GERAL

O selênio é um micronutriente essencial de importância fundamental para a saúde humana (SHAMBERGER & FROST *et al.*, 1969; MUGESH, 2001; SCHWEIZER *et al.*, 2004). Dentre os papéis biológicos do selênio inclui-se a prevenção do câncer (COMBS & LU, 2001), de mutações virais (BECK, 2001) e de doenças cardiovasculares (RAYMAN, 2002; BECKETT *et al.*, 2004). Além disso, o selênio é essencial para as funções imune e endócrina moderando ainda a resposta inflamatória (MCKENZIE *et al.*, 2002; ARTHUR *et al.*, 2003). Na maioria dos casos, estas funções biológicas são mediadas pela expressão de no mínimo 30 proteínas (selenoproteínas) codificadas por 25 genes em humanos (KRYUKOV *et al.*, 2003). O selênio está incorporado no sítio ativo das selenoproteínas como um resíduo de selenocisteína, o chamado 21º aminoácido. Estas selenoproteínas são dependentes de selênio e possuem funções enzimáticas importantes (SUNDE, 1997; BRENNEISEN *et al.*, 2005) e este atua nestas proteínas como um centro redox. O exemplo mais conhecido desta função redox do selênio é a redução de peróxido de hidrogênio, lipoperóxidos e fosfolípídeo-hidroperóxidos a produtos menos nocivos para a célula (como água e álcool) pela família de enzimas glutatona peroxidase (DIPLOCK, 1994; ALLAN *et al.*, 1999).

O conceito de que moléculas contendo selênio são agentes nucleofílicos (e assim antioxidantes) melhores do que os compostos antioxidantes clássicos tem levado à elaboração de vários compostos organoselenados (MEOTTI *et al.*, 2004). O ebselen e o disseleneto de difenila (DPDS) são compostos orgânicos de selênio que vêm se destacando por possuírem uma alta atividade tiol-peroxidase (MAIORINO *et al.*, 1988; COTGREAVE *et al.*, 1992; MEOTTI *et al.*, 2004). O DPDS também possui outras propriedades farmacológicas interessantes como neuroprotetora e antiinflamatória (GHISLENI *et al.*, 2003; PORCIÚNCULA *et al.*, 2003, NOGUEIRA *et al.*, 2004). Entretanto, o 3'3'-ditrifuormetildifenil disseleneto (DFDD), análogo estrutural do disseleneto de difenila (Fig. 2 e 3), é um composto organoselenado ainda pouco estudado e com escassas descrições sobre suas atividades biológicas. Deste modo, no presente trabalho, buscou-se investigar as possíveis atividades do DFDD em alguns parâmetros neurocomportamentais em camundongos e genotóxicos em bactérias, leveduras e células de mamíferos.

A atividade do DFDD na estereotipia induzida por apomorfina foi demonstrada no Capítulo 1. Os resultados obtidos com a pré-administração i.p. do DFDD nos animais indicam que este organoselenado protege contra a estereotipia induzida por apomorfina, que é um modelo animal de esquizofrenia (RANDRUP & MUNKVAD, 1974; ELLENBROEK & COOLS, 2002), sem afetar outros aspectos neurocomportamentais importantes como a ansiedade, locomoção, exploração, motivação e memória.

No modelo de estereotipia utilizado neste trabalho, o comportamento estereotipado seria resultante da super ativação de receptores dopaminérgicos pela apomorfina (BATTISTI *et al.*, 2000). Entretanto, a apomorfina também é uma molécula conhecida por gerar espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, o radical superóxido e peróxido de hidrogênio (UBEDA *et al.*, 1993; SIT, 2000; EL-BACHÁ *et al.*, 2001), podendo assim provocar lesões oxidativas aos mais variados componentes celulares. Considerando o fato que o DFDD apresenta uma atividade “catalase-like” (Capítulo 2), não se pode descartar a possibilidade de que a ação do DFDD na estereotipia esteja relacionada à proteção deste disseleneto contra os danos oxidativos gerados pela apomorfina.

Embora o mecanismo de ação pelo qual o DFDD exerce efeito protetor contra a estereotipia induzida por apomorfina ainda permaneça não elucidado, cabe salientar que, apesar de alguns autores já terem relacionado as atividades do selênio com a esquizofrenia (BERRY, 1994; VADDADI *et al.*, 2003; GLATT *et al.*, 2005), até o presente momento, nenhum outro trabalho relatou o uso de compostos orgânicos de selênio como candidatos à drogas antipsicóticas.

No Capítulo 2, demonstrou-se que o DFDD, diferentemente do seu análogo DPDS, não foi capaz de induzir mutações “frameshift” tanto em bactérias quanto em leveduras. Consequentemente, estes resultados nos levam a sugerir que o DFDD não é capaz de se intercalar entre as bases do DNA. Outros trabalhos mostraram que a presença de grupos funcionais na molécula do DPDS foi responsável por abolir os efeitos convulsivantes e antioxidantes deste organoselenado em roedores (NOGUEIRA *et al.*, 2003; MEOTTI *et al.*, 2004). Deste modo, supõe-se que os grupamentos  $CF_3$  presentes no DFDD sejam responsáveis pela atividade não intercalante e que, provavelmente, estes grupamentos estejam causando um impedimento alostérico não permitindo, assim, que o DFDD se intercale entre as bases do DNA. Além disso, o DFDD não foi mutagênico para *S.*

*typhimurium*, porém induziu mutações “forward” e reversa, do tipo locus não específica, em linhagens de *S. cerevisiae*.

Observou-se também no Capítulo 2 que o DFDD apresenta uma fraca citotoxicidade e genotoxicidade em leveduras e células de mamíferos. Sabendo-se que tais efeitos foram dose não-dependente e que este composto não se intercala entre as bases do DNA, supõe-se que a citotoxicidade e genotoxicidade possam estar relacionadas à uma ação indireta deste composto sobre o DNA ou à forte eletrofilicidade do grupamento  $CF_3$  que poderia estar desestabilizando a molécula nucleofílica do DNA

No entanto, o DFDD possui uma importante atividade “catalase-like”, protegendo bactérias e células de mamíferos contra a ação oxidante do peróxido de hidrogênio (Capítulo 2, Tabela 7) e que, de maneira interessante, esta atividade ainda não foi demonstrada por nenhum outro composto orgânico de selênio.

