

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“EFEITO INIBITÓRIO DE FORMAS ORGÂNICAS E INORGÂNICAS DE SELÊNIO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA  $\delta$ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE DE FÍGADO E BRÂNQUIAS DE PEIXE – JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) E DE FÍGADO DE RATO (*Rattus norvegicus*)“*IN VITRO*”**

**ALFÉRIO CLARISNEY BÖETTCHER**

**ORIENTADOR**

**PROF. DR. JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.**

**Porto Alegre**

**2001**

A DEUS  
pela vida, cujo  
desvendar é o objetivo  
de nosso trabalho e pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha, pela motivação, compreensão e apoio sem o que não teria sido possível concluir o presente trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que tão gentilmente se dispuseram a administrar suas aulas na Universidade Federal de Santa Maria.

Aos professores do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Maria, pelo apoio e auxílio na execução dos experimentos, em especial à Prof<sup>ra</sup>. Cristina Pereira.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Toxicológica do Prof. João Batista, principalmente ao Félix e a Viviane que auxiliaram nos experimentos desenvolvidos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica pela amizade.

A minha esposa Cecília, pela compreensão, conselhos e motivação sem os quais não teria vencido esta tarefa.

A meus pais pela minha educação e pela sua lição de vida

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MEU AGRADECIMENTO

---

Alférico Clarisney Böettcher

## SUMÁRIO

	Página
<b>1.0 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 - Enzima delta -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D).....	1
1.1.1 – Aspectos gerais.....	1
1.1.2 – Funções bioquímicas.....	1
1.1.3 – Natureza sulfidrílica.....	3
1.1.4 – Histórico e estrutura.....	4
1.1.5 – Cofatores inorgânicos.....	5
1.1.6 – Mecanismo geral de catálise.....	7
1.1.7 – Importância toxicológica da $\delta$ -ALA D.....	9
1.2 – Selênio.....	13
1.2.1 – Histórico .....	13
1.2.2 – Necessidades nutricionais.....	14
1.2.3 - O selênio nos ambientes aquáticos.....	16
1.2.4 - Origem do selênio nos ambientes aquáticos.....	20
1.2.5 – Propriedades químicas relacionadas aos sistemas biológicos.....	21
1.2.6 – Selenoproteínas.....	23
1.2.7 – Toxicologia.....	25
1.2.8 – Selênio e peixes.....	27
1.2.9 – Deficiência .....	33
1.2.10 – Selênio, $\delta$ -ALA D e síntese do heme.....	34
1.3 - Objetivos... ..	36

<b>2.0 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
2.1 – Reagentes e equipamentos .....	38
2.1.1 – Reagentes .....	38
2.1.2 - Equipamentos .....	39
2.2– Animais experimentais.....	39
2.3 – Preparação do tecido animal .....	40
2.4 – Purificação parcial da $\delta$ -ALA D .....	40
2.5 – Determinação da atividade da $\delta$ -ALA D .....	41
2.6 – Síntese dos compostos orgânicos de selênio.....	41
2.7 – Determinação da taxa de oxidação do DTT.....	42
2.8 - Fracionamento dos homogeneizados por centrifugação diferencial.....	44
2.9 – Determinação de proteínas .....	45
2.10 – Determinação de IC <sub>50</sub> .....	45
2.10 – Análise estatística .....	45
<b>3.0 – RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
3.1 - Efeito de formas orgânicas e inorgânicas de selênio sobre a atividade da $\delta$ -ALA-D " <i>in vitro</i> " em fígado e brânquias de peixe e fígado de rato.....	46
3.2 - Papel protetor do DTT na inibição da atividade da enzima $\delta$ -ALA-D por compostos de selênio.....	49
3.3 - Papel protetor do DTT na inibição da atividade da enzima $\delta$ -ALA-D por compostos de selênio (II) .....	53

3.4 - Efeito do disseleneto de difenila ( $\text{PhSe}$ ) <sub>2</sub> sobre a velocidade de oxidação de DTT, na ausência e presença de fontes enzimáticas.....	60
3.5 - Efeito do selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) sobre a velocidade de oxidação de DTT, na ausência e presença de fontes enzimáticas.....	62
3.6 - Efeito do disseleneto de dibutila ( $\text{BuSe}$ ) <sub>2</sub> sobre a velocidade de oxidação de DTT, na ausência e presença de fontes enzimáticas.....	70
3.7 - Efeito de frações sub-celulares obtidas por centrifugação diferencial de homogeneizado de fígado de rato sobre a velocidade de oxidação de DTT .....	72
3.8 - Efeito de frações sub-celulares obtidas por centrifugação diferencial de homogeneizado de fígado de peixe sobre a velocidade de oxidação de DTT .....	79
<b>4.0 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>5.0 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>6.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 01 – Condensação assimétrica de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico catalizado pela enzima $\delta$ - ALA D.....	11
Figura 02 – Via de biossíntese de compostos tetrapirrólicos.....	12
Figura 03 - Ciclo do selênio em ecossistemas aquáticos. Rota de exposição de peixes.....	18
Figura 04 – Modelo do ciclo biogeoquímico do selênio no Lago Macquarie .....	19
Figura 05 - Efeito inibitório de formas orgânicas de selênio sobre a atividade da $\delta$ -ALA-D de fígado e brânquias de peixe e de fígado de rato. ....	48
Figura 06 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório do disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> sobre a atividade da $\delta$ -ALA-D de fígado e brânquias de peixe.....	51
Figura 07 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório do selenito de sódio (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ) sobre a atividade da $\delta$ -ALA-D de brânquias de peixe.....	52
Figura 08 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório do disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> sobre a atividade da $\delta$ -ALA-D .....	55
Figura 09 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório do disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> sobre a atividade da $\delta$ -ALA-D .....	56
Figura 10 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório de compostos	

de selênio orgânico sobre a atividade da $\delta$ -ALA-D de P55 de brânquias de peixe.....	57
Figura 11- Efeito de disseleneto de difenila ( $\text{PhSe}$ ) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	60
Figura 12- Efeito de disseleneto de difenila ( $\text{PhSe}$ ) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	61
Figura 13- Efeito do selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	64
Figura 14 - Efeito de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	65
Figura 15- Efeito de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	68
Figura 16 - Efeito de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	69
Figura 17 - Efeito de disseleneto de dibutila ( $\text{BuSe}$ ) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT , nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	71
Figura 18 - Efeito de disseleneto de difenila ( $\text{PhSe}$ ) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença de frações sub-celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	75



Figura 19 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença de frações sub-celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	76
Figura 20 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença de frações sub-celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	77
Figura 21 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença de frações sub-celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	78
Figura 22 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença de frações sub-celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	83
Figura 23 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença de frações sub-celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	84
Figura 24 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença de frações sub-celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....	85

Figura 25 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença de frações sub-celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.....86

**ÍNDICE DE TABELAS**

	<b>Página</b>
Tabela 1 – Íons metálicos requeridos/octâmero para atividade máxima da $\delta$ -ALA D. ....	07
Tabela 2 – Concentrações máximas de selenio sem efeitos tóxicos em peixes.....	31
Tabela 3 – Concentrações a partir das quais foram observado efeitos tóxicos em peixes.....	32

## ABREVIATURAS

ALA – ácido delta-aminolevulinico, ácido 5'aminulevulinico ou delta aminolevulinato.

$\delta$ -ALAD – delta-aminolevulinato desidratase, porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase.

DTNB – ácido 5-5'didiobis(2-nitobenzóico)= reagente de Ellman.

DTT – DL-ditiotreitol.

EDTA – ácido etilenodiaminotetraácetico.

EP – erro padrão.

GSH – glutatião reduzido.

PBG – porfobilinogênio.

TCA – ácido tricloroacético.

## RESUMO

A enzima estudada no presente trabalho é delta-aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA D), uma enzima sulfidrílica, cuja atividade pode ser inibida por uma variedade de agentes bloqueadores de grupos tiólicos. A reação catalisada pela  $\delta$ -ALA D (formação do composto monopirrólico porfobilinogênio) faz parte da rota de síntese de compostos tetrapirrólicos como o grupamento heme, conseqüentemente a inibição desta enzima implica em alterações patológicas decorrentes da inibição da rota de biossíntese do heme e ainda resultar no acúmulo do substrato ALA, o qual pode ter atividade pró oxidante por estar envolvido na produção de espécies ativas de oxigênio

Avaliou-se a susceptibilidade da  $\delta$ -ALA D de fígado de peixe e rato frente a inibição por selênio orgânico e inorgânico. Os resultados demonstraram claramente que a enzima  $\delta$ -ALA D de peixes e mamíferos é susceptível a inibição “*in vitro*” por compostos orgânicos e inorgânicos de selênio.

A análise comparativa demonstrou que a enzima  $\delta$ -ALA D de peixes é mais resistente a inibição por selênio em relação a de mamíferos. Todavia não foi possível esclarecer as causas deste diferente comportamento. Os resultados demonstraram que o sistema de hidroxilação previamente descrito em ratos que acelera cataliticamente a oxidação de DTT na presença de disselenetos também ocorre em tecidos de peixe. Neste sistema estão envolvidos fatores enzimáticos, uma vez que este efeito foi anulado pela desnaturação térmica do sobrenadante.

O presente trabalho mostra que a enzima  $\delta$ -ALA D de peixes e ratos é sensível a inibição; *in vitro*, por composto de selênio orgânico e inorgânico. A manutenção dos grupos SH do sítio ativo da enzima no estado reduzido é essencial para a ação catalítica da

$\delta$ -ALA D. A inibição da  $\delta$ -ALA D causada por selênio orgânico ( (PhSe<sub>2</sub>) e (BuSe<sub>2</sub>)) e selênio inorgânico (selenito de sódio) é prevenida por DTT. Estes resultados indicam que o selênio orgânico e inorgânico inibe a  $\delta$ -ALA D por oxidação de grupos tióis essenciais da enzima.

A inibição desta enzima e conseqüentes alterações na rota de síntese de tetrapirróis podem ser responsáveis pelos efeitos tóxicos de selenetos orgânicos e inorgânicos em peixes e outros animais. Em peixes os efeitos toxicos mais relatados referem-se a deficiências reprodutivas, principalmente na redução da sobrevivência larval. Coincidentemente os ovários são o local de maior acumulação de selênio nos tecido de peixe e o desenvolvimento larval exige intensa atividade da enzima  $\delta$ -ALA D.

## ABSTRACT

The enzyme studied in the present work is delta-aminulevulinic dehydratase ( $\delta$ -ALA D), a sulfhydryl-containing enzyme, which is inhibited by a variety of thiol-blocking agents. The reaction catalyzed by  $\delta$ -ALA D (formation of porphobilinogen) is the second step of synthesis of tetrapyrrolic compounds, including heme. Consequently inhibition of this enzyme can result in pathological alterations of biosynthesis heme and accumulation of the substrate ALA, which have pro oxidant activity, and can be involved in the over production of reactive oxygen species.  $\delta$ -ALA D susceptibility to inhibition by organic and inorganic selenium compounds was evaluated in fish and rat liver. The results clearly showed that the enzyme  $\delta$ -ALA D from fish and mammals are sensitive to inhibition, *in vitro*, by organic and inorganic compounds of selenium. The comparative analysis showed that  $\delta$ -ALA D from fish is more resistant to the inhibition by selenium in than rat enzyme. Though it was not possible to determine the causes of this different behavior, the results showed that the hydroxylating system previously described in rats, which catalytically accelerates the oxidation of DTT in the presence of  $(\text{PhSe})_2$ , is also present in fish. The catalytic factor is termolabile, suggesting the involvement of an enzyme. The capacity of inorganic selenium (sodium selenite) oxidize  $-\text{SH}$  groups of DTT was higher than that of organic selenide (diphenyl diselenide and dibuthyl diselenide) and was observed even in the absence of tissue homogenates. The increase in the rate of DTT oxidation caused by  $(\text{PhSe})_2$  and  $(\text{BuSe})_2$  is only observed in the presence of tissue homogenates.

The present work showed that the enzyme  $\delta$ -ALA D from fish and rats are sensitive to inhibition, *in vitro*, by organic and inorganic selenium. The maintenance of

SH groups of the active site in a reduced state is essential for the catalytic action of  $\delta$ -ALA D. The inhibition of  $\delta$ -ALA-D caused by organoselenides ((PhSe)<sub>2</sub> and (BuSe)<sub>2</sub>) and selenite is prevented by DTT. These results indicate that selenides and selenite inhibit ALA-D by oxidizing essential thiol groups of the enzyme. The inhibition of this enzyme and possible alterations in the synthesis of tetrapyrrolic compounds can be, at least in part, responsible for the toxicity of organic and inorganic selenium compounds in fish and other animals. In fish, the main reported toxic effects of selenium refer to reproductive deficiency, particularly in the reduction of the larval survival. Of particular importance the ovary is an organ that accumulates larger quantities of selenium in fish body and the larval development demands intense activity of the enzyme  $\delta$ -ALA D.



## 1.0 - INTRODUÇÃO:

### 1.1- Enzima delta -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D)

#### 1.1.1- Aspectos gerais:

A enzima estudada no presente trabalho é a delta-aminolevulinato-desidratase ( $\delta$ -ALA-D) (E.C.:4.2.1.24), também denominada de porfobilinogênio sintase. Esta enzima citosólica é uma metaloproteína que catalisa a formação do composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG), através da condensação e ciclização assimétrica de duas moléculas do ácido delta aminolevulinico (ALA), com perda de duas moléculas de água (GIBSON et al., 1955; JAFFE, 1995). Essa reação é parte fundamental da rota de biossíntese de tetrapirróis (JAFFE, 1995) (FIGURA 02).

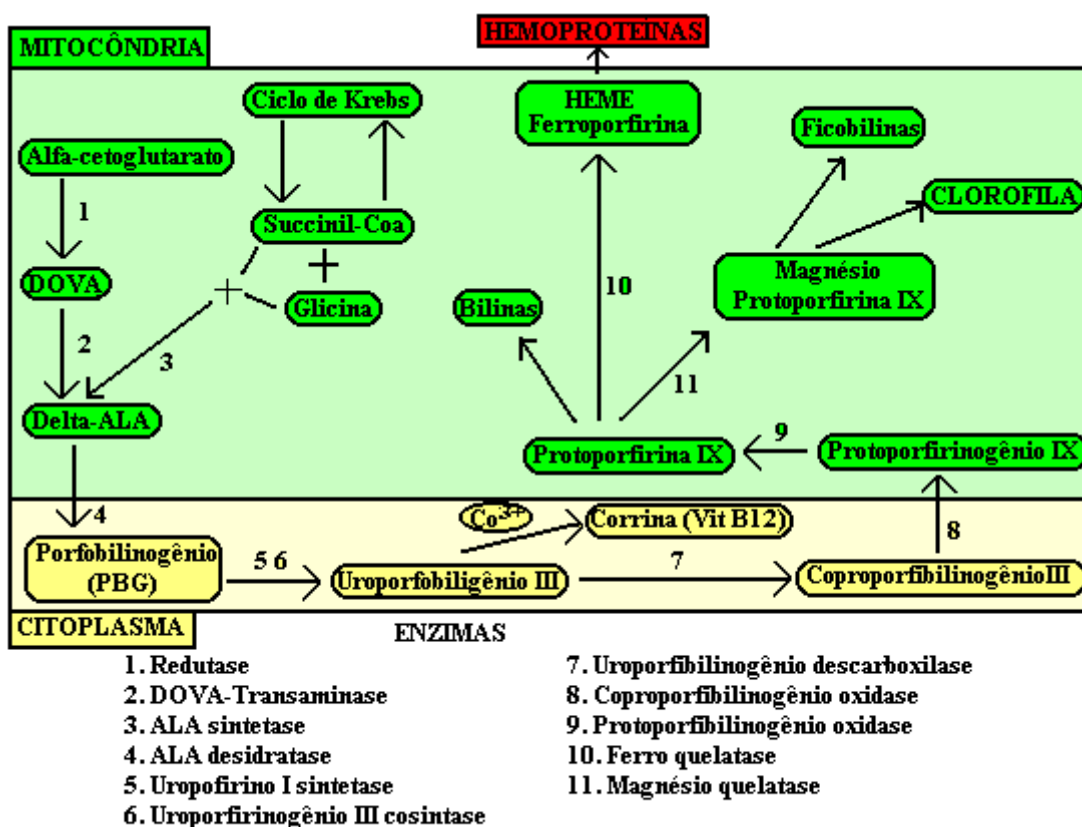


FIGURA 02 - Via de biossíntese de compostos tetrapirrólicos.

No mecanismo proposto para a síntese do porfobilinogênio, um resíduo lisil do sítio ativo da enzima forma uma base de Schiff com a primeira molécula do substrato (ALA), originando a cadeia “P” (cadeia propiônica), enquanto que uma segunda molécula do substrato da origem a cadeia lateral “A” (cadeia acética) do porfobilinogênio (FIGURA 01).

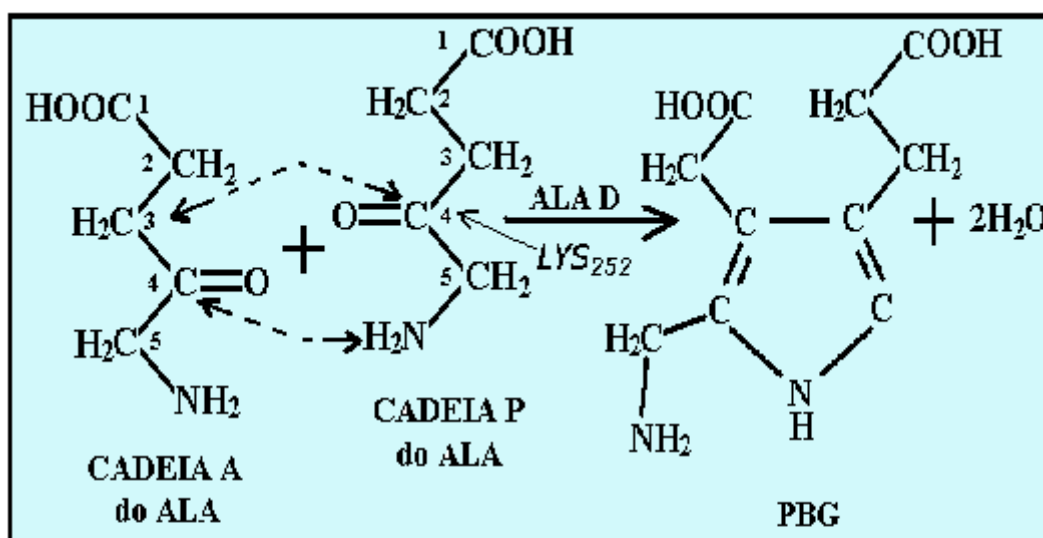


FIGURA 01 - Condensação assimétrica de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico catalizada pela enzima ALAD. Cadeia lateral P (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) do ALA, originária da primeira molécula de substrato, a qual forma a porção propionil do PBG. O nitrogênio do grupo amino desta porção é incorporado ao anel pirrólico do produto. Esta cadeia liga-se primeiro e forma uma base de Schiff com o resíduo lisil. Cadeia lateral A (CH<sub>2</sub>COOH) do ALA, originária da segunda molécula de substrato, a qual forma a porção acetil do PBG. O nitrogênio do grupo amino desta porção permanece livre.