Ao analisar os efeitos apresentados pelo DFDD, é importante salientar que este organoselenado atua de maneira distinta do seu análogo estrutural DPDS em diferentes modelos experimentais (Capítulo 2, Tabela 8). Por fim, fazendo uma análise estrutural-atividade destes disselenetos, acredita-se que os grupamentos  $CF_3$  presentes somente no DFDD (Fig. 2 e 3), sejam de fundamental importância para as interessantes atividades deste organoselenado evidenciadas no presente trabalho.

No entanto, maiores estudos serão necessários para a completa elucidação dos mecanismos de ação do DFDD nos níveis moleculares para assegurar a eficácia deste composto nas funções neurais e evitar a ocorrência de efeitos deletérios no caso de um possível uso terapêutico e/ou industrial futuro deste organoselenado.



## VI – CONCLUSÕES

### 1. Conclusão geral

Os resultados apresentados neste estudo revelam que o organoselenado 3,3-ditrifluormetildifenil disseleneto (DFDD) possui propriedades antipsicóticas na estereotipia induzida por apomorfina em camundongos, propriedades mutagênicas em *Saccharomyces cerevisiae* e genotóxicas em células de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (células V79), atividade “catalase-like” e ação protetora contra a mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio em *Salmonella typhimurium*.

### 2. Conclusões específicas

- ✓ DFDD protegeu contra a estereotipia induzida por apomorfina sem afetar outros parâmetros importantes como a memória, ansiedade, locomoção, motivação e exploração em camundongos.
- ✓ DFDD não induziu mutações frente às linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*;
- ✓ DFDD foi capaz de induzir mutações nas linhagens N123 e XV185-14c de *Saccharomyces cerevisiae* dos tipos “forward” e reversa no locus *lys1-1*, respectivamente;
- ✓ DFDD induziu uma fraca citotoxicidade nas linhagens N123 e XV185-14c de *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ DFDD mostrou um fraco efeito genotóxico para as células de fibroblastos de hamster Chinês - V79 em cultura;
- ✓ DFDD protegeu contra a mutagênese induzida somente por peróxido de hidrogênio em *S. typhimurium* não apresentando efeitos sobre o hidroperóxido de *tert*-butila;

- ✓ DFDD mostrou uma atividade “catalase-like”, não apresentando, entretanto, atividade “superóxido dismutase-like”.

## VII - PERSPECTIVAS

O presente trabalho mostrou dados interessantes sobre as atividades deste novo organoselenado DFDD que estimulam a maiores investigações quanto aos seus mecanismos farmacológicos e toxicológicos. Para isso, pretende-se:

- Avaliar a ação do DFDD na estereotipia induzida por MK801, que é outro modelo experimental de esquizofrenia, a fim de obter mais esclarecimentos quanto ao mecanismo de ação deste organoselenado na estereotipia;
- Realizar o ensaio de recombinação com a linhagem diplóide XS2316 de *Saccharomyces cerevisiae* para verificar a capacidade do DFDD em induzir recombinações intragênicas ou intergênicas;
- Avaliar a influência do DFDD na reparação do DNA utilizando linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em enzimas envolvidas nas principais vias de reparação do DNA;
- Confirmar as ações antioxidantes do DFDD utilizando outros ensaios como o TBARS em leveduras e em soro humano;
- Avaliar também a atividade “catalase-like” do DPDS que é um composto análogo ao DFDD;
- Avaliar os produtos da reação do DFDD com o peróxido de hidrogênio, utilizando espectrometria de massas de alta resolução com ionização por ESI.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULAH, R., MIYAZAKI, K., NAKAZAWA, M. & KOYAMA, H. Chemical forms of selenium for cancer prevention. *J Trace Elem Med Biol.*, 19(2-3): 141-50, 2005.

AL-DEEB, S., AL-MOUTAER, Y.K., BRUYN G.W. & TARIQ, M. Neuroprotective effect of selenium on iminodipropionitrile-induced toxicity. *J. Psychiatry. Neurosci.*, 20(3): 189-92, 1995.

AMES, B.N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204: 587-593, 1979.

AMES, B.N., MCCANN, J. & YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31: 347-364, 1975.

ANJARIA, K.B. & MADHAVANATH, U. Genotoxicity of selenite in diploid yeast. *Mutat. Res.*, 204: 605–614, 1989.

BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., ZENI, G., EMANUELLI, T., BEQUE, M.C. & BRAGA, A.L. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 149(2): 243-253, 1998.

BARNES, W., TULEY, E. & EISENSTADT, E. Base-sequence analysis of *His*<sup>+</sup> revertants of the *hisG46* missense mutation in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mutagen.*, 4: 297, 1982.

BATTISTI, J.J., SHREFFLER, C.B., URETSKY, N.J. & WALLACE, L.J. NMDA antagonists block expression of sensitization of amphetamine- and apomorphine-induced stereotypy. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 67(2): 241-246, 2000.

BERRY, T. A selenium transport protein model of a sub-type of schizophrenia. *Med. Hypotheses*, 43(6): 409-14, 1994.

BHAMRE, S., GADEA, B., KOYAMA, C. & FLOWLER, R. An aerobic *recA<sup>-</sup>*, *umuC<sup>-</sup>* dependent pathway in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 473: 229-249, 2001.

BIANCHIN M., MELLO E SOUZA T., MEDINA J. & IZQUIERDO I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not working on short-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 71(2): 127-131, 1999.

BIRNINGER M., PILAWA S. & FLOHÉ L. Trends in selenium biochemistry. *Nat. Prod. Rep.*, 19(6): 693-718, 2002.

BLOCK, E. Recent results in the organosulfur and organoselenium chemistry of genus *Allium* and *Brassica* plants: relevance for cancer prevention, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 401: 155-169, 1996.

BOCK, A., FORCHHAMMER, K., HEIDER, J., LEINFELDER, W., SAWERS, G., VEPRECK, B. & ZINONI, F. Selenocysteine: The 21<sup>st</sup> amino acid. *Mol. Microbiol.*, 5(3): 515-520, 1991.

BOEIRA, J. M., VIANA, A. F., PICADA, J. N. & HENRIQUES, J. A. P. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, 500: 39-48, 2002.

BOEIRA, J. M., SILVA, J., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P. Genotoxic effects of the alkaloids Harman and Harmine by Comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro, *Pharmacol. Toxicol.*, 89: 287-294, 2001.

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

BRADLEY, M.O., BHUYAN, B., FRANCIS, M.C., LANGENBACH, R., PETERSON, A. & HUBERMAN, E. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutat. Res.*, 87: 81-142, 1981.

BRAGA, A.L., ZENI, G., ANDRADE, L.K., SILVEIRA, C.C. & STEFANI, H.A. Stereospecific formation of chalcogens via palladium catalysed cross-coupling reaction of  $\alpha$ -bromovinyl chalcogens. *Synthesis*, 1: 39-41, 1998.

BRAUER, A.U. & SAVASKAN, N.E. Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element. *Rev. Neurosci.*, 15(1): 19-32, 2004.

BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. The pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutat. Res.*, 489: 79-96, 2001.

BRENNAN, R.J. & SCHIESTL, R.H. Free radicals generated in yeast by the *Salmonella* test negative carcinogens benzene, urethane, thiourea and auramine O. *Mutat. Res.*, 403: 65-73, 1998.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.*, 27(9-10): 951-965, 1999.

BRONZETTI, G., DELLA CROCE, C., ARETINI, P. & FIORIO, R. Antimutagenesis and anticancer effects. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 15(2-4): 59-64, 1996.

BURK, R.F. & HILL, K.E. Orphan selenoproteins. *Bioessays*, 21(3): 231-237, 1999.

BURK, R.F., HILL, K.E. & MOTLEY, A.K. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J. Nutr.*, 133: 1517S-1520S, 2003.

CAHILL, L., MCGAUGH, J.L. & WEINBERGER, N.M. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci.*, 24(10): 578-581, 2001.

CEMELI, E., CARDER, J., ANDERSON, D., GUILLAMET, E., MORILLAS, M.J., CREUS, A. & MARCOS, R. Antigenotoxic properties of selenium compounds on potassium dichromate and hydrogen peroxide. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 2: 53-67, 2003.

CHEN, J. & BERRY, M.J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J. Neurochem.*, 86: 1-12, 2003.

CHEN, X., YANG, G., CHEN, J., CHEN, X., WEN, Z. & GE, K. Studies on the relation of selenium and Keshan disease. *Biol. Trace Element Res.*, 2: 91-107, 1980.

CLARK, L.C., COMBS, G.F.JR., TURNBULL, B.W., SLATE, E.H., ALBERTS, D., ABELE, D., ALLISON, R., BRADSHAW, J., CHALKER, D. CHOW, J., CURTIS, D., DALEN, J., DAVIS, L., DEAL, R. & DELLASEGA, M. The nutritional prevention of cancer with selenium 1983-1993; a randomized controlled trial. *JAMA*. 276(24): 1957-1963, 1997.

COLLINS, A.R., DUTHIE, S.J. & DOBSON, V.L. Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14(9): 1733-1735, 1993.

COLLINS, A.R., DUSINSKÁ, M., FRANKLIN, M., SOMOROSVSKÁ, M., PETROVSKÁ, H., DUTHIE, S., FILLION, L., PANAYIOTIDIS, M., RASLOVÁ K. & VAUGHAN N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30(2): 139-146, 1997.

COLLINS, A. The Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 26: 249-261, 2004.

COMBS, G.F.JR. Selenium and cancer, In: Antioxidants and disease prevention, pp.97-113, *Garewal*, 11 ed. CRC Press, New York, 1997.

COMBS, G.F.JR. & GRAY, W.P. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther.*, 79(3): 179-192, 1998.

COMBS, G.F.JR., TURNBULL, B.W., SLATE, E.H., CHALKER, D.K., CHOW, J., DAVIS, L.S., GLOVER, R.A., GRAHAM, G.F., GROSS, E.G., KRONGRAD, A., LESHER, J.L.JR., PARK, H.K., SANDERS, B.B.JR., SMITH, C.L. & TAYLOR, J.R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial - Nutritional Preventions of Cancer Study Group. *JAMA*. 276 (24): 1957-1963, 1996.

CORCORAN, N.M., NAJDOVSKA, M. & COSTELLO, A.J. Inorganic selenium retards progression of experimental hormone refractory prostate cancer. *J. Urol.*, 171: 907-910, 2004.

CORNETT, C.R., EHMANN, W.D., WEKSTEIN, D.R. & MARKESBERY, W.R. Trace elements in Alzheimer's disease pituitary glands. *Biol Trace Elem Res.*, 62(1-2): 107-14, 1998.

CROSBY, D.G. *Environmental toxicology and chemistry*, Oxford. Editora Oxford University Press, 336p., 1998.

DAIBER, A., ZOU, M.H., BACHSCHMID, M. & ULLRICH, V. Ebselen as a peroxynitrite scavenger in vitro and ex vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 59(2): 153-60, 2000.

DEARFIELD, K.L., CIMINO, M.C., McCARROLL, N.E., MAUER, I. & VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat. Res.*, 521: 121-135, 2002.

DRAKE, E.N. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant, *Med Hypotheses*, 67(2): 318-322, 2006.

EVANGELOU, A.M. Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 42(3): 249-65, 2002.

FAIRBAIRN, D. W., OLIVE P. L. & O'NEILL, K. L. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 330: 37-59, 1995.

FARINA, M., BARBOSA, N., NOGUEIRA, C., FOLMER, V., ZENI, G., ANDRADE, L., BRAGA, A.L. & ROCHA, J.B.T. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinate dehydratase from rat liver and cucumber leaves. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35(6): 623-631, 2002.

FLOHÉ, L., ANDREESEN, JR., BRIGELIUS-FLOHE, R., MAIORINO, M. & URSINI, F. Selenium, the element of the moon, in life on earth. *IUBMB Life*, 49(5): 411-20, 2000.



FLOHÉ, L., GUNZLER., W.A. & SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32(1), 132-134, 1973.

FRANKE, S.I.R., PRA, D., DA SILVA, J., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J.A.P. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and Cu SO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo. *Mutat. Res.*, 583: 75-84, 2005.

FRANKENBERGER, W. & KARLSON, J. Dissipation of soil selenium by microbial volatilization, In: Adriano, D.C., ed. *Biogeochemistry of trace metals*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, pp365-381, 1992.

FRIEDBERG, E., WALKER, G. & SIEDE, W. *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, USA, 1995.

FUNCHAL, C., MORETTO, M.B., VIVIAN, L., ZENI, G., ROCHA, J.B. & PESSOA-PUREUR, R. Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorilation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats. *Toxicology*, 1; 222(1-2): 143-53, 2006.

GANTHER, H.E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20(9):1657-1666, 1999.

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

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

GANTHER, H.E. Selenotrisulfides. Formation by reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry*, 7: 2898-2905, 1968.