### 1.1.2- Funções bioquímicas

Os compostos tetrapirrólicos originam o grupamento heme, clorofila, corrinas, bilinas e grupos prostéticos de várias outras proteínas desempenhando assim importante papel metabólico (CASTELFRANCO e BEATLE, 1983).

O heme (ferroporfirina) ocorre como grupo prostético da hemoglobina, mioglobina, citocromos “a”, “b” e “c”, citocromo P450, catalases, peroxidases e triptofânio pirrolase. Integrando assim a estrutura de proteínas que desempenham funções como o transporte de oxigênio, transporte de elétrons, a detoxificação e reações de oxi-redução.

As clorofilas (magnésio porfirinas) são pigmentos tetrapirrolícos amplamente distribuídos nos organismos fotossintéticos, são essências no processo de absorção de energia luminosa para a síntese de glicídios e outros produtos orgânicos celulares (NANDI et al., 1968; SHIBATA e OCHIAI, 1977).

O anel corrina integra a estrutura da vitamina B12 (cianocobalamina) a qual é sintetizada por algumas espécies de microorganismos. A vitamina B12 na função de coenzima (5'-desoxiadenosilcobalamina e metilcobalamina), participa de reações enzimáticas, tais como a metilação da homocisteína e a conversão do metilmalonil-CoA em succinil CoA.

As bilinas participam da estrutura vegetal em algas fotossintéticas.

Os compostos tetrapirrólicos encontram-se amplamente distribuídos nos seres vivos (bactérias, animais e plantas). A via de biossíntese desses compostos é semelhante em todos os seres vivos, portanto a  $\delta$ -ALA-D está presente em todos os organismos que sintetizam tetrapirróis.

Embora a etapa principal de controle (regulação) da síntese do heme pareça estar na síntese do ácido 5-aminolevulinico (reação catalizada pela enzima ALA-sintetase), algumas evidências indicam que a  $\delta$ -ALA-D também pode ser um ponto importante de regulação da via de síntese do heme em leveduras (BORALHO et al., 1989; BORRALHO, 1990). Uma evidência que aponta para a importância da  $\delta$ -ALA-D no metabolismo do heme foi obtida em trabalhos clássicos que mostram a inibição da enzima por chumbo, resultando no acúmulo de ALA e na deficiência de síntese do heme.

Recentemente dados obtidos no laboratório de BECHARA (1993) e colaboradores sugerem fortemente que o acúmulo de ALA formado pela inibição da  $\delta$ -ALA D pode ter um efeito pró-oxidante levando a formação de radicais livres nos tecidos afetados. Uma função adicional da enzima foi apresentada nos trabalhos de GUO et al., (1994) que sugerem que a  $\delta$ -ALA-D é idêntica ao inibidor de proteossoma de 240-Kda (CF-2), fator que estaria relacionado com a degradação de proteínas anormais, fatores de transcrição, processamento de antígenos, oncoproteínas e ciclinas.

### **1.1.3- Natureza sulfidrílica**

Uma característica importante da  $\delta$ -ALA D é a essencialidade de grupos –SH para sua ação catalítica (TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980). Assim, a manutenção desses grupos no estado reduzido é fundamental para a atividade da enzima. A  $\delta$ -ALA-D é altamente sensível a agentes bloqueadores de grupos tiólicos tais como o N-etilmaleimida (NEM), iodoacetato, iodoacetamida (IAM) e ácido 5-5' ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (BARREIRO, 1967; BATLLE et al., 1967; BARNARD et al., 1977), e metais de transição que apresentam alta afinidade por grupos –SH tais como mercúrio (ROCHA et al., 1993, 1995), cádmio (RODRIGUES et al., 1989), cobre

(NELSON et al., 1981) e chumbo (GOERING & FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; GOERING, 1993; ROCHA et al., 1995).

A  $\delta$ -ALA-D purificada de eritrócitos (ANDERSON et al., 1979) e fígado de mamíferos (BARNARD et al., 1977; CHEH et al., 1973) requer a presença de agentes redutores sulfidrílicos tais como o  $\beta$ -mercaptoetanol, cisteína, glutathiona reduzida (GSH) ou ditioneitol (DTT) e  $Zn^{2+}$  para apresentar atividade máxima. A atividade é rapidamente perdida por oxidação de grupos  $-SH$  ou pela remoção do  $Zn^{2+}$ , o qual possivelmente tem um papel na manutenção de grupos  $-SH$  no estado reduzido (BEVAN et al., 1980; BEBER et al., 1998; EMANUELLI et al., 1998).

#### 1.1.4- Histórico e estrutura

A existência de uma enzima que catalisaria a conversão de  $\delta$ -ALA a PBG foi proposta por DRESEL e FALK (1953) e GRANICK e MAUZERALL (1958). Foi isolada e purificada pela primeira vez em fígado de boi por GIBSON (1955). Numerosos estudos tem sido realizados desde então em uma grande variedade de fontes enzimáticas. De fato a  $\delta$ -ALA-D encontra-se amplamente distribuída na natureza, desde microorganismos até animais e vegetais superiores. WU et al., (1973) demonstraram através de micrografia eletrônica que a enzima de fígado de boi apresenta uma estrutura cúbica octamérica com simetria diédrica ( $D_4$ ). Nas outras fontes enzimáticas parece existir estrutura semelhante. Determinações do peso molecular da delta-ALA-D octamérica revelam na maioria dos casos, um valor de cerca de 280.000 D. (TIGIER et al., 1970; WU et al., 1973; SHEMIN, 1976; FUJITA et al., 1981).

A  $\delta$ -ALA-D apresenta de acordo com suas origens uma ampla variação de pH ótimo, desde 6,2 para *Salmo gairdneri* (truta arco-íris) (HODSON et al., 1977) até 9,5 para

a levedura *Sacharomyces cerevisiae* (BARREIRO, 1967). A  $\delta$ -ALA-D de origem vegetal possui valores mais elevados de pH ótimo (em regra acima de pH 7,5) em relação a enzima de origem animal (AMAZARRAY, 1986). A enzima apresenta em geral atividade máxima "in vitro" entre 55 a 65 °C (TIGIER et al., 1968; WILSON et al., 1972; BELLINASO, 1985), contudo em algumas fontes vegetais, tem se verificado temperaturas ótimas de em torno de 40°C (AMAZARRAY, 1986). Os valores da constante de Henri-Michaelis-Menten ( $K_m$ ) variam entre 0,14 mM para a enzima de fígado de boi (GIBSON et al., 1955) até 6,6 mM para folhas de *Ricinus communis* ("mamona") (AMAZARRAY, 1986).

#### 1.1.5- Cofatores inorgânicos

Todas as formas de  $\delta$ -ALA-D isoladas até o presente momento requerem um íon metálico divalente para apresentarem atividade máxima e são inibidas por EDTA (GIBSON et al., 1955; MARTINS, 1986; ABEL, 1994; BEBER et al., 1998; EMANUELI et al., 1998). A análise comparativa da seqüência primária da  $\delta$ -ALA-D de diversas fontes animais e vegetais mostra um alto grau de conservação entre as diferentes espécies, sugerindo que o mecanismo básico de catálise da enzima seja bastante similar em todos os organismos (JAFFE., 1995). Apesar do alto grau de similaridade existente entre os genes de  $\delta$ -ALA-D de diferentes fontes, existem variações entre os organismos no que diz respeito ao íon metálico necessário para ativação da enzima. A  $\delta$ -ALA-D pode apresentar três sítios distintos de ligação para o(s) íon(s) metálico(s), sítios A, B e C (JAFFE et al., 1995).

A  $\delta$ -ALA-D de animais, leveduras e algumas bactérias é dependente de zinco (GIBBS et al, 1985; SPENCER e JORDAN, 1993). Em mamíferos a enzima contém dois tipos de sítios que ligam  $Zn^{2+}$ , denominados sítios ZnA e sítio ZnB. Esse sítios ligam zinco

com alta afinidade ( $K_d = 0,1\mu\text{M}$ ) e baixa afinidade ( $K_d = 5\mu\text{M}$ ) respectivamente (DENT et al., 1990). A estequiometria da ligação de  $\text{Zn}^{2+}$  a cada um destes sítios é de 4 g  $\text{Zn}^{2+}$ /octâmero ou seja 8g  $\text{Zn}^{2+}$ /octâmero quando se considera os dois sítios (JAFFE et al., 1992; DENT et al.; 1990).

A enzima  $\delta$ -ALA-D de *Escherichia coli* também requer  $\text{Zn}^{2+}$  para sua atividade (MITCHELL e JAFFE, 1993; SPENCER e JORDAN, 1993) e apresenta sítios de ligação designados de alfa e beta (SPENCER e JORDAN, 1994, 1995) com características semelhantes aos sítios ZnA e ZnB da enzima de mamífero (JAFFE, 1993).

O sítio alfa ou A contém um resíduo de cisteína, enquanto o sítio beta ou B possui pelo menos três resíduos de cisteína. Uma análise na enzima por EXAFS ("extended-x-ray-absorption-fine structure spectroscopy") revelou que a  $\delta$ -ALA-D de *Escherichia coli* liga 8 g  $\text{Zn}^{2+}$ /octâmero de modo similar a enzima de mamíferos. No entanto, a enzima de *Escherichia coli* difere da  $\delta$ -ALA-D de mamíferos por requerer  $\text{Mg}^{2+}$ . Esta enzima apresenta ainda 8 sítios/octâmero para ligação de magnésio (supostamente sítio C). A presença de  $\text{Mg}^{2+}$  aumenta a velocidade máxima da enzima, mas não afeta o  $K_m$  da mesma (MITCHELL e JAFFE, 1993; SPENCER e JORDAN, 1993).

A enzima proveniente de vegetais e de algumas bactérias parece utilizar  $\text{Mg}^{2+}$  ao invés do zinco (NANDI et al., 1968; SHIBATA e OCHIAI, 1977). Até o momento tem sido proposto que o sítio A também estaria presente na  $\delta$ -ALA-D de vegetais, no entanto não foi demonstrado a presença de zinco ligado a este sítio como na  $\delta$ -ALA-D de mamíferos (JAFFE et al., 1995). A  $\delta$ -ALA-D de plantas apresenta ainda quatro sítio B para a união de  $\text{Mg}^{2+}$  essenciais (JAFFE et al., 1994) e oito sítios (para a união de magnésio) considerados não essenciais (cuja função é estimular a atividade da enzima). Este sítio que

liga  $Mg^{2+}$  com função estimulatória e denominado MgC, o qual é distinto dos sítios que ligam  $Zn^{2+}$  (ZnA e ZnB) na  $\delta$ -ALA-D mamíferos (MITCHELL e JAFFE, 1993; JAFFE et al., 1995; JAFFE, 2000) (TABELA 0I). A região rica em cisteína presente na enzima de origem animal que supostamente liga  $Zn^{2+}$ , é substituída na enzima de plantas por uma região rica em aspartato, a qual provavelmente seria o local de ligação para o magnésio (BOESE et al., 1991; CHAUHAN e O'BRIAN., 1995).

TABELA I – Íons metálicos requeridos/octâmero para atividade máxima da  $\delta$ -ALA D (JAFFE, 2000):

<b>Tipo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sítio A</b>	<b>Sítio B</b>	<b>Sítio C</b>	<b>Total íons divalentes</b>	<b>Necessidade de Íons monovalentes</b>
<b>I</b>	<i>Homo sapiens</i>	4 Zn	4 Zn	Ausente	8	Não
<b>?</b>	<i>S. cerevisiae</i>	8 Zn	8 Zn	Ausente	16	Não
<b>II</b>	<i>E. coli</i>	4 Zn	4 Zn	8 Mg	16	Não
<b>III</b>	<i>P. sativum</i>	4 Zn	4 Zn	8 Mg	16	Não
<b>IV</b>	<i>B. japonicum</i>	4 Mg		8 Mg	12	Sim
<b>V</b>	<i>P. aeruginosa</i>	Ausente	Ausente	4 Mg	4	Sim

† Distribuição hipotética em itálico

### 1.1.6- Mecanismo geral de catálise

A enzima  $\delta$ -ALA-D possui 8 subunidades, no entanto ocorre o fenômeno de "half-site reactivity" (SEYDOUX et al., 1974) onde apenas metade destas unidades parecem estar envolvidas na catálise (JAFFE e HANES, 1986).



A reação catalisada por esta enzima consiste na condensação assimétrica de duas moléculas idênticas de substrato (ALA). Onde uma das moléculas de ALA origina a cadeia acética e a outra a cadeia propiônica do porfobilinogênio (PBG). O mecanismo detalhado da formação do PBG ainda não está completamente esclarecido, principalmente pelo fato da enzima catalisar a condensação assimétrica de duas moléculas que são quimicamente idênticas quando não ligadas a enzima, mas que após a união com a enzima passam a ter propriedades distintas. Estudos iniciais demonstram que a síntese do PBG, procede via um mecanismo onde o ALA que origina a cadeia propiônica do PBG liga-se primeiro e forma como intermediário uma base de Schiff entre o seu C4 e o grupo  $\epsilon$ -amino de um resíduo lisil (lisina 252 na  $\delta$ -ALA-D humana GIBBS e JORDAN, 1986; lisina 247 na  $\delta$ -ALA-D de *Escherichia coli* ECHELAND et al., 1988) presente no sítio ativo da enzima (NANDI e SCREMIN, 1968; JORDAN e SEEHRA, 1980). A união dessa primeira molécula de substrato não requer zinco ou grupamento sulfidrílico reduzido (JAFFE e HANES, 1986). No entanto, para a união da segunda molécula de ALA, a qual originará a cadeia acética do PBG, são necessários zinco e/ou grupamentos sulfidrílicos (JAFFE e MARKHAM, 1987). As duas moléculas interagem no sítio ativo da enzima aparentemente através de uma ligação carbono-nitrogênio (base de Schiff) (JAFFE et al., 1990). Vários mecanismos de reação foram propostos (NANDI e SHEMIN., 1968; JORDAN e SEEHRA., 1980), afim de descrever o mecanismo de formação da ligação das duas moléculas de ALA, ou qual das ligações se formaria primeiro.

Estudos mais recentes usando análises de ressonância magnética nuclear CRNM  $^{13}\text{C}$  e CRNM  $^{15}\text{N}$ , sugerem que o estado de protonação do grupo amino livre, ligado a primeira molécula de ALA (o qual já está ligado a lisina da  $\delta$ -ALA-D) pode mudar facilitando assim a formação da ligação entre o "N" (ligado ao

C5 da primeira molécula de ALA) e o C4 da segunda molécula de ALA (JAFJE et al., 1995, 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que além do resíduo de lisina que está envolvido na formação da base de Schiff entre a primeira molécula de ALA que se liga a enzima (GIBBS e JORDAN, 1986) outro resíduo de aminoácido tem papel fundamental na catálise ou na manutenção da atividade da  $\delta$ -ALA-D os principais resíduos são:

- resíduos de cisteína, os quais são altamente reativos (GIBBS et al., 1985); podendo formar pontes dissulfeto em presença de oxigênio ou serem modificados por reagentes químicos. A oxidação desses resíduos leva a inativação da enzima com concomitante perda do zinco ligado (TSUKAMOTO et al., 1979). Por essa razão esses resíduos devem estar no estado reduzido para que a enzima apresente atividade.

- resíduos de histidina, os quais podem participar na ligação do zinco a enzima. Foi demonstrado que no mínimo dois resíduos de histidina estão situados no sítio ativo da enzima e possivelmente um deles participe da atividade enzimática e perda de átomo de zinco (TSUKAMOTO et al., 1979).

- tem sido sugerido ainda que estes resíduos de histidina possam estar envolvidos na catálise ácido-base da enzima, já que a modificação química dos mesmos inativa a  $\delta$ -ALA-D de diversas fontes (TSUKAMOTO et al., 1979).

### **1.1.7- Importância toxicológica da $\delta$ -ALA-D**

A enzima  $\delta$ -ALA-D pode ser inibida por uma série de metais pesados, tais como chumbo e mercúrio tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*” (GOERNG e FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; GOERING, 1993; ROCHA et al., 1993, 1995). O efeito inibitória do chumbo parece estar relacionado com a substituição do zinco catalítico (JAFJE et al.,

1993) e com alteração do pH ótimo da enzima . Dados recente demonstram que a  $\delta$ -ALA-D é a principal proteína que liga o  $Pb^{2+}$  em eritrócitos humanos e não a hemoglobina como se postulava (BERGDAHL et al., 1995).

A inibição e o índice de reatividade por DTT na atividade da  $\delta$ -ALA-D de eritrócitos são indicadores sensíveis do envenenamento por chumbo, sendo usados como parâmetros para verificar o estado geral de intoxicação pelo metal (BONSIGNORE., 1966; HERNEBERG et al., 1970; MEREDITH et al., 1979). A inativação da enzima pode resultar no aumento do ALA no sangue e o excesso pode ser neuropatológico como ocorre no envenenamento por chumbo (BRENNAN e CANTRILL, 1980; KAPPAS et al, 1989; DOSS et al., 1960). O acúmulo do substrato da  $\delta$ -ALA-D (ALA), parece estar também estar envolvido na produção de espécies ativas de oxigênio (BECHARA et al., 1993). Foi demonstrado que a administração intraperitoneal de ALA causa um aumento de atividade das enzimas antioxidantes no cérebro, sugerindo fortemente que o ALA administrado periféricamente pode ter um efeito pró oxidante no sistema nervoso central. Além disso o ALA é um potente agonista dos receptores gabaérgicos pré-sinápticos, o que pode contribuir para o efeito neurológico desta substância (BRENNAN e CANTRILL, 1980; KAPPAS et al., 1995).