GASDASKA, J.R., HARNEY, J.W., GASDASKA, P.Y., POWIS, G. & BERRY, M.J. Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated

region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements. *J. Biol. Chem.*, 274(36): 25379-25385, 1999.

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

GLADYSHEV, V.N.& HATFIELD, D.L. Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J. Biomed. Sci.*, 6(3), 151-160, 1999.

GLATT, S.J., EVERALL, I.P., KREMEN, W.S., CORBEIL, J., SASIK, R., KHANLOU, N., HANI, M., LIEW, C. & TSUANG, M.T. Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia. *PNAS*, 102(43): 15533–15538, 2005.

GOELET, P., CASTELLUCI, V.F., SCHACHER, S. & KANDEL, E.R. The long and the short of long-term memory – a molecular framework. *Nature*, 322: 419-422, 1986.

GOLDMAN, W.P., BATY, J.D., BUCKLES, V.D., SAHRMANN, S. & MORRIS, J.C. Cognitive and motor functioning in Parkinson disease: subjects with and without questionable dementia. *Arch. Neurol.*, 55(5): 674-80, 1998.

GREEDER, G.A. & MILNER, J.A. Factors influencing the inhibitory effect of selenium on mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cells. *Science*, 209: 825-827, 1980.

GRENSON, M., MOUSSET, M., WIAME, J.M. & BECHET, J. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta*, 31;127(2): 325-38, 1966.

HAMILTON, E.E., FANWICK, P.E. & WILKER, J.J. Alkylation of inorganic oxo compounds and insights on preventing DNA damage. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(10): 3388-3395, 2006.

HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V. &

TICE, R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet Assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51, 2003.

HARTMANN, A. & SPEIT, G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat. Res.*, 346(1): 49-56, 1995.

HARTMANN, A.& SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.*, 90, 183-188, 1997.

HAWTHORNE, D. & LEOPOLD, U. *Current topics in microbiology and immunology*, Springer Verlag, Berlin, 1974.

HENRIQUES, J.A.P. & MOUSTACCHI, E. Isolation and characterization of pso mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 95(2): 273-88, 1980.

HENRIQUES, J.A.P., VALSA, J.O. & GOMES, R.A. Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividade mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: Pinto, S.O.C. (Ed), *Genética Molecular de Microorganismos*, Manole, São Paulo, 1987.

HITRI, A., O'CONNOR, D.A., COHEN, J.M., KEULER, D.J. & DEUTSCH, S.I. Differentiation between MK-801- and apomorphine-induced stereotyped behaviors in mice. *Clin Neuropharmacol.*, 16(3):220-36, 1993.

HOLBEN, D.H., & SMITH, A.M. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, 99(7): 836-843, 1999.

IMAM, S.Z., NEWPORT, G.D., ISLAM, F., SLIKKER, W. JR. & ALI, S.F. Selenium, an antioxidant, protects against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *Brain Res.*, 818(2): 575-8, 1999.

IP, C. & HAYES, C. Tissue selenium levels in selenium-supplemented rats and their relevance in mammary cancer protection. *Carcinogenesis*, 10: 921-925, 1989.

IP, C. & LISK, D.J. Bioavailability of selenium from selenium-enriched garlic. *Nutr. Cancer*, 20: 129-137, 1993.

IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J. Nutr.*, 128: 1845-1854, 1998.

IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing, *Behav. Neural. Biol.*, 51(2): 171-202, 1989.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 68(3): 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I., BARROS, D.M., IZQUIERDO, L., SOUZA, M., SOUZA, T. & MEDINA, J. Memory types differ. *Nature*, 393: 635-636, 1998.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J., VIANNA, M.R.M., IZQUIERDO, L.A. & BARROS, D.M. Separate mechanisms for the short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.*, 103(1): 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I. & McGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.*, 11: 517-534, 2000.

JACOBS, M. & FROST, C. Toxicological effects of sodium selenite in Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 8: 575-585, 1981.

JACQUES-SILVA, M., NOGUEIRA, C., BROCH, L., FLORES, E. & ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol.Toxicol.*, 88(3): 119-125, 2001.

KELLER, K.L., OVERBECK-CARRICK, T.L. & BECK, D.J. Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-radiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat. Res.*, 486: 21-29, 2001.

KIEN, C.L. & GANTHER, H.E. Manifestations of chronic selenium deficiency in a child receiving total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, (2): 319-28, 1983.

KIM, H.C., JHOO, W.K., CHOI, D.Y., IM, D.H., SHIN, E.J., SUH, J.H., FLOYD, R.A. & BING, G. Protection of methamphetamine nigrostriatal toxicity by dietary selenium. *Brain Res.*, 851: 76– 86, 1999.

KIM, H.C., JHOO, W.K., SHIN, E.J. & BING, G. Selenium deficiency potentiates methamphetamine-induced nigral neuronal loss - comparison with MPTP model. *Brain Res.*, 862: 247– 252, 2002.

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

KLEIN, E.A., LIPPMAN, S.M., THOMPSON, I.M., GOODMAN, P.J., ALBANES, D., TAYLOR, P.R. & COLTMAN, C. The selenium and vitamin E and cancer prevention trial. *World J. Urol.*, 21: 21-27, 2003

KOHRLE, J. The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie*, 81: 527-533, 1999.

KOHRLE, J., BRIGELIUS-FLOHÉ, R., BOCK, A., GARTNER, R., MEYER, O. & FLOHÉ, L. Selenium in Biology: facts and medical perspectives. *Biol. Chem.*, 381: 849-864, 2000.

KONOLA, J.Y., SARGENT, K.E. & GOW, J.B. Efficient repair of hydrogen peroxide-induced DNA damage by *Escherichia coli* requires SOS induction of RecA and RuvA proteins. *Mutat. Res.*, 459: 187-194, 2000.

KRYUKOV, G.V., CASTELLANO, S., NOVOSELOV, S.V., LOBANOV, A.V., ZEHTAB, O., GUIGO, R., & GLADYSHEV, V.N. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300: 1439-1443, 2003.

LEE, J.H., CHOI, I.Y., KIL, I.S., KIM, S.Y., YANG, E.S. & PARK, J.W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1526 (2): 191-198, 2001.

LEITÃO, A.C., ALCÂNTARA GOMES, R. (1997) Radiobiologia e fotobiologia-respostas celulares a lesões induzidas por agentes físicos e químicos (apostila), Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 119p.

LEVIN, D.E., YAMASAKI, E., AMES, B.N. (1982 a) A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens, *Mutat. Res.* 94, 315-330.

LEVIN, D.E., HOLLSTEIN, M., CHRISTMAN, M.F., SCHWIERS, E.A., AMES, B.N. (1982 b) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 7445-7449.

LIU, J., GILBERT, K., PARKER, H., HASHECK, W. & MILNER J. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors and DNA-adducts by dietary selenite. *Cancer Res.*, 51: 4613-4617, 1991.

LOVELL, M.A., XIE, C., GABBITA, S.P. & MARKESBERY, W.R. Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radical. Biol. Med.*, 28: 418-427, 2000.

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

MACGREGOR, J.T., CASCIANO, D. & MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutat. Res.*, 455:3-20, 2000.

MAIORINO, M., ROVERI, A., COASSIN, M. & URSINI, M. Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2267-2271, 1988.

MAKROPOULOS, V., BRUNING, T. & SCHULZEOSTHOFF, K. Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV-1 LTR promoter activity. *Arch. Toxicol.*, 70: 277-283, 1996.

MARIS, A.F., ASSUMPÇÃO, A.L.K., BONATTO, D., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces*

*cerevisiae* is not an adaptative stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics*, 39: 137-149, 2001.

MARIS, A.F., KERN, A.L., PICADA, J.N., BOCCARDI, F., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. Glutathione, but not transcription factor Yap, is required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 37: 175-182, 2000.

MARKOWITSCH, H. Varieties of memory: systems, structures, mechanisms of disturbance. *Neurol. Psychiatry Brain Res.*, 5: 49-68, 1997.

MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215, 1983.

MARTIN, L.J. & LIU, Z. DNA damage profiling in motor neurons: a single-cell analysis by comet assay. *Neurochem Res.*, 27(10): 1093-104, 2002.

MCGAUGH, J.L. Memory - a century of consolidation. *Science*, 287:248-251, 2000.

MCGAUGH, J.L. & IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21: 208-210, 2000.

MELLER, C.A., HENRIQUES, J.A.P., SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. The bombensin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801 –induced stereotypy in mice. *Peptides*, 25: 585-588, 2004.

MELO, A.A., QUEROL, C.B., HENRIQUES, A.T. & HENRIQUES, J.A.P. (1986) Cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects of vincristine and indole alkaloid in wild-type and repair- deficient yeasts. *Mutat. Res.*, 171: 17-24, 1986.

MEOTTI, F.C., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W. & ROCHA, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.*, 94: 276-282, 2004.

MEOTTI, F.C., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. & NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. *Toxicology Lett.*, 143: 9-16, 2003.

MEUILLET, E. STRATTON, S., CHERURUKURI, D.P., GOULET, A-C., KAGEY, H., PORTERFIELD, B. & NELSON, M.A. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. *J. Cell Biochem.*, 91: 443-458, 2004.

MILNER, J.A. & HSU, J.A. Inhibitory effect of selenium on the growth of L1210 leukemic cells. *Cancer Res.*, 41: 1652-1656, 1981.

MORENO, P.R.H., VARGAS, V.M.F., ANDRADE, H.H.R., HENRIQUES, A.T., & HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mutat. Res.*, 260: 145-152, 1991.

MORETTO, M.B., ROSSATO, J.I., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. & ROCHA, J.B.T. Voltage-dependent ebselen and diorganochalcogenides inhibition of  $45 \text{ Ca}^{+2}$  influx into brain synaptosomes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17:154-160, 2003.

MORETTO, M.B., FUNCHAL, C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. & PESSOA-PUREUR, R. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology*, 210: 213-222, 2005.

MORRIS, E.J., DREIXLER, J.C., CHENG, K.Y., WILSON, P.M., GIN, R.M. & GELLER, H.M. Optimization of single-cell gel electrophoresis (SCGE) for quantitative analysis of neuronal DNA damage. *Biotechniques*, 26(2): 282-3, 286-289, 1999.

MORTELMANS, K. & ZEIGER, E. The *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455: 29-60, 2000.

MOUSTACCHI, E. DNA repair in yeast: genetic control and biological consequences. In: *Advances in radiation research*. New York, Academic Press, pp. 1-30, 1987.

MOXON, A.L. & RHIAN, M. Selenium poisoning. *Physiol. Rev.*, 23: 305-337, 1943.



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

MUGESH, G., PANDA, A., SINGH, H., PUNEKAR, N. & BUTCHER, R. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 839-850, 2001b.

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

MULLER, A., GABRIEL, H. & SIES, H. A novel biologically active seleno-organic compound – IV. Protective glutathione-dependent effect of PZ51 (Ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 1185-1189, 1985.

MÜLLER, L. & SOFUNI, T. Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:202-205, 2000.

NEVE, J. Physiological and nutritional importance of selenium. *Experientia*, 47: 187-193, 1991.

NICKOLOFF, C. & HOEKSTRA, M. *DNA damage and repair*, Human Press, Totowa, New Jersey, USA, 1998.

NOGUEIRA, C.W., ROTTA, L.N., PERRY, M.L., SOUZA, D.O. & ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.*, 906: 157-163, 2001.

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

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

NOGUEIRA, C.W., QUINHONES, E.B., JUNG, E.Q., ZENI, G. & ROCHA, J.B.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.*, 52(2): 56-63, 2003c.

NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. & ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.*, 104(12): 255-285, 2004.

OGRA, Y., ISHIWATA, K., TAKAYAMA, H., AIMI, N. & SUZUKI K, T. Identification of a novel selenium metabolite, Se-methyl-N-acetylselenohexosamine, in rat urine by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 767(2): 301-312, 2002.

PAGMANTIDIS, V., BERMANO, G., VILLETTE, S., BROOM, I., ARTHUR, J. & HESKETH, J. Effects of Se-depletion on glutathione peroxidase and selenoprotein W gene expression in the colon. *FEBS Lett.*, 579: 792–796, 2005.

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

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

PAULMIER, C. *Selenium reagents and intermediates in organic synthesis*. Oxford, U.K.: Pergamon Press; 1986.

PASQUAL, M., LAUER, C., MOYNA, P. & HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mutat. Res.* 286: 243-252, 1993.

PAULA-RAMOS, A.L.L., QUEROL, C., MARQUES, E.K. & HENRIQUES, J.A.P. Cytotoxic activation of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is caused by repairable DNA damage. *Rev. Bras. Genet.*, 14: 897-912, 1991.

PENRITH, M.L. Acute selenium toxicosis as a cause of paralysis in pigs. *J.S. Afr. Vet. Assoc.*, 66: 47-48, 1995.