### **1.1.2- Funções bioquímicas**

Os compostos tetrapirrólicos originam o grupamento heme, clorofila, corrinas, bilinas e grupos prostéticos de várias outras proteínas desempenhando assim importante papel metabólico (CASTELFRANCO e BEATLE, 1983).

O heme (ferroporfirina) ocorre como grupo prostético da hemoglobina, mioglobina, citocromos “a”, “b” e “c”, citocromo P450, catalases, peroxidases e triptofânio pirrolase. Integrando assim a estrutura de proteínas que desempenham funções como o transporte de oxigênio, transporte de elétrons, a detoxificação e reações de oxi-redução.

As clorofilas (magnésio porfirinas) são pigmentos tetrapirrólicos amplamente distribuídos nos organismos fotossintéticos, são essências no processo de absorção de energia luminosa para a síntese de glicídios e outros produtos orgânicos celulares (NANDI et al., 1968; SHIBATA e OCHIAI, 1977).

O anel corrina integra a estrutura da vitamina B12 (cianocobalamina) a qual é sintetizada por algumas espécies de microorganismos. A vitamina B12 na função de coenzima (5'-desoxiadenosilcobalamina e metilcobalamina), participa de reações enzimáticas, tais como a metilação da homocisteína e a conversão do metilmalonil-CoA em succinil CoA.

As bilinas participam da estrutura vegetal em algas fotossintéticas.

Os compostos tetrapirrólicos encontram-se amplamente distribuídos nos seres vivos (bactérias, animais e plantas). A via de biossíntese desses compostos é semelhante em todos os seres vivos, portanto a  $\delta$ -ALA-D está presente em todos os organismos que sintetizam tetrapirróis.

Embora a etapa principal de controle (regulação) da síntese do heme pareça estar na síntese do ácido 5-aminolevulinico (reação catalizada pela enzima ALA-sintetase), algumas evidências indicam que a  $\delta$ -ALA-D também pode ser um ponto importante de regulação da via de síntese do heme em leveduras (BORALHO et al., 1989; BORRALHO, 1990). Uma evidência que aponta para a importância da  $\delta$ -ALA-D no metabolismo do

heme foi obtidas em trabalhos clássicos que mostram a inibição da enzima por chumbo, resultando no acúmulo de ALA e na deficiência de síntese do heme.

Recentemente dados obtidos no laboratório de BECHARA (1993) e colaboradores sugerem fortemente que o acúmulo de ALA formado pela inibição da  $\delta$ -ALA D pode ter um efeito pró-oxidante levando a formação de radicais livres nos tecidos afetados. Uma função adicional da enzima foi apresentada nos trabalhos de GUO et al., (1994) que sugerem que a  $\delta$ -ALA-D é idêntica ao inibidor de proteossoma de 240-Kda (CF-2), fator que estaria relacionado com a degradação de proteínas anormais, fatores de transcrição, processamento de antígenos, oncoproteínas e ciclinas.

### **1.1.3- Natureza sulfidrílica**

Uma característica importante da  $\delta$ -ALA D é a essencialidade de grupos –SH para sua ação catalítica (TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980). Assim, a manutenção desses grupos no estado reduzido é fundamental para a atividade da enzima. A  $\delta$ -ALA-D é altamente sensível a agentes bloqueadores de grupos tiólicos tais como o N-etilmaleimida (NEM), iodoacetato, iodoacetamida (IAM) e ácido 5-5' ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (BARREIRO, 1967; BATLLE et al., 1967; BARNARD et al., 1977), e metais de transição que apresentam alta afinidade por grupos –SH tais como mercúrio (ROCHA et al., 1993, 1995), cádmio (RODRIGUES et al., 1989), cobre (NELSON et al., 1981) e chumbo (GOERING & FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; GOERING, 1993; ROCHA et al., 1995).

A  $\delta$ -ALA-D purificada de eritrócitos (ANDERSON et al., 1979) e fígado de mamíferos (BARNARD et al., 1977; CHEH et al., 1973) requer a presença de agentes redutores sulfidrílicos tais como o  $\beta$ -mercaptoetanol, cisteína, glutatona reduzida (GSH)

ou ditiontreitol (DTT) e  $Zn^{2+}$  para apresentar atividade máxima. A atividade é rapidamente perdida por oxidação de grupos  $-SH$  ou pela remoção do  $Zn^{2+}$ , o qual possivelmente tem um papel na manutenção de grupos  $-SH$  no estado reduzido (BEVAN et al., 1980; BEBER et al., 1998; EMANUELLI et al., 1998).

#### 1.1.4- Histórico e estrutura

A existência de uma enzima que catalisaria a conversão de  $\delta$ -ALA a PBG foi proposta por DRESEL e FALK (1953) e GRANICK e MAUZERALL (1958). Foi isolada e purificada pela primeira vez em fígado de boi por GIBSON (1955). Numerosos estudos tem sido realizados desde então em uma grande variedade de fontes enzimáticas. De fato a  $\delta$ -ALA-D encontra-se amplamente distribuída na natureza, desde microorganismos até animais e vegetais superiores. WU et al., (1973) demonstraram através de micrografia eletrônica que a enzima de fígado de boi apresenta uma estrutura cúbica octamérica com simetria diédrica (D<sub>4</sub>). Nas outras fontes enzimáticas parece existir estrutura semelhante. Determinações do peso molecular da delta-ALA-D octamérica revelam na maioria dos casos, um valor de cerca de 280.000 D. (TIGIER et al., 1970; WU et al., 1973; SHEMIN, 1976; FUJITA et al., 1981).

A  $\delta$ -ALA-D apresenta de acordo com suas origens uma ampla variação de pH ótimo, desde 6,2 para *Salmo gairdneri* (truta arco-íris) (HODSON et al., 1977) até 9,5 para a levedura *Sacharomyces cerevisiae* (BARREIRO, 1967). A  $\delta$ -ALA-D de origem vegetal possui valores mais elevados de pH ótimo (em regra acima de pH 7,5) em relação a enzima de origem animal (AMAZARRAY, 1986). A enzima apresenta em geral atividade máxima "in vitro" entre 55 a 65 °C (TIGIER et al., 1968; WILSON et al., 1972; BELLINASO, 1985), contudo em algumas fontes vegetais, tem se verificado temperaturas ótimas de em

torno de 40°C (AMAZARRAY, 1986). Os valores da constante de Henri-Michaelis-Menten ( $K_m$ ) variam entre 0,14 mM para a enzima de fígado de boi (GIBSON et al., 1955) até 6,6 mM para folhas de *Ricinus communis* ("mamona") (AMAZARRAY, 1986).

### 1.1.5- Cofatores inorgânicos

Todas as formas de  $\delta$ -ALA-D isoladas até o presente momento requerem um íon metálico divalente para apresentarem atividade máxima e são inibidas por EDTA (GIBSON et al., 1955; MARTINS, 1986; ABEL, 1994; BEBER et al., 1998; EMANUELI et al., 1998). A análise comparativa da seqüência primária da  $\delta$ -ALA-D de diversas fontes animais e vegetais mostra um alto grau de conservação entre as diferentes espécies, sugerindo que o mecanismo básico de catálise da enzima seja bastante similar em todos os organismos (JAFFE., 1995). Apesar do alto grau de similaridade existente entre os genes de  $\delta$ -ALA-D de diferentes fontes, existem variações entre os organismos no que diz respeito ao íon metálico necessário para ativação da enzima. A  $\delta$ -ALA-D pode apresentar três sítios distintos de ligação para o(s) íon(s) metálico(s), sítios A, B e C (JAFFE et al., 1995).

A  $\delta$ -ALA-D de animais, leveduras e algumas bactérias é dependente de zinco (GIBBS et al, 1985; SPENCER e JORDAN, 1993). Em mamíferos a enzima contém dois tipos de sítios que ligam  $Zn^{2+}$ , denominados sítios ZnA e sítio ZnB. Esse sítios ligam zinco com alta afinidade ( $K_d = 0,1\mu M$ ) e baixa afinidade ( $K_d = 5\mu M$ ) respectivamente (DENT et al., 1990). A estequiometria da ligação de  $Zn^{2+}$  a cada um destes sítios é de 4 g  $Zn^{2+}$ /octâmero ou seja 8g  $Zn^{2+}$ /octâmero quando se considera os dois sítios (JAFFE et al., 1992; DENT et al.; 1990).

A enzima  $\delta$ -ALA-D de *Escherichia coli* também requer  $Zn^{2+}$  para sua atividade (MITCHELL e JAFFE, 1993; SPENCER e JORDAN, 1993) e apresenta sítios de ligação designados de alfa e beta (SPENCER e JORDAN, 1994, 1995) com características semelhantes aos sítios ZnA e ZnB da enzima de mamífero (JAFFE, 1993).

O sítio alfa ou A contém um resíduo de cisteína, enquanto o sítio beta ou B possui pelo menos três resíduos de cisteína. Uma análise na enzima por EXAFS ("extended-x-ray-absorption-fine structure spectroscopy") revelou que a  $\delta$ -ALA-D de *Escherichia coli* liga 8 g  $Zn^{2+}$ /octâmero de modo similar a enzima de mamíferos. No entanto, a enzima de *Escherichia coli* difere da  $\delta$ -ALA-D de mamíferos por requerer  $Mg^{2+}$ . Esta enzima apresenta ainda 8 sítios/octâmero para ligação de magnésio (supostamente sítio C). A presença de  $Mg^{2+}$  aumenta a velocidade máxima da enzima, mas não afeta o  $K_m$  da mesma (MITCHELL e JAFFE, 1993; SPENCER e JORDAN, 1993).

A enzima proveniente de vegetais e de algumas bactérias parece utilizar  $Mg^{2+}$  ao invés do zinco (NANDI et al., 1968; SHIBATA e OCHIAI, 1977). Até o momento tem sido proposto que o sítio A também estaria presente na  $\delta$ -ALA-D de vegetais, no entanto não foi demonstrado a presença de zinco ligado a este sítio como na  $\delta$ -ALA-D de mamíferos (JAFFE et al., 1995). A  $\delta$ -ALA-D de plantas apresenta ainda quatro sítio B para a união de  $Mg^{2+}$  essenciais (JAFFE et al., 1994) e oito sítios (para a união de magnésio) considerados não essenciais (cujas funções são estimular a atividade da enzima). Este sítio que liga  $Mg^{2+}$  com função estimulatória e denominado MgC, o qual é distinto dos sítios que ligam  $Zn^{2+}$  (ZnA e ZnB) na  $\delta$ -ALA-D mamíferos (MITCHELL e JAFFE, 1993; JAFFE et al., 1995; JAFFE, 2000) (TABELA 0I). A região rica em cisteína presente na enzima de origem animal que supostamente liga  $Zn^{2+}$ , é substituída na enzima de plantas por uma



região rica em aspartato, a qual provavelmente seria o local de ligação para o magnésio (BOESE et al., 1991; CHAUHAN e OBRIAN., 1995).

TABELA I – Íons metálicos requeridos/octâmero para atividade máxima da  $\delta$ -ALA D (JAFPE, 2000):

<b>Tipo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sítio A</b>	<b>Sítio B</b>	<b>Sítio C</b>	<b>Total íons divalentes</b>	<b>Necessidade de Íons monovalentes</b>
<b>I</b>	<i>Homo sapiens</i>	4 Zn	4 Zn	Ausente	8	Não
<b>?</b>	<i>S. cerevisiae</i>	8 Zn	8 Zn	Ausente	16	Não
<b>II</b>	<i>E. coli</i>	4 Zn	4 Zn	8 Mg	16	Não
<b>III</b>	<i>P. sativum</i>	4 Zn	4 Zn	8 Mg	16	Não
<b>IV</b>	<i>B. japonicum</i>	4 Mg		8 Mg	12	Sim
<b>V</b>	<i>P. aeruginosa</i>	Ausente	Ausente	4 Mg	4	Sim

† Distribuição hipotética em itálico

### 1.1.6- Mecanismo geral de catálise

A enzima  $\delta$ -ALA-D possui 8 subunidades, no entanto ocorre o fenômeno de "half-site reactivity" (SEYDOUX et al., 1974) onde apenas metade destas unidades parecem estar envolvidas na catálise (JAFPE e HANES, 1986).

A reação catalisada por esta enzima consiste na condensação assimétrica de duas moléculas idênticas de substrato (ALA). Onde uma das moléculas de ALA origina a cadeia acética e a outra a cadeia propiônica do porfobilinogênio (PBG). O mecanismo detalhado da formação do PBG ainda não está completamente esclarecido, principalmente pelo fato da enzima catalisar a condensação assimétrica de duas moléculas que são quimicamente

idênticas quando não ligadas a enzima, mas que após a união com a enzima passam a ter propriedades distintas. Estudos iniciais demonstram que a síntese do PBG, procede via um mecanismo onde o ALA que origina a cadeia propiônica do PBG liga-se primeiro e forma como intermediário uma base de Schiff entre o seu C4 e o grupo  $\epsilon$ -amino de um resíduo lisil (lisina 252 na  $\delta$ -ALA-D humana GIBBS e JORDAN, 1986; lisina 247 na  $\delta$ -ALA-D de *Escherichia coli* ECHELAND et al., 1988) presente no sítio ativo da enzima (NANDI e SCREMIN, 1968; JORDAN e SEEHRA, 1980). A união dessa primeira molécula de substrato não requer zinco ou grupamento sulfidrílico reduzido (JAFFE e HANES, 1986). No entanto, para a união da segunda molécula de ALA, a qual originará a cadeia acética do PBG, são necessários zinco e/ou grupamentos sulfidrílicos (JAFFE e MARKHAM, 1987). As duas moléculas interagem no sítio ativo da enzima aparentemente através de uma ligação carbono-nitrogênio (base de Schiff) (JAFFE et al., 1990). Vários mecanismos de reação foram propostos (NANDI e SHEMIN., 1968; JORDAN e SEEHRA., 1980), afim de descrever o mecanismo de formação da ligação das duas moléculas de ALA, ou qual das ligações se formaria primeiro.

Estudos mais recentes usando análises de ressonância magnética nuclear CRNM  $^{13}\text{C}$  e CRNM  $^{15}\text{N}$ , sugerem que o estado de protonação do grupo amino livre, ligado a primeira molécula de ALA (o qual já está ligado a lisina da  $\delta$ -ALA-D) pode mudar facilitando assim a formação da ligação entre o "N" (ligado ao C5 da primeira molécula de ALA) e o C4 da segunda molécula de ALA (JAFFE et al., 1995, 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que além do resíduo de lisina que está envolvido na formação da base de Schiff entre a primeira molécula de ALA que se liga a enzima (GIBBS e JORDAN, 1986) outro resíduo de aminoácido tem papel fundamental na catálise ou na manutenção da atividade da  $\delta$ -ALA-D os principais resíduos são:

- resíduos de cisteína, os quais são altamente reativos (GIBBS et al., 1985); podendo formar pontes dissulfeto em presença de oxigênio ou serem modificados por reagentes químicos. A oxidação desses resíduos leva a inativação da enzima com concomitante perda do zinco ligado (TSUKAMOTO et al., 1979). Por essa razão esses resíduos devem estar no estado reduzido para que a enzima apresente atividade.

- resíduos de histidina, os quais podem participar na ligação do zinco a enzima. Foi demonstrado que no mínimo dois resíduos de histidina estão situados no sítio ativo da enzima e possivelmente um deles participe da atividade enzimática e perda de átomo de zinco (TSUKAMOTO et al., 1979).

- tem sido sugerido ainda que estes resíduos de histidina possam estar envolvidos na catálise ácido-base da enzima, já que a modificação química dos mesmos inativa a  $\delta$ -ALA-D de diversas fontes (TSUKAMOTO et al., 1979).

### **1.1.7- Importância toxicológica da $\delta$ -ALA-D**

A enzima  $\delta$ -ALA-D pode ser inibida por uma série de metais pesados, tais como chumbo e mercúrio tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*” (GOERNG e FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; GOERING, 1993; ROCHA et al., 1993, 1995). O efeito inibitória do chumbo parece estar relacionado com a substituição do zinco catalítico (JAFFE et al., 1993) e com alteração do pH ótimo da enzima. Dados recente demonstram que a  $\delta$ -ALA-D é a principal proteína que liga o  $Pb^{2+}$  em eritrócitos humanos e não a hemoglobina como se postulava (BERGDAHL et al., 1995).

A inibição e o índice de reatividade por DTT na atividade da  $\delta$ -ALA-D de eritrócitos são indicadores sensíveis do envenenamento por chumbo, sendo usados como

parâmetros para verificar o estado geral de intoxicação pelo metal (BONSIGNORE., 1966; HERNEBERG et al., 1970; MEREDITH et al., 1979). A inativação da enzima pode resultar no aumento do ALA no sangue e o excesso pode ser neuropatológico como ocorre no envenenamento por chumbo (BRENNAN e CANTRILL, 1980; KAPPAS et al, 1989; DOSS et al., 1960). O acúmulo do substrato da  $\delta$ -ALA-D (ALA), parece estar também estar envolvido na produção de espécies ativas de oxigênio (BECHARA et al., 1993). Foi demonstrado que a administração intraperitoneal de ALA causa um aumento de atividade das enzimas antioxidantes no cérebro, sugerindo fortemente que o ALA administrado periféricamente pode ter um efeito pró oxidante no sistema nervoso central. Além disso o ALA é um potente agonista dos receptores gabaérgicos pré-sinápticos, o que pode contribuir para o efeito neurológico desta substância (BRENNAN e CANTRILL, 1980; KAPPAS et al., 1995).

## **1.2 – Selênio**

### **1.2.1 - Histórico**

O selênio foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons. J. Berzelius. Ele denominou seu novo elemento descoberto em homenagem a deusa grega da lua “Selene” (MULERNAN, 1999). Localizado no grupo 16 (VIA) da tabela periódica, situando-se abaixo do enxofre, sendo ambos quimicamente similares (grau de eletronegatividade, potencial de ionização, raio atômico) (MAIER e KNIGHTI, 1994). Suas propriedades físico-químicas constituem a base de seus papéis biológicos específicos (STADMAN, 1980).