PICADA, J.N. Efeitos da apomorfina e de um produto derivado de sua autoxidação em diferentes modelos biológicos. Tese de Doutorado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, 2003.

PORCIÚNCULA, L.O., ROCHA, J.B.T., CIMAROSTI, H., VINADÉ, L., GHISLENI, G., SALBEGO, C.G. & SOUZA, D.O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immuncontent of inducible nitric oxide synthase. *Neurosci. Lett.*, 346: 101-104, 2003.

PORCIUNCULA, L., ROCHA, J.B.T., BOECK, C., VENDITE, D. & SOUZA D. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.*, 299: 217-220, 2001.

PORCIUNCULA, L. Derivados da guanina e ebselen: mecanismos de neuroproteção envolvendo o sistema glutamatérgico. Tese de Doutorado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, 2003.

POWELL, S.B., NEWMAN, H.A., PENDERGAST, J.F. & LEWIS, M.H. A rodent model of spontaneous stereotypy: initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiol. Behav.*, 66: 355-363, 1999.

PRESTI, M.F., POWELL, S.B. & LEWIS, M.H. Dissociation between spontaneously emitted and apomorphine- induced stereotypy in *Peromyscus maniculatus bairdii*. *Physiol. Behav.*, 75: 347-353, 2002.

PROHASKA, J.R. & GANTHER, H.E. Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain. *J. Neurochem.*, 27(6): 1379-87, 1976.

PUNGARTNIK, C., PICADA, J. N., BRENDEL, M. B. & HENRIQUES, J. A. P. Further phenotypic characterization of pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and response to oxidative stress. *Genet. Mol. Res.*, 1(1):179-189, 2002.

RAMAEKERS, V.T., CALOMME, M., VANDEN BERGHE, D. & MAKROPOULOS, W. Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics*, 25(4): 217-23, 1994.

RAY, J., ALTENBURG, J. & JACOBS, M. Effects of sodium selenite and methyl methanesulphonate or N-hydroxy-2-acetylaminofluorene co-exposure on sister chromatid exchange production in human blood cultures. *Mutat. Res.*, 102: 285-296, 1978.

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

RAYMAN, M.P. The argument for increasing selenium intake. *Proc. Nutr. Soc.*, 61: 203-240, 2002.

REDDY, B.S., HIROSE, Y., LUBET, R.A., STEELE, V.E., KELLOFF, G.J. & RAO, C.V. Lack of chemopreventive efficacy of DL-selenomethionine in colon carcinogenesis. *Int. J. Mol. Med.*, 5: 327-330, 2000.

REILLY, C. Selenium: A new entrant into the functional food arena. *Trends Food Sci. Tech.*, 9: 114-118, 1998.

RIDLEY, R.M. The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Prog. Neurobiol.*, 44: 221-231, 1994.

ROESLER, R., VIANNA, M.R.M., SANT' ANNA, M.K., KUYVEN, C.R., KRUEL, A.V.S., QUEVEDO, J. & FERREIRA, M.B.C. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 69: 87-91, 1998.

ROESLER, R., VIANNA, M.R.M., PARIS, F. & QUEVEDO, J. Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 72: 252-58, 1999.

ROESLER, R., VIANNA, M.R.M., LARA, D., IZQUIERDO, I., SCHMIDT, A.P. & SOUZA, D.O. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *Neuroreport*, 11: 2537-2540, 2000.

- ROSA, R.M., FLORES, D.G., APPELT, H.R., BRAGA, A.L., HENRIQUES, J.A.P. & ROESLER, R.. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neuroscience Letters*, 341, 217-220, 2003.
- ROSA, R.M., SULZBACHER, K., PICADA, J.N., ROESLER, R., SAFFI, J., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A., 2004. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutat. Res.*, 563: 107–115, 2004.
- ROSA, R.M., OLIVEIRA, R.B., SAFFI, J., BRAGA, A.L., ROESLER, R., DAL-PIZZOL, F., MOREIRA, J.C.F., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sci.*, 77: 2398–2411, 2005.
- ROSSATO, J., KETZER, L., CENTURIÃO, F., SILVA, S., LUDTKE, D., ZENI, G., BRAGA, A.L., RUBIN, M. & ROCHA, J.B.T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.*, 27: 297-303, 2002.
- ROTRUCK, J.T., POPE, A.L., GANTHER, H.E., SWANSON, A.B., HAFEMAN, D.G. & HOESTRA, W.G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 558-560, 1973.
- RUBIN, J.J. & WILLMORE, L.J. Prevention of iron-induced epileptiform discharges in rats by treatment with antiperoxidants. *Exp. Neurol.*, 67(3): 472-80, 1980.
- SAITO, L., ASANO, T., SANO, K., TANAKURA, K., ABE, H., YOSHIMOTO, T., KIKUCHI, H., OHTA, T. & ISHIBASHI, S. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 42: 269-278, 1998.
- SANCHEZ, V., ZEINI, M., CAMARERO, J., O'SHEA, E., BOSCA, L., GREEN, A.R. & COLADO, M.I. The nNOS inhibitor, AR-R17477AR, prevents the loss of NF68 immunoreactivity induced by methamphetamine in the mouse striatum. *J. Neurochem.*, 85(2): 515-524, 2003.

SASAKI, Y.F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K. & TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.*, 519: 103–119, 2002.

SAUVAIGO, S., SERRES, C.; SIGNORINI, N.; EMONET, N.; RICHARDSON, M. J. & CADET, J. Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry*, 259: 1-7, 1998.

SAVASKAN, N.E., BRAUER, A.U., KUHbacher, M., EYUPOGLU, I.Y., KYRIAKOPOULOS, A., NINNEMANN, O., BEHNE, D. & NITSCH, R. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *FASEB J.*, 17(1): 112-114, 2003.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen- an antiinflammatory antioxidant. *Gen. Pharmac.*, 26: 1153-1169, 1995.

SCHOMBURG, L., SCHWEIZER, U., HOLTMANN, B., FLOHE, L., SENDTNER, M. & KOHRLE, J. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.*, 370: 397-402, 2003.

SCHOMBURG, L., SCHWEIZER, U. & KOHRLE, J. Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(16): 1988-1995, 2004.

SCHWARZ, K. & FOLTZ, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary liver degeneration. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79: 3292-3293, 1957a.

SCHWARZ, K. & FOLTZ, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Nutrition*, 15: 255-264, 1957b.