Inicialmente o selênio foi considerado um elemento tóxico na dieta. Uma das primeiras observações em relação aos efeitos tóxicos do selênio datam do século XIII (1271-1295). Nesta época Marco Polo descreveu uma provável intoxicação por selênio em cavalos, na região de Sucidu no Oeste da China, pela ingestão de plantas seleníferas. Esses animais apresentavam emagrecimento, perda de cascos e pêlos (FRANKE, 1934). Talvez o relato mais antigo sobre a toxicidade do selênio após o de Marco Polo, seja um relatório confidencial do "United State Bureau of Chemistry and Soils" e do "South Dakota Agricultural College and Experiment Station" de 1933. Neste relatório relacionou-se a toxicidade do selênio com a doença alcalina ("alkali disease") observada em bovinos que se alimentavam de pastagens crescidas em solos que continham níveis elevados de selênio.

O papel do selênio como elemento essencial na dieta foi demonstrado experimentalmente em 1957 por Klaus Schwarz na Alemanha. Este pesquisador mostrou que ratos alimentados com uma dieta com baixos níveis de alfa-tocoferol desenvolviam uma necrose hepática fatal, e que o selênio era um nutriente essencial capaz de prevenir o desenvolvimento desta patologia. Cerca de 15 anos depois ficou estabelecido que o selênio era um componente efetivo da enzima glutatona peroxidase (FLOHE et al., 1973; ROTUCK et al., 1973).

### 1.2.2 - Necessidades nutricionais

O selênio é um elemento traço essencial para mamíferos (SCHWARZ e FLOTZ, 1957; SCHWARZ, 1976; FLOHE, 1973) para galinhas (THOMPSON e SCOTT, 1969). O selênio é requerido na nutrição de peixes marinhos e de água doce (POSTON et al., 1976; HILTON et al., 1980). Sintomas da deficiência de selênio em trutas e bagres cultivados incluem a diátese exudativa, a redução da atividade da enzima glutathione peroxidase e o lento crescimento (MULERNAN, 1999).

Nos peixes de modo similar aos mamíferos o papel primário do selênio é como cofator das duas formas da enzima glutathione peroxidase, que neutraliza os peróxidos normalmente gerados durante o metabolismo aeróbico, que pode levar a formação de peróxidos de lipídios. Os peróxidos de ácidos graxos exercem seus efeitos danosos através da desestabilização da integridade da membrana celular, podendo levar ao vazamento do conteúdo celular. A produção de peróxidos nos peixes é maior quando comparada com a de animais terrestres devido a altas concentrações de gordura e grande número de insaturações presentes no ácidos graxos na maioria dos peixes (MULERNAN, 1999).

Recomendações de selênio na dieta tem sido estabelecidas para algumas espécies de peixes, sendo de 0,38 mg Se/Kg de ração para a truta arco-íris e de 0,25 mg Se/Kg de ração para o bagre (*Catfish channel*) (baseadas na exigência de selenito de sódio).

O estado de oxidação influencia a biodisponibilidade do selênio. Estudos apontam absorção de 64% do selenito de sódio na dieta do *Catfish channel*, a absorção de selênio orgânico é maior, 91% para selenometionina. Devido a diferente biodisponibilidade do selênio foi determinado o melhor ponto de crescimento do *Chanel catfish*, para diferentes fontes de selênio na ração, obtendo-se 0,09 mg por kg/matéria seca para selenometionina,

0,11mg por kg/matéria seca para selênio orgânico e 0,28 mg por kg/matéria seca para selenito de sódio (MULERNAN, 1999).

Em 1974, o FDA (“US Food and Drug Administration”) aprovou a adição de selênio para a criação animal e ração de aves na forma de selenito de sódio a uma concentração de 0,1 ppm. Cinco anos mais tarde, o FDA aumentou a taxa de inclusão máxima para concentração de 0,3 ppm. Entretanto em 1984, uma alta mortalidade e incidência de embriões deformados nos animais aquáticos do refúgio de Vida Selvagem Kesterson na Califórnia fez com que o FDA retorne-se para a taxa anterior de 0,1 ppm. Apesar da identificação de selênio ferroso proveniente de rochas do refúgio, os ambientalistas culpavam o selênio liberado de fertilizantes químicos e adubos orgânicos pelo problema. Apesar deste problema as recomendações nutricionais do National Research Council (EUA) para o gado leiteiro preconizam a concentração de 0,3 ppm de selênio na ração (MULERNAN, 1999).

O estado de oxidação do selênio afeta a biodisponibilidade deste elemento na nutrição animal sendo a eficiência maior quando estiver no estado mais reduzido (Selênio orgânico: seleniomietionina e selenocisteína). Como exemplo temos a biodisponibilidade relativa para bovinos: selenito de sódio e selenito de cobalto 100%; seleniomietionina 245% e levedura de selênio 290% (MULERNAN, 1999). De maneira que a inclusão de selênio orgânico nas rações animais passou a ser a única forma de aumentar a provisão de selênio aos animais pela sua maior biodisponibilidade.

Em 1980 a junta de alimentação e nutrição da academia de Ciências dos Estados Unidos propôs a ingestão diária de 50 a 200ug de selênio para homens adultos, aporte esse considerado adequado e isento de efeitos tóxicos. Atualmente o conhecimento sobre as necessidade dietéticas de selênio tanto para humanos quanto para animais aumentou

notavelmente. O valor terapêutico e preventivo contra determinadas doenças está bem estabelecido e parece estar relacionada com a dose de selênio a ser administrada e ou ingerida, possuindo propriedades biológicas semelhantes as da vitamina E, fazendo parte do centro ativo de enzimas que desempenham papel antioxidante (FARINA, 2000).

### **1.2.3 - O selênio nos meios aquáticos**

O selênio na natureza pode ocorrer com quatro valências; no estado elementar, não metálico com valência zero; como selenato inorgânico com valência mais quatro; como seleneto inorgânico com valência mais seis e na forma de selênio orgânico com valência menos dois. Todos os estados de oxidação podem estar presentes nos ambientes aquáticos e cada um possui diferentes propriedades químicas, fisiológicas e toxicológicas (MAIER e KNIGHTI, 1994). A química de selênio em água doce foi bem estudada por FAUST e ALY (1981) e CUTTER (1989). Sais de seleneto e selenito são os mais comuns estado de oxidação do selênio inorgânicos em águas aeróbias.

O selênio elementar é estável, insolúvel na água e mau assimilado por organismos aquáticos (National Academy of Sciences, 1976). O selênio elementar não é considerado fonte de risco devido a sua baixa disponibilidade ( MAIER e KNIGHTI, 1994). Complexos de selênio inorgânico formam-se naturalmente em condições anaeróbias, geralmente sob forma de metal insolúvel e não é considerado um fator de risco significativo ( MAIER e KNIGHTI, 1994).

Complexos de selênio orgânico são formados nos sistemas aquáticos quando o selênio é acumulado e utilizado na síntese de uma variedade de



moléculas orgânicas, geralmente análogas as sulfurosas. As rotas bioquímicas para a síntese de compostos metilados foram revistas por SCHAMBERGER (1983). Compostos metilados de selênio rapidamente saem dos meio aquáticos devido a sua alta volatilidade e relativa insolubilidade em água. Podendo ser devolvido para os sistemas terrestres sob forma de vapor (DOVAN, 1982) (FIGURA 03 e 04).

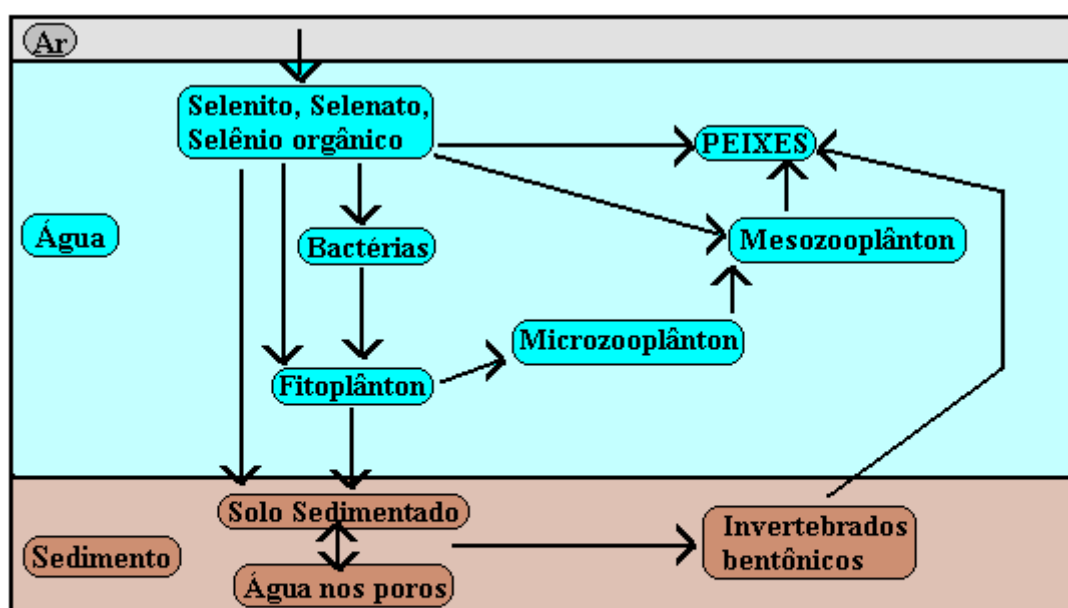


FIGURA 03 - Ciclo do selênio em ecossistemas aquáticos. Rota de exposição de peixes (CHAPMAN, 1999).

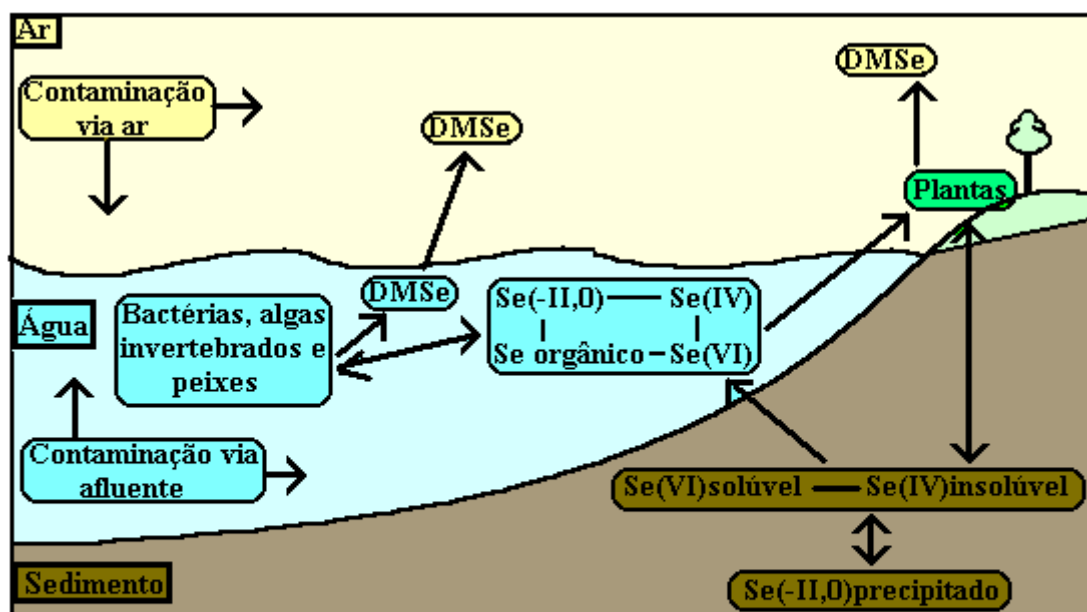


FIGURA 04 - Modelo do ciclo biogeoquímico do selênio no lago Macquarie (MASSCHELEY & PATRICK, 1993).

As formas de selênio orgânico incluem seleneto de dimetila e disseleneto de dimetila e seleno aminoácidos: selenocisteína e selenometionina (MAIER e KNIGHTI, 1994). A maior parte do selênio absorvido é transformado no meio aquático em selenocisteína e selenometionina, que subsequentemente podem ser incorporados em proteínas (BUTTER e PETERSON, 1967; WRENCH, 1978; BOTTINO et al.; 1984).

A proporção de 30 a 60% do selênio presente nos meios de água doce e marinha estão na forma orgânica (TA KAYANAGI e WONG, 1985; ROBBERECHT e VAN GRIEKEN, 1982; COOKE and BRULAND, 1987). Do selênio total encontrado no sedimento mais de 50 % encontram-se na forma orgânica.

A dinâmica do selênio dissolvido e particulado parece passar por rotas de mineralização e fossilização (MAIER e KNIGHTI, 1994). Todavia nos sistemas aquáticos

as formas orgânicas e inorgânicas do selênio podem ser absorvidas por causa da suspensão de material coloidal (MAIER e KNIGHTI, 1994).

#### **1.2.4 - Origem do selênio nos ambiente aquáticos**

O selênio pode ocorrer na natureza sob três diferentes formas referidas como alotrópicas. Pode ser na forma de pó amorfo de coloração escura ( selênio metálico) e/ou avermelhada ( forma vítrea) ou ainda na forma de cristais de coloração avermelhada. Pode ser encontrado na natureza associado a metais tais como: chumbo, cobre, mercúrio e prata (BARBOSA et al.,1998).

Os três principais mecanismos de mobilização de selênio para os ambientes aquáticos são: atividades antropogênicas; processos erosivos naturais e biometilação (MAIER e KNIGHTI, 1994).

As atividades antropogênicas têm ampla contribuição e as principais atividades incluem a combustão de combustíveis fósseis principalmente carvão, resíduos de processamento de óleos e irrigação de solos seleníferos e na produção de ampla linha de produtos industriais. Os processos erosivos naturais podem elevar os níveis de selênio para 0,1 a 0,4  $\mu\text{g Se/L}$  em águas não contaminadas. Os óleos e carvões contém alta concentração de selênio (PILLAY et al., 1969), assim como rochas marinhas formadas durante o período cretáceo ( KUBOTA, 1980). A mobilização dessas fontes libera grande quantidade de selênio. A irrigação para a agricultura em solos seleníferos é uma grande fonte de mobilização de selênio para os ambientes aquáticos. A concentração de selênio nas águas de retorno pode variar de 1 a 6000 $\mu\text{g Se/L}$ , devido a concentração por evaporação de água nas lavouras. (MAIER and KNIGHTI, 1994; HAMILTON, 1999).

A metilação e volatilização do selênio foi demonstrada em plantas, animais aquáticos e vários microorganismos. Estas formas podem ser foto-oxidadas e retornar aos ambientes aquáticos e terrestres por meio da chuva. (CHAMBERGER 1983).

Atualmente o selênio é bastante utilizado em processos industriais, onde compostos de selênio são utilizados na elaboração de semicondutores, células fotoelétricas, eletrodos, retificadores, câmeras, televisores, baterias solares, cabos elétricos, vulcanização da borracha, fabricação de plásticos, manufatura do ácido sulfúrico, síntese de compostos orgânicos e processamento da birlita (WILBER, 1980), produzindo grande quantidade de resíduos que podem ser fonte de poluição ambiental.

### 1.2.5 - Propriedades químicas relacionadas aos sistemas biológicos

Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes dos tióis (R-SH), onde o átomo de selênio substitui o de enxofre. As principais diferenças entre selenóis e tióis, relevantes para os sistemas bioquímicos, estão relacionadas com suas constantes de dissociação e caracteres nucleofílicos. Os selenóis são ácidos mais fortes que os tióis. Os primeiros estão sob a forma dissociada em pH fisiológico, enquanto a predominância da forma tiólica é não dissociada. Os selenóis são capazes de reduzir dissulfetos, sulfóxidos e compostos aromáticos nitrogenados. Pelas suas oxidações, os selenóis são convertidos em seus correspondentes disselenetos. O agente oxidante pode ser o hidroperóxido. (EQUAÇÃO I)



Os disselenetos podem ser oxidados a ácido selenênico, selenínico ou selenônico, dependendo das condições utilizadas. Além disso, os disselenetos podem ser reduzidos a selenóis por agentes redutores como o mercaptaetanol, DTT, cisteína e glutathiona reduzida (KLAYMAN e GANTHER, 1973).

O selenito pode oxidar tióis como cisteína, glutathiona reduzida, coenzima A, ácido lipóico e cisteína protéica (GANTHER, 1971). Esta reação apresenta importância fisiológica e provavelmente constitui o primeiro passo para a incorporação do selênio inorgânico nos sistemas biológicos. A reação entre o selenito e tióis, primeiramente proposta por PAINTER (1941), foi posteriormente estudada por TSEN e TAPPEL (1958) e, de modo bastante detalhado por GANTHER (1968). Um intermediário do tipo selenotrissulfeto é formado na reação global (EQUAÇÃO II).



Os selenotrissulfetos reagem com reagentes nucleofílicos e são várias ordens de magnitude mais reativos que os correspondentes dissulfetos. O intermediário formado pela reação entre a glutathiona reduzida e o ácido selenoso, GSSeSG, pode pela interação com GSH em pH fisiológico, formar selenopersulfeto (GANTHER, 1971) (EQUAÇÃO III).



Os selenetos orgânicos também apresentam importantes particularidades nos sistemas biológicos. O dimetil-disseleneto é reconhecido como um produto volátil do metabolismo do selênio em animais, sendo formado por redução e sucessiva metilação de sais inorgânicos de selênio (HSIEH e GANTHER, 1976). O dimetil seleneto e outros selenetos (dialquil e alquilarilselenetos) são bons substratos para as monoxigenase microssomais que contêm flavina (FMO), podendo assim, serem oxidados a seus selenóxidos correspondentes (GOEGER e GANTHER, 1994; CHEN & ZIEGLER, 1994). Estes são potentes oxidantes de tióis e possivelmente atuam em proteínas que possuem grupamentos —SH (FARINA et al., 2000).

Os selenoaminoácidos são capazes de catalisar as trocas tiol-dissulfeto (DIKSON and TAPPEL, 1969) que podem ser relevantes em sistemas biológicos. Além disso, os selenoaminoácidos podem decompor hidroperóxidos mais eficientemente que os compostos correspondentes de enxofre (CALDWELL e TAPPEL, 1965). Esta maior reatividade pode ser atribuída ao carácter nucleofílico dos compostos de selênio.

A reação entre hidroperóxidos e a porção selenol e selenoaminoácidos ocorre, provavelmente em dois passos seqüenciais (EQUAÇÃO IV).



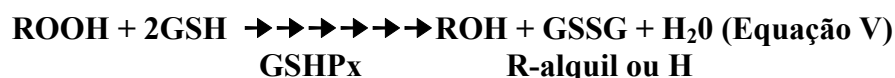
Num primeiro passo o selenol é oxidado a ácido selenênico e no segundo passo, ocorre a formação de um disseleneto pela interação com outro selenol. Estas reações são responsáveis pela atividade do tipo peroxidase de selenocistina e selenocistamina (YASUDA et al., 1980).

### 1.2.6 - Selenoproteínas

As selenoproteínas já identificadas possuem o selênio na forma de selenocisteína, com exceção da selenoproteína de origem bacteriana, a tiolase, que apresenta selênio na forma de selenometionina. Esta última não é sintetizada por tecidos de mamíferos e deve ser suplementada pela dieta (COWIE e COEN, 1975).

A selenocisteína está presente em proteínas como glutathione peroxidase (FLORE et al., 1973; ROTRUCK et al., 1973), 5'-deiodinase (BEHNE and KYRIAKOPOULOS, 1990), fosfolipídio hidroperóxido glutathione peroxidase (URSINI et al., 1982) e selenoproteína P (LINDER, 1990).

A primeira selenoproteína a ser caracterizada foi a glutathione peroxidase (GSPx) (FLOHE et al., 1973; ROTRUCK et al., 1973) que apresenta um papel protetor contra a peroxidação de lipídios ao catalisar reações redox entre hidroperóxidos e GSH, reduzindo o peróxido de hidrogênio ou outros hidroperóxidos não ligados as membranas celulares (URSINI & BINDOLI, 1987) (EQUAÇÃO V).



Há pelo menos três tipos de glutathiona peroxidase: celular, citoplasmática e a glutathiona peroxidase de hidroperóxidos fosfolipídios (PXGPx), associada a membrana (URSINI et al., 1982; 1985; 1987). Aproximadamente 30 a 40 % do selênio corpóreo está associado a glutathiona peroxidase (MULERNAN, 1999). A atividade da enzima glutathiona peroxidase de fígado e plasma é indicativa do grau de suprimento de selênio (WATANABE et al., 1997). A atividade da enzima glutathiona peroxidase está reduzida em galinhas com dieta deficiente em selênio, e aumenta em função logarítmica ao aumento de selênio na dieta. (OMAYE e TAPPEL, 1974).

A enzima glutathiona peroxidase de hidroperóxidos de fosfolipídios (PHGSHPx) apresenta função similar a GSHPx na redução de hidroperóxidos, entretanto fisiologicamente é capaz de catalisar apenas a redução de hidroperóxidos lipídicos nas membranas celulares. Além disso pode utilizar outros tióis como substrato além da GSH (EQUAÇÃO VI).



A 5'-deiodinase é uma selenoproteína de membrana que catalisa a conversão do hormônio L-tiroxina (T4) para o hormônio biologicamente ativo 3,3'-5 triotironina (T3). Esta enzima já foi encontrada na tireóide, fígado e rins de rato. Estudos com selênio marcado ( $[^{75}\text{Se}]$ -selenito) demonstraram que as subunidades da 5'-deiodinase contêm um átomo de selênio por monômero e que a selenocisteína é um resíduo essencial para a catálise desta enzima (BEHNE e KYRIAKOPOULOS, 1990).

A selenoproteína P, outra proteína que contém selenocisteína, está presente no plasma de mamíferos e apresenta uma rara composição, contendo no mínimo 8 resíduos de selenocisteína por subunidade. Suas funções ainda não estão bem esclarecidas, entretanto sugere-se que sua função seja transportar selênio do fígado para os testículos e podendo ainda servir como reserva de selênio (LINDER, 1990).

A inserção altamente específica da selenocisteína nas enzimas dependentes de selênio é um assunto não completamente elucidado, devendo ser alvo de novas pesquisas. O esqueleto carbônico do resíduo de selenocisteína na glutathiona peroxidase é derivado diretamente do aminoácido serina (SUNDE, 1987). O gene que codifica esta enzima contém o codon 'TGA' na posição correspondente a selenocisteína (GÜNZER et al., 1984). Em eucariontes, ocorre o envolvimento de um O-fosfoseril como um intermediário no processo de conversão de Seril-tRNA<sup>Sec</sup> em selenocisteinil-tRNA<sup>Sec</sup> (EQUAÇÃO VII).



A selenocisteína resultante desta combinação (Se-cys-tRNA) reconhece o codon 'UGA' (LINDER., 1990).

### 1.2.7 - Toxicologia

Os efeitos toxicológicos do selênio foram primeiramente identificados em animais decorrentes da ingestão de plantas seleníferas denominadas indicadoras primárias e secundárias. A doença alcalina (“alkali disease”) é um envenenamento crônico resultante da ingestão prolongada de plantas indicadoras secundárias, como os generos *Astor*, *Atriplex* e *Grindelia*, as quais acumulam níveis moderados de selênio. Esta doença provoca no gado sintomas de retardo no crescimento, deformações nos cascos, perda de pêlos e artrites (PAINTER, 1941; WILBER, 1980).

O falso cambalejar (“Blind staggers”) é uma doença de ordem aguda, resultante da ingestão de plantas acumuladoras primárias, tais como certas espécies dos gêneros *Astralus*, *Xyloriza*, *Oonopsis* e *Stanleya*, as quais contêm altos níveis de selênio (até 1000 ppm). Esta doença afeta principalmente o sistema nervoso central, ocasionando perda do controle



voluntário dos músculos e perda do apetite, o que leva a um enfraquecimento progressivo seguido de paralisação muscular seguida de morte (PAINTER, 1941; WILBER, 1980).

Em relação aos humanos, já em 1936 foi relatado que pessoas expostas a áreas e grãos seleníferos desenvolviam disfunções gástricas, intestinais e hepáticas (SMITH et al., 1936). Os efeitos crônicos resultantes da exposição ocupacional ao selênio em humanos estão bem documentados. Eles incluem principalmente gosto metálico na boca, odor de alho na respiração (devido a metilação do selênio), irritação das mucosas, gastroenterites, pigmentação avermelhada das unhas, cabelos e dentes (BUCHAN, 1947; CERWENKA e COOPER, 1961). Em casos de exposições a longo prazo os órgãos mais afetados parecem ser o sistema respiratório, seguido pelo sistema gastrointestinal e sistema nervoso central (DISKIN et al., 1978). Casos agudos tem sido pouco relatados, a maioria está relacionada com a ingestão excessiva (acidental, criminal ou suicida) ou com a inalação de determinados produtos de selênio.

Entre 1961 a 1964 foi confirmado a ocorrência de casos de selenoses do tipo agudo na região de Enshin na China (região cujo solo contém altos níveis de selênio). A sintomatologia desse tipo de selenose consistia em perda de cabelos e unhas, queda dentária, lesões no baço, edemas pulmonares e vários sintomas neurológicos (anestesia periférica, acroparesia, hiperreflexia dos tendões, convulsões, distúrbios motores e paralisias) (YANG et al., 1983). Nos Estados Unidos Unidos, também foram constatados casos de intoxicação por ingestão de alimentos com alta concentração de selênio. Os sintomas consistiam em ânsia de vômito, irritabilidade, fadiga e neuropatias periféricas (HELZISOUER et al., 1985).

### 1.2.8- Selênio e peixes

No Reservatório Martin Creek (Texas), contaminado por selênio proveniente de cinzas de carvão, usadas em termoelétricas, depositadas em um afluente, observou-se rápido declínio na biomassa de peixes (exceto *Cyprinos carpio*), observando-se ausência de indivíduos jovens (GARRETT e INMAN, 1984).

Estudos feitos no lago Belews (Carolina do Norte, US) relatam o desaparecimento de 16 espécies de peixes das 20 espécies originalmente encontradas (LEMLY, 1985). Uma avaliação da concentração de elementos traços na água e bióta verificou níveis elevados de selênio, sendo hipotetizado bioacumulação (biomagnificação) de selênio na cadeia alimentar o que levaria a falhas reprodutivas nos peixes e seu declínio populacional (CUMBIE e VANHORN, 1978; CHAPMAN, 1999). Monitorações no lago revelaram ausência de indivíduos jovens, apesar dos adultos desovarem naturalmente no lago.

A determinação da concentração de selênio nos meios aquáticos não contaminados revelou bioacumulação. Mencionando-se a seguinte concentração: água 0.1-0.4 µg/L, sedimento 0.2-2.0 mg/kg matéria seca, macrófitos 0.1-2.0 mg/kg matéria seca, invertebrados 0.5-2.0 mg/kg matéria seca e nos ovos de aves aquáticas foi de 0.5-4.0 mg/kg matéria seca (FAUST e ALY, 1981; EISLER, 1985; OHLENDORF, 1989). Foi observada bioacumulação de selênio em peixes onde alcançou concentração 1395 vezes superior ao da água (LEMLY, 2000).

A análise da concentração de selênio em diferentes tecidos de peixe revela altas concentrações nos ovários, na maioria dos tecidos analisados a concentração de selênio respondeu positivamente ao aumento da concentração de selênio na dieta (CUMBIE e VANHORN, 1978; SAGER e COFIELD, 1984; BROOKS et al., 1984; LEMLY, 1985;

BAUMANN e GILLESPIE, 1986; KAI et al., 1986). ONGLE e KNIGHT (1989) hipotetizaram que este resultado se deve a interação do sistema circulatório dos vertebrados na gametogênese de peixes ovíparos. Em vertebrados as substâncias absorvidas pelo intestino chegam ao fígado pelo sistema porta antes de serem distribuídos aos demais órgãos. O fígado é importante na vitelogenese em peixes ovíparos, pois sintetiza os precursores da gema do ovo (NG e IDLER, 1983), de modo que quando o selênio é absorvido dos alimentos, os processos metabólicos hepáticos (incluindo vitelogenese) sofrem exposição máxima. Esta hipótese é reforçada pelo achado de que a acumulação de selênio nos ovários coincide com o período pré-reprodutivo (BRISON et al., 1984).

Em larvas alimentadas com dietas com selênio na concentração de 13 e 30 ppm de selênio orgânico (Se-D,L-metionina) e 30 ppm de selênio inorgânico (selenito) decresceu a sobrevivência larval e ocorreram mal formações; também foram relatados edemas nas larvas (WOOCK et al., 1987). Efeitos semelhantes foram observados em águas com concentração de 13 ppm selênio orgânico (Se-D,L-metionina) e 10 ppm selênio inorgânico (selenito) (WOOCK et al., 1987). Observações de larvas em águas contaminadas revelam que as larvas não sobrevivem á fase de inicio de natação.

Trutas alimentadas com altas concentrações de selênio desenvolvem calcinose renais. Ocorrendo inflamação e degeneração dos túbulos renais (HILTON e HODSON, 1983; HICKS et al., 1984).

Nível elevado de selênio na dieta causa depressão no crescimento de peixes (BENNETT et al., 1986), embora ainda não esteja claro se este efeito é primário ou secundário. Sendo o efeito secundário o mais aceito, uma vez que vários trabalhos relatam diminuição das atividades alimentares ou não ingestão de alimentos com altas concentrações de selênio (HILTON et al., 1980; HILTON e HODSON, 1983; HICKS et al., 1984; FINLEY, 1985; HAMILTON et al., 1986; WOOCK et al., 1987). Diminuição na ingestão de alimentos com níveis acima de 10 ppm de selenito foi relatada em trutas (BRYSON et al., 1984).

MAIER e KNIGHT (1994) não observaram alterações nos parâmetros reprodutivos e de crescimento e sobrevivência larval de peixes da espécie *Pimephales promelas* (família *Ciprinus*) expostos a altas concentrações de selenito, selenato e selênio orgânico.

A família *Ciprinus* provavelmente seja mais resistente a bioacumulação de selênio. (ONGLE e KNIGHT, 1989). Os ciprinídeos possuem um trato gastrointestinal indiferenciado, faltando um estômago verdadeiro e válvula pilórica. Possui ainda uma microflora bacteriana bastante restrita. A incorporação de elementos inorgânicos em aminoácidos é realizada pelas bactérias intestinais aumentando sua biodisponibilidade (WHANGER et al., 1978; FONG e MANN., 1980; HUDMAN e GLENN., 1984; 1985). Outro aspecto relatado é a influência do pH, pois a ausência de estômago deixa todo o processo digestivo ocorrer em condições neutras ou alcalinas. Meios ácidos favorecem a estabilidade de formas reduzidas de selênio (selenito) e meios alcalinos favorecem formas oxidadas (selenato) (CALLAHAN et al., 1979).

O selenato é menos apto a entrar nas rotas bioquímicas orgânicas do que espécies de selênio reduzidas (selenito) (ONGLE et al., 1988). Diferentes condições de pH também podem estar envolvidas na hidrólise e biodisponibilidade da selenocisteína (HUBER and CRIDDLE, 1967).

Um grande número de trabalhos foram desenvolvidos para determinar a concentração a partir da qual o selênio não teria efeitos tóxicos cumulativos, os dados variam amplamente sendo o resumo apresentado como tabela por MAIER e KNIGHT (1994) (TABELAS 02 e 03).

**TABELA 2 - Concentrações máximas de selênio sem efeitos tóxicos em peixes.**

<b>Concentração máxima na água</b>	
USEPA (1987)a	5 µg/L
Lemly e Smith (1987)	2-5 µg/L
U. C. Committee (1988)b	1-1.5 µg/L
DuBowy (1989)	<2.8 µg/L
CSWRCB (1988)c	0.9 µg/L
Skorupa e Ohlendorf (1991)	0.5-2.7 µg/L
Peterson e Nebeker (1992)	0.7-2.1 µg/L
SFRWQCB (1992)d	0.1-0.8 µg/L
<b>Concentração máxima no alimento</b>	
Lemly e Smith (1987)	3-5 mg/kg matéria seca
Hamilton et al. (1990)	< 3 mg/kg matéria seca
Skorupa e Ohlendorf (1991)	1.2-2.9mg/kg matéria seca
<b>Concentração tecidual máxima (peixes)</b>	
Lemly e Smith (1987)	5-10 mg/kg matéria seca
Skorupa e Ohlendorf (1991)	3- 8 mg/kg matéria seca

a- Environmental Protection Agency

b- University of California Committee of Consultants

c- California State Water Resources Control Board

d- San Francisco Bay Regional Water Quality Control Board

**TABELA 3- Concentrações a partir das quais foram observados efeitos tóxicos em peixes.**

<b>Concentração na água</b>	
Lemly (1985)	10 µg/L
Malchow (1990)	10 µg/L
Hermanutz et al. (1992)	10 µg/L
Skorupa e Ohlendorf (1991)	>2.7 µg/L
Peterson e Nebeker (1992)	0.7-2.1 µg/L
SFRWQCB (1992)a	0.1-0.8 µg/L
<b>Concentração no alimento</b>	
Hilton et al. (1980)	>3 mg/kg matéria seca.
Hodson and Hilton (1983)	10-13 mg/kg matéria seca.
Heinz et al. (1989)	≥ 4 mg/kg matéria seca.
Moore et al. (1990)	> 4 mg/kg matéria seca.
Malchow (1990)	2.1 mg/kgmatéria seca.
Hamilton et al (1990)	3.2-5.3 mg/kg matéria seca
Skorupa e Ohlendorf (1991)	>2.9mg/kg matéria seca
<b>Concentração corporal (peixes)</b>	
Skorupa e Ohlendorf (1991)	>8 mg/kg matéria seca.
Malchow (1990)	2.5 mg/kg matéria seca
Hamilton et al (1990)	3.4 a 4.5 mg/kg matéria seca.

a- San Francisco Bay Regional Water Quality Control Board

### 1.2.9 - Deficiência

Pequenas doses de selênio podem ter efeitos preventivos ou curativos contra várias doenças, como por exemplo a doença do músculo branco (“white muscle disease”) ou “weisses fleish”, uma miopatia localizada que envolve calcificação dos ossos e dos músculos do coração. Esta doença afeta várias espécies animais como porcos (EGGERT et al., 1957), carneiros (MUTH et al., 1958), pintos (CALVERT et al., 1962), bovinos (HARLEY et al., 1961), cavalos (DODD et al., 1960), perus (WALTER et al., 1964) e peixes (POSTON et al., 1976). Outros sinais de deficiência de selênio podem incluir atrofia pancreática em pintos (THOMPSON et al. 1970), danos na função testicular (fragilidade e perda da motilidade dos espermatozoides) (WU et al., 1973) e ocorrência de cataratas em ratos (WHANGER et al., 1975).

Em vacas leiteiras os sintomas de deficiência incluem aumento da incidência de mastite; alta contagem de células somáticas no leite; cicatrização mais lenta no pós parto; cio silencioso; baixa concepção e baixa fertilidade; distrofia muscular; anemia associada a presença de corpúsculos de Heinz e necrose hepática multifocal (fígado em maravalha). Todavia alguns destes sintomas também são causados por deficiência de vitamina E na dieta (MULERNAN, 1999).

O selênio é um micronutriente requerido na alimentação de peixes (POSTON et al., 1976). Sintomas da deficiência de selênio em trutas e catfish cultivados incluem a diátese exudativa, a redução da atividade da enzima glutati0na peroxidase e o baixo crescimento.



Níveis adequados de selênio na dieta reduzem infecções bacterianas em peixes (MACFARLANE et al., 1986). Também tem sido relatado diminuição na toxicidade e bioacumulação de mercúrio (KIM et al., 1977). Deficiências nutricionais tem sido relacionadas com a “*Hidra disease*” do salmão, que se manifesta como distrofia muscular e degeneração miocárdial, ocorrendo ainda anemia, hemorragias e acúmulo de fluido na cavidade peritoneal e pericárdio (FJOELSTAD e HEYEAAS, 1985; POPPE et al., 1986).

No ser humano níveis insuficientes de selênio na dieta tem sido associados a duas doenças que ocorrem na China em áreas em que o solo é pobre em selênio. A doença de Keshan, uma cardiomiopatia que afeta principalmente crianças (Keshan Disease Research Group, 1979) e a doença de Kashin-Beck, uma artrose endêmica que acomete adolescentes e pré-adolescentes (OLDIFIELD, 1987). Evidências epidemiológicas em diferentes regiões revelam uma relação entre doenças cardiovasculares e deficiências de selênio, todavia esta relação ainda não está bem estabelecida (WILBER, 1980; SALONEN et al., 1982). Da mesma forma ainda não esta clara a relação inversa entre níveis de selênio e mortalidade por câncer (WILBER, 1980; SALONEN, 1984).