SCHWEIZER, U., BRÄUER, A.U., KÖHRLE, J., NITSCH, R. & SAVASKAN, N.E. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res. Rev.*, 45: 164-178, 2004a.

SCHWEIZER, U., SCHOMBURG, L. & SAVASKAN, N.E. The neurobiology of selenium: lessons from transgenic mice. *J. Nutr.*, 134: 707-710, 2004b.

SEKIHASHI, K., YAMAMOTO, A., MATSUMURA, Y., UENO, S., WATANABE-AKANUMA, M., KASSIE, F. & KNASMULLER, S., TSUDA, S., SASAKI, Y.F. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat. Res.*, 517: 53-75, 2002.

SEKO, Y., SAITO, Y., KITAHARA, J. & IMURA, N. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione *in vitro*. In: Wendel, A., ed. *Selenium in biology and medicine*. Westport, CT: AVI Publishing Co, 1989.

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

SHAMBERGER, R.J. & WILLIS, C.E. Selenium distribution and human cancer mortality. *C.E. CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2: 211-221, 1971.

SHAMBERGER, R.J., TYTKO, S.A. & WILLIS, C.E. Antioxidants and cancer part IV: selenium and age-adjusted human cancer mortality. *Arch. Environ. Health*, 31: 231-235, 1976.

SHELBY, M. & WITT, K. Comparison of results from mouse bone marrow C.A. and M.N. tests. *Environ. Mol. Mutagen.*, 25: 302-313, 1995.

SIES, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Rad. Biol. Med.*, 14: 313-323, 1993.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. & SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191, 1988.

SINGH, N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.*, 455: 111-127, 2000.

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

SPEIT, G. & HARTMANN, A. The Comet assay (single-cell gel test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.*, 113: 203-212, 1999.

STAHL, A., ANUNDI, I. & HOGBERG, J. Selenite biotransformation to volatile metabolites in an isolated hepatocyte model system. *Biochem. Pharm.*, 33: 1111-1117, 1984.

STANDMAN, T.C. Discoveries of vitamin B<sub>12</sub> and selenium enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 71: 1-16, 2002.

STANDMAN, T.C. Selenocysteine. *Ann. Rev. Biochem.*, 65: 83-100, 1996.

STAPLETON, S.R., GARLOCK, G.L., FOELLMY-ADAMS, L. & KLETZIEN, R.F. Selenium: potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1355(3): 259-269, 1997.

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

TAKASAGO, T., PETERS, E.E., GRAHAM, D.I., MASAYASU, H. & MACRAE, I.M. Neuroprotective efficacy of ebselen an antioxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Br. J. Pharmacol.*, 122: 1251-1256, 1997.

THIRUNAVUKKARASU, C. & SAKTHISEKARAN, D. Sodium selenite, dietary micronutrient, prevents the lymphocyte DNA damage induced by N-nitrosodiethylamine and phenobarbital promoted experimental hepatocarcinogenesis. *J. Cell. Biochem.*, 88(3): 578-588, 2003.

THOMPSON, H.J. Selenium as an anticarcinogen. *J. Agric. Food Chem.*, 32: 422-425, 1984.

THOMPSON, R.F. & KIM, J.J. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 13438–13444, 1996.



TICE, R.R., ORMISTON, B.G., BOUCHER, R., LUKE, C.A. & PAQUETTE, D.S. Environmental biomonitoring with feral rodent species. *Application of short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures* (Sandhu, S., Waters, M., Eds) Plenum Publishing Co., New York, pp.175-180, 1988.

TICE, R.R., HAYASHI, M., MACGREGOR, J.T., ANDERSON, D., BLAKEY, D., HOLDE, H.E., KIRSCH-VILDERS, M., OLESON Jr, F.B., PACCHIEROTTI, F., PRESTON, R.J., ROMAGNA, R., SHIMADA, H., SUTOU, S. & VANNIER, B. Report from working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutat. Res.*, 312: 305-312, 1994.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, D., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C. & SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221, 2000.

TSEN, C.C. & TAPPEL, A.A. Catalytic oxidation of glutathione and other sulphydryl compounds by selenite. *J. Biol. Chem.*, 233(5): 1230-1232, 1958.

URSINI, F., MAIORINO, M., VALENTE, M., FERRI, K. & GREGOLIN, C. Purification by pig liver of a protein which protects liposomes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxidase. *Biochem. Biophys. Acta*, 710: 197-211, 1982.

URSINI, F., HEIM, S., KIESS, M., MAIORINO, M., ROVERI, A., WISSING, J. & FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 285: 1393-1396, 1990.

VADDADI, K.S., SOOSAI, E. & VADDADI, G. Low blood selenium concentrations in schizophrenic patients on clozapine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 55: 307-309, 2003.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160(1): 1-40, 2006.

VALVERDE, M., FORTOUL, T.I., DIAZ-BARRIGA, F., MEJIA, J. & DEL CASTILLO, E.R. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis*, 17: 55-61, 2002.

VERNIE, L.N. Selenium in carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 78: 203-217, 1984.

VON BORSTEL, R.C., CAIN, K.T. & STEINBERG, C.M. Inheritance of spontaneous mutability in yeast. *Genetics*, 69: 17-27, 1971.

VIANNA, M. R. M., IZQUIERDO, L. A., BARROS, D. M., WALZ, R., MEDIAN, J. H. & IZQUIERDO, I. Short- and long term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 72: 353-364, 2000.

WALZ R., LENZ G., ROESLER R., VIANNA M.R.M., MARTINS V., BRENTANI R., RODNIGHT R. & IZQUIERDO I. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *Eur. J. Neurosci.*, 12: 2185-2189, 2000.

WATERS, M.D., STACK, H.F. & JACKSON, M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutat. Res.*, 437: 21-49, 1999.

WEBER, G.F., MAERTENS, P., MENG, X.Z. & PIPPENGER, C.E. Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet*, 337: 1443-1444, 1991.

WEISBURGER, J.H. Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future. *Mutat. Res.*, 480-481: 23-35, 2001.

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

WHANGER, P.D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J. Am. Coll. Nutr.*, 21: 223-232, 2002.

WHANGER, P.D. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Brit. J. Nutr.*, 91: 11-28, 2004.

WHITING, R., WEI, L. & STICH, H. Unscheduled DNA synthesis and chromosome aberrations induced by organic selenium compounds in presence of glutathione. *Mutat. Res.*, 78: 159-169, 1980.

WILLMORE, L.J. & RUBIN, J.J. Antiperoxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. *Neurology*, 31(1): 63-69, 1981.