#### **1.2.10 - Selênio, $\delta$ -ALA D e síntese do heme**

A delta-aminolevulinato desidratase é uma enzima sufidrílica, cuja atividade pode ser inibida por uma variedade de agentes bloqueadores de grupos tiólicos (GOERING e FOWLER, 1984, 1985; RODRIGUES et al., 1989; ROCHA et al., 1993, 1995). A reação catalisada pela  $\delta$ -ALA D faz parte da rota de síntese de compostos tetrapirrólicos como o grupamento heme, conseqüentemente a inibição desta enzima pode produzir alterações patológicas decorrentes da inibição da rota de biossíntese do heme (FISCHBEIN et al., 1982; SASSA et al., 1989; GOERING, 1993) e ainda resultar no acúmulo do substrato ALA, o

qual pode ter alguma atividade pró-oxidante por estar envolvido na produção de espécies ativas de oxigênio (BECHARA et al., 1993).

Com relação aos efeitos do selênio na enzima  $\delta$ -ALA D, já foi evidenciado que a exposição ao selênio inorgânico causa perturbação na síntese do heme em animais e humanos (MAINES e KAPPAS, 1976; DAS et al., 1989; HOLNES et al., 1989; KHAN et al., 1993), a qual pode estar associada em humanos com níveis elevados de porfirinas na urina (RANSOME, 1961). Tem sido relatado um efeito inibitório direto na  $\delta$ -ALA D de embriões de pinto e ratos após a exposição ao selênio inorgânico “in vivo” (MAINES e KAPPAS, 1976; PADMAJA e PRASAD, 1993; PADMAJA et al., 1996). O mesmo processo inibitório da  $\delta$ -ALA D pode estar envolvido no quadro toxicológico que ocorre nos peixes, afetando principalmente seu desenvolvimento nas fases larvais. De fato, o selênio no meio aquático pode estar presente nas formas inorgânicas (principalmente seleneto e selenito) e orgânicas (principalmente seleneto de dimetila, disseleneto de dimetila e selenoaminoácidos) (MAIER e KNIGHT, 1994).

Como no ambiente aquático podemos encontrar o selênio tanto na forma inorgânica como na forma orgânica e, sendo nestas duas formas este elemento inibidor da  $\delta$ -ALA D, torna-se importante avaliar a inibição da  $\delta$ -ALA D como possível bioindicador da exposição de peixes a este elemento. O estudo de um bioindicador torna-se importante também pelo fato da biogeoquímica do selênio no meio aquático não estar completamente elucidado (CHAPMAN, 1999), associado ao fato do selênio ser o elemento essencial que possui a maior proximidade entre as necessidades dietéticas e efeitos tóxicos (CHAPMAN, 1999). A sua liberação no meio ambiente tende a aumentar principalmente por atividades antropogênicas (LEMLY, 1999).

A atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D esta diretamente relacionada com o estado reduzido de seus grupos -SH, o que torna a  $\delta$ -ALA-D sensível a ação de agentes oxidantes.

O selênio é um elemento traço essencial. Sua participação no sítio ativo da glutathione peroxidase é seu papel biológico mais importante. A glutathione peroxidase reduz  $H_2O_2$  a  $H_2O$  pela oxidação da glutathione reduzida. Portanto, a glutathione peroxidase tem um papel anti-oxidante, uma vez que degrada um potente gerador de radicais hidroxil. Todavia, quando fora da enzima, o selênio parece atuar como agente oxidante. Em estudos prévios foi pesquisado o efeito das formas orgânicas e inorgânicas de selênio as quais aceleram cataliticamente a oxidação de grupos  $-SH$ , incluindo a glutathione reduzida (BARBOSA et al., 1998).

### 1.3 – Objetivos:

Compostos de selênio ou seus produtos de biotransformação são inibidores da  $\delta$ -ALA-D. A existência dum sistema enzimático que forma um composto mais ativo já foi evidenciada em sobrenadantes de fígado de ratos (BARBOSA et al., 1998; MACIEL et al., 2000). A biotransformação de compostos de selênio para formas mais ativas pode envolver rotas de hidroxilação, tal rota em peixes é menos ativa (TIMPRELL, 1991), de modo que se procederá um estudo comparativo entre duas fontes enzimáticas de peixe (brânquias e fígado de jundiá *Rhamdia quelen*) e de mamífero (fígado de rato *Rattus norvegicus*) com os seguintes objetivos:

- Investigar o efeito do diseleneto de difenila  $(PHSe)_2$ , do selenito de sódio  $Na_2SeO_3$  e do disseleneto de dibutila  $(BuSe)_2$  sobre a atividade da  $\delta$ -ALA D de S1 de homogeneizado de fígado e de brânquias de peixe e de fígado de rato. O selenito de sódio será utilizado como controle, uma vez que não é metabolizado pelo citocromo P450;

- Investigar o possível papel protetor do DTT sobre a inibição causada por estes compostos na atividade da  $\delta$ -ALA-D, uma vez que este agente tiólico protege a enzima contra a inibição causada por agentes sulfidrílicos clássicos;
- Avaliar o efeito destes compostos de selênio, na presença e na ausência de fatores teciduais, sobre a velocidade de oxidação do DTT.
- Correlacionar os resultados obtidos entre as diferentes fontes de enzima.

## 2.0- MATERIAL E MÉTODOS:

### 2.1 – Reagentes e equipamentos

#### 2.1.1 – Reagentes

- $\delta$ - Aminolevulinato Desidratase purificada – Sigma
- Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) – Merck e Sigma
- Ácido acético glacial – Reagen
- Ácido clorídrico – VETEC
- Ácido delta-aminolevulinico hidrocloreto – Sigma
- Ácido etileno-diamino-tetraacético – Reagen
- Ácido tricloro acético (TCA) – VETEC
- Albumina bovina – Reagen
- Álcool etílico – Synth
- Cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) - Synth
- Cloreto de sódio – Merck
- Cloreto de zinco – Sigma
- Comassie Azul Brilhante – Sigma
- Dimetil sulfoxido (DMSO) – Nuclear
- Dioxano – Merck

- DL – ditiotreitól (DDT) – Sigma
- Fluoreto de fenil metil sulfonil – Sigma
- Fosfato de potássio mono e dibásico – VETEC
- Hidróxido de sódio – Sigma
- Sulfado de amônio – Reagen

### **2.1.2 – Equipamentos**

- Banho Maria NT 248 – Nova Técnica
- Centrifuga Himac CR 21 E – Hitachi
- Centrifugas – Quimis
- Espectrofotômetro U 2001 – Hitachi
- Homogeneizador de tecidos – Heidolph

## **2.2 – Animais experimentais**

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, com idade adulta (dois meses) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram adaptados a um habitat com temperatura controlada (22-25°C), iluminação natural e alimentação (Guabi-RS) e água *ad libitum*, em uma sala do prédio do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Os peixes (*Rhamidia quelen*) foram provenientes do criatório do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria e de criatórios da região.

### **2.3 – Preparação do tecido animal**

Os ratos foram anestesiados com éter e mortos por decapitação. Os peixes foram insensibilizados por imersão em água gelada e em seguida mortos por decapitação.

Os tecidos foram rapidamente removidos, pesados e colocados em gelo, sendo homogeneizados em NaCl 150 mM (7 ml/g para fígado e 3 ml/g para brânquias). O homogeneizado foi centrifugado a 4.000 g a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante obtido (S1) foi utilizado para determinação da atividade da  $\delta$ -ALA-D.

### **2.4 – Purificação parcial da $\delta$ -ALA-D**

O fígado e as brânquias foram homogeneizados em 10 (ml/g) volumes de um meio contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 3 mM de DTT, 30  $\mu$ M de ZnCl<sub>2</sub> e 0,02 mM de fluoreto de fenil metil sulfonyl (PMSF). Os homogeneizados foram centrifugados a 4.000 g, a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante obtido (S1) foi aquecido a 60°C por 15 min e colocado rapidamente no gelo. As proteínas desnaturadas foram removidas por centrifugação a 4.000 g a 4°C por 15 min. O sobrenadante obtido (S2) foi tratado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 35% de saturação. As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação a 4.000 g, a 4°C por 20 min. O sobrenadante obtido (S3) foi tratado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até 55% de saturação e o precipitado foi coletado por centrifugação a 4.000 g, a 4°C por 20 min. O precipitado contendo a enzima (P<sub>55</sub>) foi suspenso em um meio contendo 20 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,4), 1 mM de DTT e 10  $\mu$ M de ZnCl<sub>2</sub>. A enzima parcialmente purificada foi estocada a -20°C.

## 2.5 – Determinação da atividade da $\delta$ -ALA-D

A atividade da  $\delta$ -ALA-D foi determinada de acordo com o método de Sassa (1982), através da medida da formação de seu produto (porfobilinogênio), em um meio de incubação contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 2,5 mM de ALA e o material enzimático. Para a enzima parcialmente purificada (P55) adicionou-se 100  $\mu$ M de DL-ditiotreitol (DTT) ao meio de reação. Após um período de pré-incubação de 10 min, a reação enzimática foi iniciada pela adição de substrato. O tempo de reação foi de 2 horas para fígado de peixe e de rato e de 3 horas para brânquias de peixe, a 39°C. A reação foi interrompida pela adição de TCA 10% contendo 10 mM de HgCl<sub>2</sub>. O produto da reação foi determinado com o reativo de Ehrlich, a 555 nm. O grau de inibição enzimática foi expresso em percentual em relação ao controle (100%).

## 2.6 – Síntese dos compostos orgânicos de selênio

Foram sintetizados como previamente descrito por Berhagel e Seibert (1932) e Braga et al (1996). A um balão de 3 bocas (munido de condensador de refluxo, agitador mecânico, funil de adição e sob atmosfera de N<sub>2</sub> ), adicionou-se selênio elementar ( 1 atg ; 78,9 g ) em porções de modo a manter um refluxo suave. Após a adição agitou-se por mais uma hora.

Em seguida neutralizou-se lentamente com 500 ml de solução saturada de cloreto de amônio. Separou-se a fase orgânica e extraiu-se a fase aquosa 2 vezes com 100 ml de éter etílico. Combinou-se as fases orgânicas e secou-se com sulfato de sódio anidro e filtrou-se. Deixou-se sob agitação por uma noite, para que o selenofenol fosse totalmente oxidado ao disseleneto de dioganoíla correspondente.



Em seguida evaporou-se o solvente e purificou-se o produto por recristalização com etanol (disseleneto de difenila) ou por destilação (disseleneto de dibutila).

## **2.7 – Determinação da taxa de oxidação do DTT**

A taxa de oxidação do DTT pelos compostos orgânicos de selênio foi determinada nas mesmas condições de ensaio utilizadas para determinação da atividade da  $\delta$ -ALA-D. Adicionou-se 84 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8) e iniciou-se a incubação, a 39°C, pela adição de DTT 2 mM.

A determinação de grupos –SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1960). Alíquotas de 50  $\mu$ L foram removidas do meio de reação aos tempos 0, 15, 30, 60 min após o início da incubação para a determinação do conteúdo de –SH livre. As alíquotas foram misturadas com 2 ml de água e 25  $\mu$ L de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A determinação da concentração do DTT no estado reduzido foi avaliada através da ligação dos grupamentos –SH com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), o qual se decompõe em ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (EQUAÇÃO VIII), que apresenta cor amarela intensa, sendo sua concentração determinada pela leitura de densidade ótica em 412 nm.

## **2.8 – Fracionamento dos homogeneizados por centrifugação diferencial**

O fígado de peixe ou de rato foi homogeneizado em MOPS 10 mM pH 6,8, com sacarose 0,32 M, sendo após submetido ao fracionamento por centrifugação:

- O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 g por 10 minutos: retirado precipitado 01 (P1) e sobrenadante 01 (S1). O P1 é enriquecido em núcleos e contém pedaços de tecido e células intactas também;

- O S1 foi dividido em duas porções, uma delas foi aquecida a 100 °C por 15 minutos e a outra continuou inalterada;

- O S1 foi centrifugado a 12.000 g por 20 minutos: retirado precipitado 02 (P2) e sobrenadante 02 (S2). P2 é enriquecido em mitocôndrias;

- O S2 foi centrifugado a 18.000 g por 30 minutos: retirado precipitado 03 (P3) e sobrenadante 03 (S3). Esta fração (P3) deve conter basicamente microssomas “pesados” e fragmentos de membrana plasmática;

- O S3 foi centrifugado a 40.000 g por 120 minutos: retirado precipitado 04 (P4) e sobrenadante 04 (S4). O P4 deve conter basicamente microssomas e o S4 proteínas solúveis.

O S1 desnaturado termicamente (S1D) foi fracionado pelo mesmo protocolo; originando as frações: S1D, S2D, S3D, S4D, P2D, P3D e P4D.

As alíquotas de cada fração foram congeladas em nitrogênio líquido e para a determinação do potencial de aceleração de oxidação do DTT foram diluídas em MOPS 10 mM, pH 6,8, com sacarose 0,32 M para uma concentração de proteína de 1,5mg/ml.

A capacidade de aceleração da oxidação do DTT de cada fração na presença e ausência de (PhSe)<sub>2</sub> foi testada conforme protocolo descrito no item 2.7.

## **2.9 – Determinação de proteínas**

O conteúdo protéico das amostras foi medido de acordo com o método de BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

## **2.10 – Determinação de IC<sub>50</sub>**

O IC<sub>50</sub> para a inibição *in vitro* da  $\delta$ -ALA-D de fígado e brânquias por compostos de selênio foi calculado pelo método de DIXON e WEBB (1964).

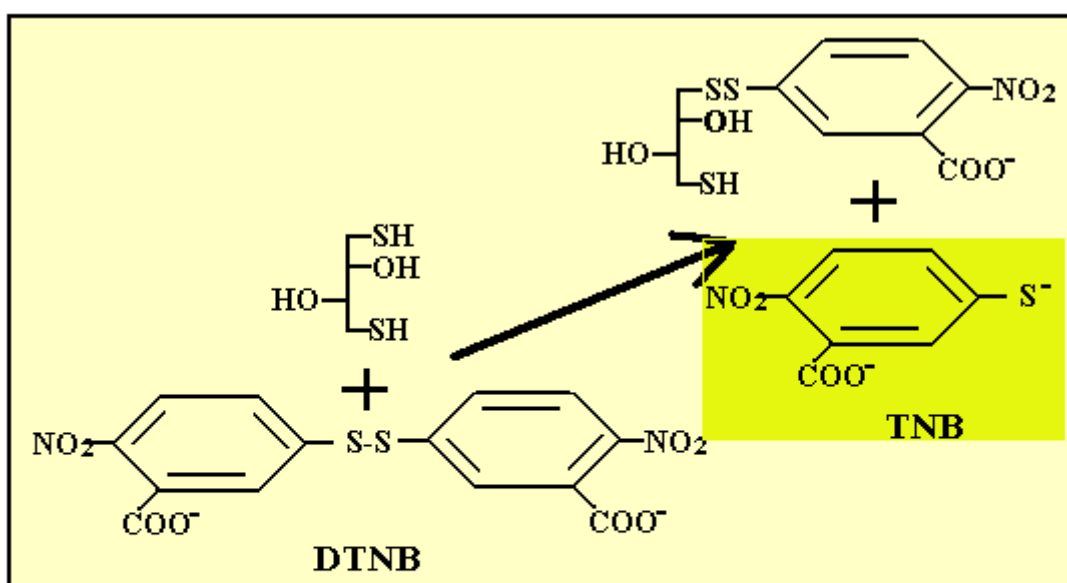
## **2.11– Análise estatística:**

Para a análise estatística, utilizou-se o Programa Estatístico SPSS/ Pc-plus em microcomputador. Os métodos de análise estão indicados nas figuras.

### 3.0 – RESULTADOS

#### 3.1 - Efeito de formas orgânicas de selênio sobre a atividade da $\delta$ -ALA-D "in vitro" em fígado e brânquias de peixe e em fígado de rato.

Com o objetivo de avaliar o efeito inibitório de compostos orgânicos de selênio sobre a atividade  $\delta$ -ALA-D, a enzima foi exposta a concentrações crescentes de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e o disseleneto de dibutila (BuSe)<sub>2</sub> (nas concentrações zero, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,1 mM, 0,4 mM e 1 mM). Os valores foram expressos em atividade percentual em relação ao controle, cuja leitura em absorbância foi considerada como 100 % de atividade. Como fonte enzimática foi utilizado sobrenadante (S1) de fígado de peixe ou sobrenadante (S1) de fígado de rato. Os dados são apresentados em escala numérica em relação ao eixo "X" (concentração de selênio) ( FIGURA 05 ).



#### EQUAÇÃO VIII

DTNB = Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico.

TNB = Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico. Apresenta cor amarela intensa.

A exposição da  $\delta$ -ALA-D de S1 de fígado de peixe e de fígado de rato ao  $(\text{PhSe})_2$  "in vitro" mostrou que a enzima destas duas fontes é sensível a inibição por  $(\text{PhSe})_2$ . O teste estatístico utilizado foi a análise de variância de duas vias (ANOVA), que mostrou efeito significativo do  $(\text{PhSe})_2$  em inibir a atividade da enzima ( $F(5,62)=84,74$ ;  $p<0.01$ ) ( FIGURA 05 A ).

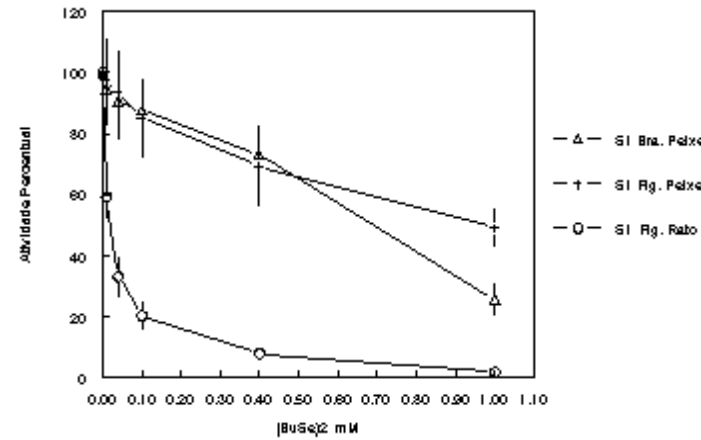
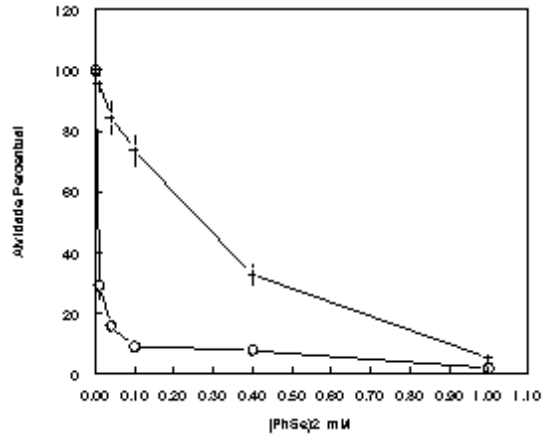
A enzima  $\delta$ -ALA-D de S1 de fígado de rato foi mais sensível a inibição por  $(\text{PhSe})_2$ , mantendo 29,08 % de atividade quando exposta a uma concentração de 0,01 mM de  $(\text{PhSe})_2$ . Na mesma concentração de 0,01mM de  $(\text{PhSe})_2$  a enzima  $\delta$ -ALA D de S1 de fígado de peixe manteve atividade de 95,61 %. Esta diferença de inibição não foi observada na maior concentração de  $(\text{PhSe})_2$  testada (1 mM). A ANOVA de duas vias mostrou interação significativa entre espécies e  $(\text{SePh})_2$  ( $F(5,62)=40,33$ ;  $p<0.01$ ), indicando que a enzima de fígado de rato ( $IC_{50} = 0,007$  mM ) é mais sensível a inibição por  $(\text{PhSe})_2$  do que a enzima de fígado de peixe ( $IC_{50} = 0,27$  mM ) ( FIGURA 05 A ).

Com objetivo de melhor avaliar a susceptibilidade da enzima  $\delta$ -ALA-D destas duas espécies animais frente a ação inibitória de selenetos orgânicos, repetiu-se o protocolo anterior utilizando outro seleneto orgânico, o disseleneto de dibutila  $(\text{BuSe})_2$ . Testou-se ainda a susceptibilidade da  $\delta$ -ALA D de outro tecido de peixe, utilizando-se S1 de brânquias de peixe (FIGURA 05 B ).

A enzima  $\delta$ -ALA-D de S1 de fígado de rato mostrou ser inibida por este seleneto orgânico, mantendo 59,31 % de atividade em relação ao controle quando exposta a uma concentração de 0,01 mM de  $(\text{BuSe})_2$ . A  $\delta$ -ALA-D de fígado de peixe na mesma concentração apresentou atividade de 97,34 %. Em uma concentração maior de  $(\text{BuSe})_2$  (1

mM) a  $\delta$ -ALA-D de fígado de rato perdeu quase a totalidade de sua atividade catalítica, mantendo apenas 1,77% de atividade. Na mesma concentração a  $\delta$ -ALA-D de fígado de peixe manteve atividade de 49,21%. O comportamento da enzima  $\delta$ -ALA D destas duas fontes foi estatisticamente diferente ( $F(2,121)=17,83$ ;  $p<0.01$ ), por ser a enzima de fígado de rato inibida em concentrações menores de  $(\text{BuSe})_2$  ( $IC_{50} = 0,021$  mM) do que a enzima de fígado de peixe ( $IC_{50} = 0,98$  mM). O  $(\text{BuSe})_2$  promoveu a inibição da enzima ( $F(5,121)=24,35$ ;  $p<0.01$ ) (FIGURA 05 B).

A enzima  $\delta$ -ALA-D de S1 de brânquias de peixe ( $IC_{50} = 0,69$  mM), manteve 94,55% de atividade quando exposta a 0,01 mM de  $(\text{BuSe})_2$  e 73,08 % de atividade quando exposta a 0,4 mM de  $(\text{BuSe})_2$ . Na concentração de 1 mM de  $(\text{BuSe})_2$  sua atividade foi de 25,62 % da atividade do controle, portando-se desta forma bastante semelhante a enzima de fígado de peixe. A análise estatística mostrou interação significativa entre os tecidos analisados e a presença de  $(\text{BuSe})_2$  ( $F(10,121)=6,63$ ;  $p<0.01$ ) (FIGURA 05 B).



A)

B)

**FIGURA 05 - Efeito inibitório de formas orgânicas de selenio sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D de fígado e brânquias de peixe e de fígado de rato.**

**A) Disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>. Absorbância do controle: Fígado de peixe: 0,219; Fígado de rato: 0,555**

**B) Disseleneto de dibutila (BuSe)<sub>2</sub>. Absorbância do controle: Fígado de peixe: 0,334; Fígado de rato: 0,527; Brânquias peixe: 0,204**

Os sobrenadantes (S1) de fígado ou brânquias de peixe ou de rato foram pré-incubados por 10 min em meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. A reação foi iniciada pela adição de ALA (2,4 mM). Foram utilizadas concentrações crescentes de selênio (zero, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,1 mM, 0,4 mM e 1 mM). Após 120 min de incubação (fígado) ou 180 min (brânquias) a 39°C a reação foi parada com TCA a 10% com HgCl<sub>2</sub> 10mM. A formação de porfobilinogênio foi avaliada pelo uso do reativo de EHRLICH. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EP (n=8).

### **3.2 - Papel protetor do DTT na inibição da atividade da enzima $\delta$ -ALA-D por diferentes concentrações de compostos de selênio.**

Com objetivo de investigar o possível envolvimento de resíduos cisteinil no efeito inibitório do selênio sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D, testou-se o efeito protetor do DTT, um ditiol que protege a  $\delta$ -ALA-D de reagentes sulfidrílicos clássicos, mantendo os grupos -SH da enzima no estado reduzido (RODRIGUES et al., 1989). Para quantificar o grau de proteção da atividade enzimática pelo DTT, procedeu-se a exposição da enzima  $\delta$ -ALA-D frente a concentrações crescentes de selênio (zero, 62,5  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 250  $\mu$ M e 500  $\mu$ M). A enzima  $\delta$ -ALA-D foi novamente exposta as mesmas concentrações de selênio, na



presença de 7,11 mM de DTT no meio de incubação. A diferença entre as atividades percentuais em cada concentração de selênio com e sem DTT define o percentual de proteção da inibição da atividade enzimática. ( FIGURA 06 ).

A  $\delta$ -ALA D de brânquias de peixe manteve atividade de 6,48 % em relação ao controle quando exposta a 500  $\mu$ M de  $(\text{PhSe})_2$ , já na presença de 7,11 mM de DTT esta atividade foi de 76,63 %; um efeito protetor de 70,15 % sobre a atividade da enzima. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo do  $(\text{PhSe})_2$  em promover a inibição da enzima ( $F(5,59)=8,19$ ;  $p<0,01$ ) e uma interação significativa entre os efeitos de  $(\text{PhSe})_2$  e DTT ( $F(4,59)=3,32$ ;  $p<0,05$ ), o que é mostrado pelo aumento do percentual de proteção da inibição enzimática com o aumento da concentração de  $(\text{PhSe})_2$  ( FIGURA 06 A).

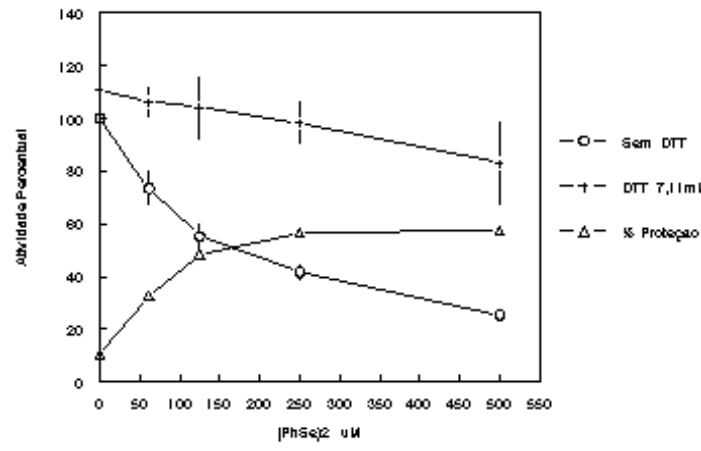
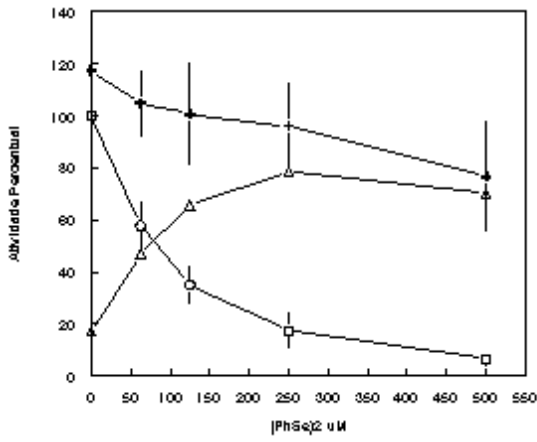
A  $\delta$ -ALA D de fígado de peixe manteve atividade de 25,53 % em relação ao controle quando exposta a 500  $\mu$ M de  $(\text{PhSe})_2$ , já na presença de 7,11 mM de DTT esta atividade foi de 82,95 %; um efeito protetor de 57,42 % na atividade. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do  $(\text{PhSe})_2$  na inibição enzimática ( $F(4,54)=16,63$ ;  $p<0,01$ ). Ocorreu uma interação significativa entre  $(\text{PhSe})_2$  e DTT ( $F(4,54)=6,63$ ;  $p<0,05$ ), o que é demonstrado pelo aumento do percentual de proteção da inibição enzimática com o aumento da concentração de  $(\text{PhSe})_2$ . Os resultados mostraram alta capacidade do DTT em prevenir a inibição da  $\delta$ -ALA D frente a inibição causada por selenetos orgânicos ( $F(1,54)=69,39$ ;  $p<0,01$ ) ( FIGURA 06 B ).

A experiência acima foi repetida utilizando-se uma fonte de selênio inorgânica, o selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). A  $\delta$ -ALA D de S1 de brânquias de peixe quando exposta ao  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  teve comportamento semelhante ao da exposição a  $(\text{PhSe})_2$ . A  $\delta$ -ALA D de brânquias de peixe manteve atividade de 14,75 % quando exposta a 500  $\mu$ M de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , com a presença de 7,11 mM de DTT esta atividade foi de 65,75 %; um efeito protetor de

51 % na atividade enzima. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  na inibição da enzima ( $F(4,16)=10,51$ ;  $p<0,01$ ). A adição de DTT ao meio de incubação teve efeito significativo na proteção da enzima da inibição ( $F(1,16)=19,80$ ;  $p<0.01$ ), não ocorrendo interação significativa entre  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e DTT ( FIGURA 07 ).

**A)**

**B)**



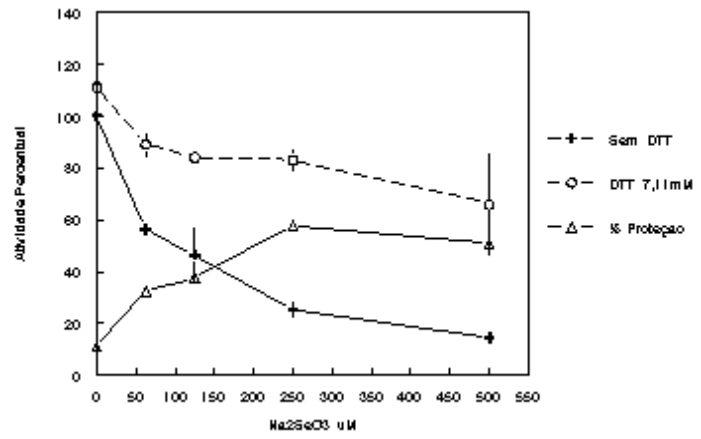
**FIGURA 06 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D de fígado e de brânquias de peixe.**

**A) Brânquias de peixe. Absorbância do controle: 0,191;**

**B) Fígado de peixe. Absorbância do controle: 0,456;**

Os sobrenadantes (S1) de fígado e de brânquias de peixe foram pré-incubado por 10 min em meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Na presença de diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> (zero, 62,5 $\mu$ M, 125 $\mu$ M, 250 $\mu$ M e 500  $\mu$ M ), na ausência e presença de DTT 7,1mM. A reação foi iniciada pela adição de ALA (2,4mM). Após 120 min de incubação a 39°C a reação foi parada com TCA a 10% com HgCl<sub>2</sub> 10mM. A formação de porfobilinogênio foi avaliada pelo uso do reativo de EHRLICH. A diferença no grau de inibição percentual entre as leituras com e sem DTT em cada concentração de (PhSe)<sub>2</sub> deu origem a linha de proteção percentual. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EP (n=8) .

**A)**



**FIGURA 07 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório do selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D de brânquias de peixe. Absorbância do controle: 0,2;**

O sobrenadante (S1) de brânquias de peixe foi pré-incubado por 10 min em meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Na presença de diferentes concentrações de ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (zero, 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ ), na ausência e presença de DTT 7,1mM. A reação foi iniciada pela adição de ALA (2,4mM). Após 120 min de incubação a 39°C a reação foi parada com TCA a 10 % com  $\text{HgCl}_2$  10mM. A formação de porfobilinogênio foi avaliada pelo uso do reativo de EHRlich. A diferença no grau de inibição percentual entre as leituras com e sem DTT em cada concentração de ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) deu origem a linha de proteção percentual. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EP (n=8).

**3.3 - Papel protetor de diferentes concentrações de DTT na inibição da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D por compostos de selênio (II).**

Para verificar mais detalhadamente o efeito do DTT na proteção da inibição da  $\delta$ -ALA D por compostos de selênio, utilizou-se uma concentração fixa de 1 mM de diferentes compostos selênio. Esta concentração de selênio foi incubada com concentrações crescentes de DTT (zero, 0,4 mM, 1 mM, 4 mM, 10 mM e 40 mM), determinou-se a atividade da  $\delta$ -ALA D em cada concentração de DTT ( FIGURA 08, 09 e 10).

A enzima S1 de brânquias de peixe demonstrou atividade de 14,82% em relação ao controle quando exposta a 1 mM de  $(\text{PhSe})_2$ . A ANOVA de duas vias demonstrou efeito

significativo do  $(\text{PhSe})_2$  1 mM na inibição da atividade da  $\delta$ -ALA D de S1 de brânquias de peixe ( $F(1,69)=145,41$ ;  $p<0,01$ ). A presença de DTT no meio de incubação teve efeito significativo em proteger a enzima da inibição, o aumento da atividade foi crescente até a concentração de 10 mM (atividade de 95,7%) ( $F(5,69)= 6,55$ ;  $p<0.01$ ). A adição de 40 mM de DTT ao meio de incubação contendo 1 mM de  $(\text{SePh})_2$  ocasionou queda na atividade enzimática (atividade de 17,35%). De forma contrária ao esperado na concentração de 40 mM, o DTT mostra redução de sua capacidade de proteger atividade da  $\delta$ -ALA D frente a exposição a 1 mM de  $(\text{PhSe})_2$ . O fato do DTT na concentração de 40 mM quando adicionado no meio de incubação aumentar a atividade da  $\delta$ -ALA D (119,5 %) demonstra que o efeito não se deve unicamente ao DTT e sim sua interação com o  $(\text{PhSe})_2$ , o que foi confirmado pela análise estatística ( $F(5,69)=4,38$ ;  $p<0.01$ ) ( FIGURA 08 A ).

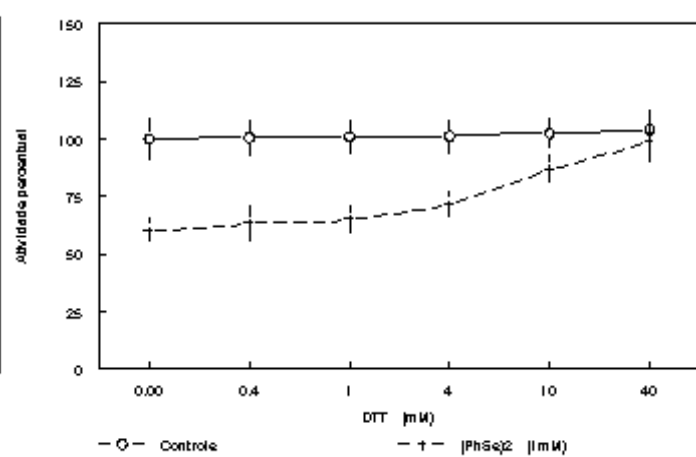
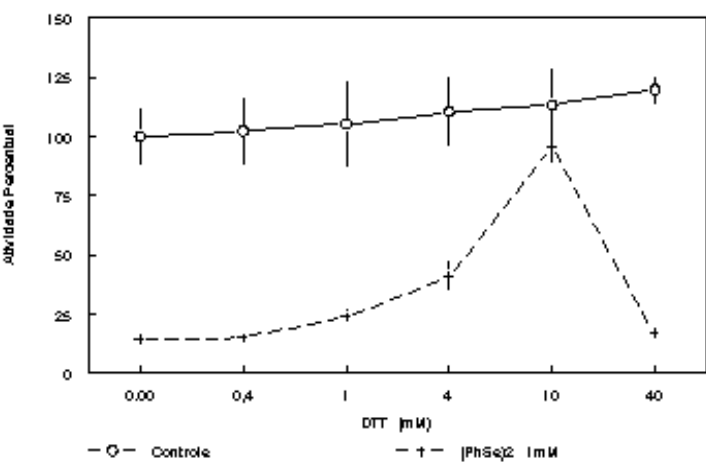
A enzima  $\delta$ -ALA D de fígado de peixe exposta a 1 mM de  $(\text{PhSe})_2$  manteve 60,3% de sua atividade. A adição de DTT ao meio de incubação diminuiu a inibição da enzima (10 a 40 mM de DTT). A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo do  $(\text{PhSe})_2$  1 mM na inibição da atividade da  $\delta$ -ALA D de S1 de fígado de peixe ( $F(1,89)=33,07$ ;  $p<0,01$ ), não ocorrendo interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e do DTT ( FIGURA 08 B ).