WINGLER, K. & BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. *Biofactors*, 10: 245-249, 1999.

YAMAGUCHI, T., SANO, K., TAKAKURA, K., SAITO, I., SHINOHARA, Y., ASANO, T. & YASUHARA, H. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled double blind clinical trial. *Stroke*, 29: 12-17, 1998.

YAN, L. & SPALLHOLZ, J. Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. *Biochem. Pharmacol.*, 45: 429-437, 1993.

ZAFAR, K.S., SIDDIQUI, A., SAYEED, I., AHMAD, M., SALIM, S. & ISLAM, F. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J. Neurochem.*, 84(3): 438-46, 2003.

ZASSO, F.B., GONCALES, C.E.P., JUNG, E.A.C., ARALDI, D., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. & NOGUEIRA, C.W. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19: 283-289, 2005.

ZIMMERMANN, F. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, 31: 71-86, 1975.

ZIMMERMANN, F.K. & SCHEEL, I. Genetic effects of 5-azacytidine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.*, 139(1): 21-24, 1984.

**ANEXO 1**

**CARTA EDITOR PERÍODICO**

Dear Mrs Machado,

The PDF for your submission, "An organic selenium compound blocks apomorphine-induced stereotypy in mice." is ready for viewing.

Your submission must be approved in order to complete the submission process and send the manuscript to the Neuroscience Letters editorial office.

Thank you for your time and patience.

Erin LaBonte-McKay  
Journal Manager, Neuroscience Letters  
Email: [nsl@elsevier.com](mailto:nsl@elsevier.com)

## ANEXO 2

### *CURRICULUM VITAE*

**MACHADO, M.S.**

Dados Pessoais:

Nome: Miriana da Silva Machado

Local e data de nascimento: Bagé, RS, Brasil, 17 de julho de 1981

Endereço Profissional: GENOTOX – Laboratório de Genotoxicidade, Centro de Biotecnologia, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale - UFRGS. POA-RS

Telefone Profissional: 51 33166069

E-mail: miriana@cbiot.ufrgs.br

Formação Acadêmica:

Universidade da Região da Campanha (URCAMP) Bagé – RS

Curso de Farmácia

Término: Dez / 2001

Estágio:

- Instituição: GENOTOX – Laboratório de Genotoxicidade, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Área de atuação: Estágio voluntário prático na área de Genotoxicidade (resíduos, água, solo, fármacos).

Período: fevereiro de 2002 - abril de 2004.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Prêmio:

- Menção Honrosa concedida pela Federação de Sociedades de Biologia Experimental pelo trabalho “Avaliação da atividade genotóxica do composto 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto” apresentado na XX Reunião Anual FeSBE, Águas de Lindóia – SP, 2005.

Trabalhos resumidos publicados em anais de eventos:

- FRANKE, S.I.R., PRÁ, D., SCHARLAU, A., CASSINI, C., MACHADO, M.S., MANTESE, C., JAEGER, J.P., ERDTMANN, B., SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P., PETKOWICZ, R. Dano em ADN y estrés oxidativo em remeros. In: VI Congreso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, XIV Congreso Argentino de Toxicología, Mendoza – Argentina, 2005.
- MACHADO, M.S., DANTAS, A.S., BRAGA, A.L., ROESLER, R., HENRIQUES, J.A.P. Avaliação da atividade genotóxica do composto 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto pelo ensaio cometa em sangue periférico de camundongos In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre. VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS - Livro de Resumos, 2005.
- PREISLER, T., WEDOY, M., MACHADO, M.S., DANTAS, A.S., REOLON, G.K., SCHWARTSMANN, G., HENRIQUES, J.A.P., ROESLER, R. Avaliação de danos no DNA induzidos por um inibidor da Topoisomerase I em células cerebrais de camundongos. In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre. VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS - Livro de Resumos, 2005.

- FRANKE, S.I.R., PRÁ, D., SCHARLAU, A., CASSINI, C., MACHADO, M.S., MANTESE, C., JAEGER, J.P., ERDTMANN, B., SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P., PETKOWICZ, R. Dano no DNA e estresse oxidativo em remadores. In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre. VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS - Livro de Resumos, 2005.
- SHARLAU, A., CASSINI, C., HENRIQUES, J.A.P., SALVADOR, M., MACHADO, M.S., PETKOWICZ, R., FRANKE, S.I.R., PRÁ, D. Dano no DNA e estresse oxidativo em remadores. In: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UCS. Santa Cruz do Sul, 2005.
- SCHARLAU, A., PRÁ, D., CASSINI, C., MACHADO, M.S., MANTESE, C., JAEGER, J.P., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P., SALVADOR, M., PETKOWICZ, R., FRANKE, S.I.R. Dano no DNA e estresse oxidativo em remadores. In: XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica - UFRGS, 2005.
- SCHULER, A.D., REOLON, G.K., MACHADO, M.S., CAMASSOLA, M., BRAGA, L.M., HENRIQUES, J.A.P., NARDI, N., ROESLER, R. Avaliação de danos no DNA em células cerebrais de camundongos IDUA<sup>-/-</sup>, um modelo genético de Mucopolissacaridose do tipo I. In: XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica - UFRGS, 2005.
- MACHADO, M.S., DANTAS, A.S., BRAGA, A.L., ROESLER, R., HENRIQUES, J.A.P. Avaliação da atividade genotóxica do composto 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto. In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia – SP, 2005 v.19.
- MACHADO, M.S., DANTAS, A.S., BRAGA, A.L., HENRIQUES, J.A.P., ROESLER, R. 3'3-ditrifluormetildifenil disseleneto bloqueia a estereotipia induzida por apomorfina em camundongos. In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia – SP, 2005, v.19.

- MACHADO, M.S., DANTAS, A.S., MELLER, C., APPELT, H.R., BRAGA, A.L., ROESLER, R., HENRIQUES, J.A.P. Avaliação das atividades genotóxicas e neurocomportamentais do composto disseleneto de 3'3-ditrifluormetildifenila. In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2004, Porto Alegre-RS. VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS - Livro de Resumos, 2004.
  
- MACHADO, M.S., PICH, C.T., APPELT, H.R., BRAGA, A.L., HENRIQUES, J.A.P. *Salmonella*/microsome and comet assay- based evaluation on the mutagenic activity of chiral organosulfuric amino acid derivatives. In: 4<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, 2003, Florianópolis. Genetics and Molecular Biology. Ribeirão Preto, SP: Editorial and business office, 2003. v.26.