No caso da enzima de fígado de rato, a adição de 1 mM de  $(\text{PhSe})_2$  reduziu a atividade da enzima para 21,55% do controle. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo do  $(\text{PhSe})_2$  1 mM na inibição da atividade da  $\delta$ -ALA D de homogeneizado de fígado de rato ( $F(1,67)=181,64$ ;  $p<0,01$ ), não ocorrendo interação significativa entre  $(\text{PhSe})_2$  e DTT. A adição de DTT ao meio de incubação protegeu a enzima da inibição, todavia não foi estatisticamente significativo ( FIGURA 09 A ).

O experimento utilizando enzima parcialmente purificada de brânquia de peixe (P55) mostrou que o  $(\text{PhSe})_2$  inibe a enzima ( $F(1,59)=3509,22$ ;  $p<0.01$ ). O DTT nas concentrações testadas ( 0,04 mM, 0,1 mM, 0,4 mM, 1 mM ) protegeu a atividade da enzima ( $F(5,59)=44,89$ ;  $p<0.01$ ), todavia na concentração de 4 mM tende a potencializar o efeito inibitório do  $(\text{PhSe})_2$  0,1mM sobre a enzima ( $F(5,59)=34,49$ ;  $p<0.01$ ) ( FIGURA 10 A ).

A enzima  $\delta$ -ALA D parcialmente purificada de brânquia de peixe (P55), também foi exposta a inibição por  $(\text{BuSe})_2$  na concentração de 0,4 mM. Também foi avaliado o poder de proteção sobre a inibição da atividade da  $\delta$ -ALA D por DTT nas concentrações de 0,04 mM, 0,1 mM, 0,4 mM, 1 mM e 4 mM . A enzima  $\delta$ -ALA D parcialmente purificada de brânquia de peixe (P55) foi sensível a inibição por  $(\text{BuSe})_2$  0,4 mM mantendo atividade de 41,18% em relação ao controle ( $F(1,59)=363,70$ ;  $p<0.01$ ). A presença de DTT protegeu a enzima da inibição ( $F(5,59)=7,87$ ;  $p<0.01$ ), este aumentou com o aumento de concentração do DTT, atingindo 64,7% da atividade em relação ao controle na maior concentração de DTT testada (4mM) ( FIGURA 10 B ).





A)

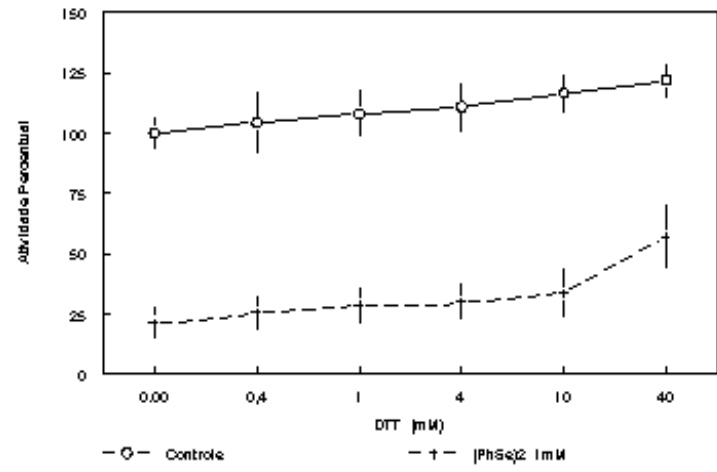
B)

**FIGURA 08 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D.**

**A) Brânquias de peixe. Absorbância do controle: 0,206**

**B) Fígado de peixe. Absorbância do controle: 0,521**

O sobrenadante (S1) de brânquias e de fígado de peixe foi pré-incubado por 10 min em meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Na presença e ausência de (PhSe)<sub>2</sub> 1 mM e de diferentes concentrações de DTT (zero, 0,4 mM, 1 mM, 4 mM, 10 mM e 40 mM). A reação foi iniciada pela adição de ALA (2,4 mM). Após 120 min (fígado) ou 180 min (brânquias) de incubação a 39 °C a reação foi parada com TCA a 10 % com HgCl<sub>2</sub> 10 mM. A formação de porfobilinogênio foi avaliada pelo uso do reativo de EHRLICH. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EP (n=8) .

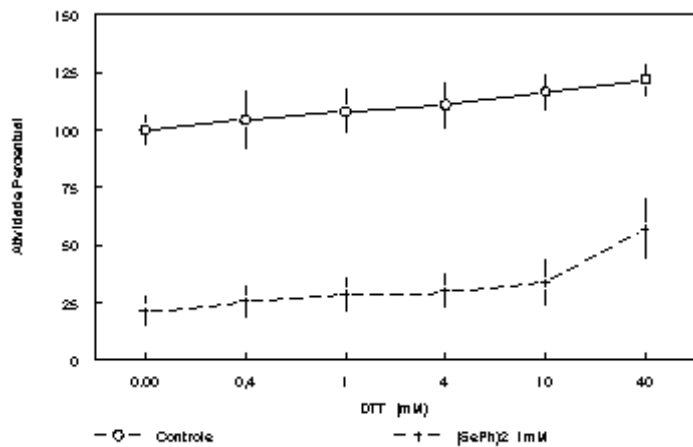
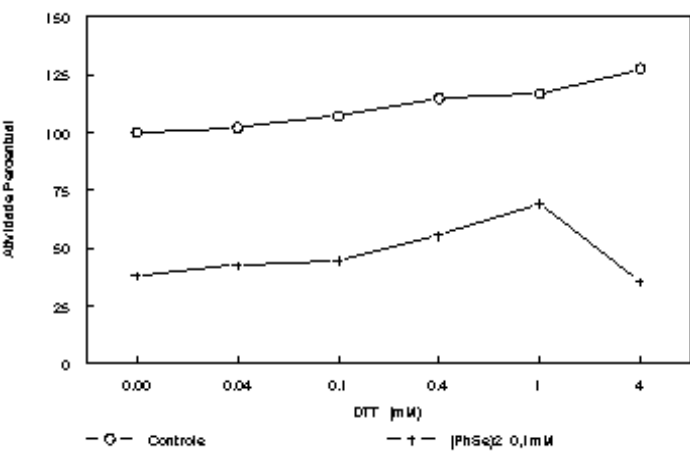


A)

**FIGURA 09 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D.**

**A) Fígado de rato. Absorbância do controle: 0,825**

O sobrenadante (S1) de fígado de rato foi pré-incubado por 10 min em meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Na presença e ausência de (PhSe)<sub>2</sub> 1 mM e de diferentes concentrações de DTT (zero, 0,4 mM, 1 mM, 4 mM, 10 mM e 40 mM). A reação foi iniciada pela adição de ALA (2,4 mM). Após 120 min de incubação a 39 °C a reação foi parada com TCA a 10 % com HgCl<sub>2</sub> 10 mM. A formação de porfobilinogênio foi avaliada pelo uso do reativo de EHRLICH. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EP (n=8).



A)

B)

**FIGURA 10 - Efeito protetor do DTT sobre o efeito inibitório de compostos de selênio orgânico sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D de P55 de brânquias de peixe.**

**A) Disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> . Absorbância do controle: 0,131**

**B) Disseleneto de dibutila (BuSe)<sub>2</sub> . Absorbância do controle: 0,133**

A enzima  $\delta$ -ALA-D parcialmente purificada (P55) de brânquias de peixe foi pré-incubada por 10 min em meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Na presença e ausência de selênio orgânico {[A] (PhSe)<sub>2</sub> 0,1 mM] ou [B] (BuSe)<sub>2</sub> 0,4 mM ]} e de diferentes concentrações de DTT (zero, 0,04 mM, 0,1 mM, 0,4 mM, 1 mM e 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de ALA (2,4 mM). Após 180 min de incubação a 39 °C a reação foi parada com TCA a 10 % com HgCl<sub>2</sub> 10 mM. A formação de porfobilinogênio foi avaliada pelo uso do reativo de EHRLICH. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EP (n=8) .

### **3.4 - Efeito do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> sobre a velocidade de oxidação de DTT, na ausência e presença de fontes enzimáticas.**

A inibição da  $\delta$ -ALA D pelos compostos de selênio estudados envolve a oxidação do resíduos cisteinil presentes no sítio ativo da enzima. Para investigar o efeito deste composto como oxidante de grupamentos sulfidrílicos, utilizou-se o DTT como um modelo de substrato contendo grupos - SH.

Para avaliar a oxidação de grupos -SH utilizou-se 2 mM de DTT como fonte de grupos -SH no estado reduzido, decidiu-se elaborar uma análise detalhada do efeito dos compostos de selênio na aceleração da oxidação de grupos -SH, utilizou-se neste estudo S1

de fígado e brânquias de peixe e P55 de fígado de peixe, para verificar seu efeito na oxidação do DTT na presença de 2 mM de DTT, nos tempos zero, 15 , 30 e 60 minutos ( FIGURAS 11 e 12 ).

Os resultados são expressos em percentual em relação ao estado de oxidação do controle sem selênio, sendo sua leitura em absorbância no tempo zero considerada como 100 % de redução. Nas descrições posteriores o tempo zero será representado por T0, tempo 15 minutos por T15 , tempo 30 minutos por T30 e o tempo 60 minutos por T60.

Na ausência de enzima (S1) o DTT sofreu oxidação no decorrer do tempo ( $F(3,112)=15,30$ ;  $p<0.01$ ), mantendo redução de 85,2% no T60 em relação ao T0. A adição de  $(\text{PhSe})_2$  aumentou a oxidação do DTT ( $F(4,112)=22,64$   $p<0.01$ ), em todas as concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  testadas. O  $(\text{PhSe})_2$  aumentou a velocidade de oxidação do DTT mesmo no tempo zero, sendo menor na concentração de 40  $\mu\text{M}$  e aumentou com o aumento de concentração e com o decorrer do tempo ( $F(11,112)=1,99$ ;  $p<0.05$ ). Na concentração de 1mM de  $(\text{SePh})_2$  no T60 o percentual de redução foi de 7,53% (FIGURA 11 A).

Na presença de S1 de brânquias de peixe ocorreu aceleração da oxidação do DTT no decorrer do tempo ( $F(3,113)=58,30$ ;  $p<0.01$ ), mantendo 47,41 % do poder redutor no T60. O acréscimo de 40  $\mu\text{M}$  de  $(\text{SePh})_2$  ao tubo causou rápida aceleração da oxidação do DTT (7,68% do poder redutor no T60). A aceleração da oxidação respondeu positivamente ao aumento da concentração de  $(\text{PhSe})_2$  ( $F(4,113)=23,03$ ;  $p<0.01$ ). Ocorreu interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo ( $F(10,113)=2,97$ ;  $p<0.01$ ) (FIGURA 11 B).

Na presença de S1 de fígado de peixe ocorreu aceleração da oxidação do DTT no decorrer do tempo ( $F(3,122)=73,20$ ;  $P<0.01$ ), mantendo 51,95 % do poder redutor

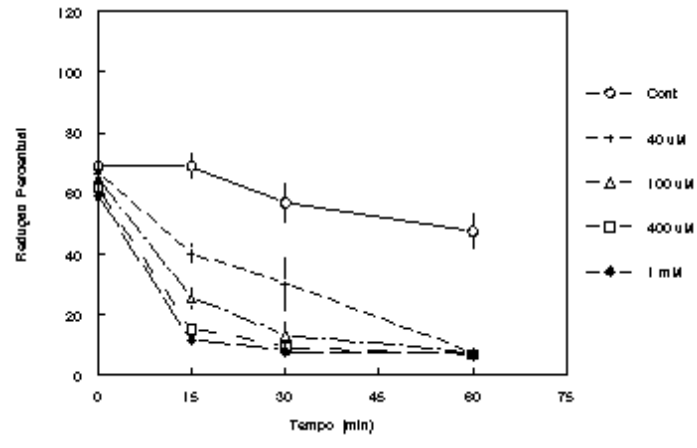
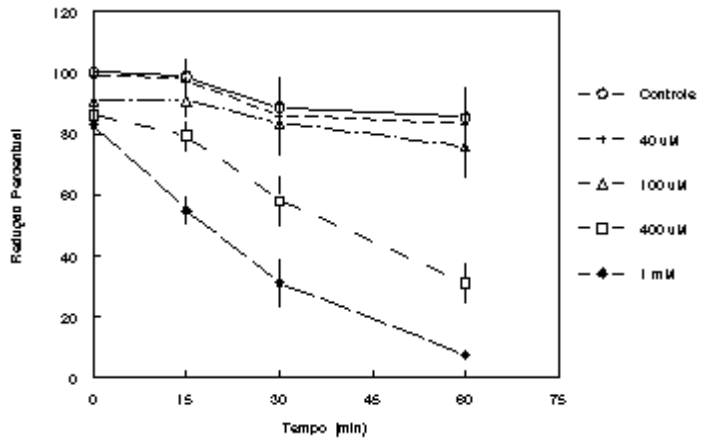
no T60. O acréscimo de 40  $\mu\text{M}$  de  $(\text{SePh})_2$  ao tubo causou rápida aceleração da oxidação do DTT (17,72% do poder redutor no T60) ( $F(4,122)=26,97$   $p<0.01$ ). A aceleração da oxidação respondeu positivamente ao aumento da concentração de  $(\text{PhSe})_2$ . Ocorreu interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo ( $F(12,122)=1,85$ ;  $p<0.05$ ) (FIGURA 12 A ).

Na presença de P55 de fígado de peixe ocorreu aceleração da oxidação do DTT no decorrer do tempo ( $F(3,120)=46,27$ ;  $p<0.01$ ), mantendo 47,18 % do poder redutor no T60. O acréscimo de 40  $\mu\text{M}$  de  $(\text{PhSe})_2$  ao tubo causou aceleração da oxidação do DTT. (31.5% do poder redutor no T60) ( $F(4,120)=26,79$   $p<0.01$ ). A aceleração da oxidação respondeu positivamente ao aumento da concentração de  $(\text{PhSe})_2$ . Não ocorreu interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo ( FIGURA 12 B ).

**A)**

**B)**





**FIGURA 11. Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Absorbância do controle: 0,983**

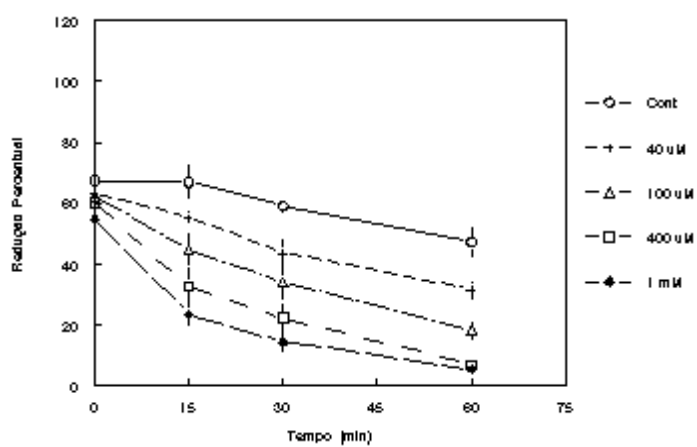
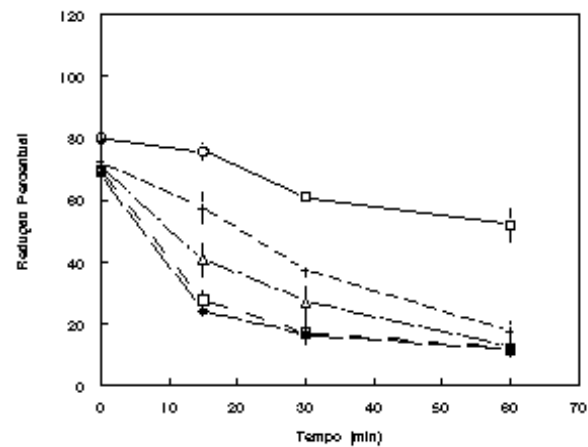
**A) Sem tecido**

**B) S1 de brânquias de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8, pré-incubado por 10 min a 39 °C. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de –SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos –SH. A determinação de grupos –SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os resultados são expressos em percentual em relação ao tempo zero do controle sem tecido (FIGURA 11 A). Os dados são expressos como média ± EP ( n=04).

**A)**

**B)**



**FIGURA 12. Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Absorbância do controle: 0,983**

**A) S1 de fígado peixe**

**B) P55 de fígado de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8, pré-incubado por 10 min a 39 °C. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de –SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos –SH. A determinação de grupos –SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os resultados são expressos em percentual em relação ao tempo zero do controle sem tecido (FIGURA 11 A). Os dados são expressos como média ± EP (n=04).

**3.5 - Efeito do selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) sobre a velocidade de oxidação de DTT, na ausência e presença de fontes enzimáticas.**

Com base no protocolo do experimento anterior, repetiu-se o experimento utilizando uma fonte de selênio não orgânico, o selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), nas mesmas concentrações (zero, 0,04 mM, 0,1 mM, 0,4 mM e 1 mM). Utilizou-se S1 de fígado e brânquias de peixe e P55 de fígado de peixe, para verificar seu efeito na oxidação do DTT 2 mM, nos tempos zero, 15, 30 e 60 minutos. Os dados obtidos são mostrados em duas figuras (FIGURAS 13 e 14).

Os resultados são expressos em percentual em relação ao estado de redução do controle sem selênio, sendo sua leitura em absorbância no tempo zero considerada como

100% de redução. Nas descrições posteriores o tempo zero será representado por T0, tempo 15 minutos por T15, tempo 30 minutos por T30 e o tempo 60 minutos por T60.

A FIGURA 13 A, mostra os resultados de oxidação na ausência de fatores teciduais. Na ausência de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  o DTT sofreu oxidação no decorrer do tempo ( $F(3,59)=852,18$ ;  $p<0.01$ ), mantendo redução de 81,87 % no T60 em relação ao T0. A adição de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  quase que instantaneamente aumentou a oxidação do DTT ( $F(4,59)=1006,57$ ;  $p<0.01$ ). A oxidação do DTT aumentou com o aumento da concentração de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  no T0. De fato, já no T15 houve oxidação completa do DTT por todas as concentrações de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  testadas; ocorrendo interação significativa entre o efeito do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e o decorrer do tempo ( $F(12,59)=73,38$ ;  $p<0.01$ ).

A FIGURA 13 B, mostra os resultados de oxidação na presença de S1 de brânquias de peixe. Na ausência de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  o DTT sofreu oxidação no decorrer do tempo ( $F(3,62)=135,03$ ;  $p<0.01$ ). A presença de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  acelerou a oxidação do DTT ( $F(4,62)=145,07$ ;  $p<0.01$ ). No T15 houve oxidação completa do DTT por todas as concentrações de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  testadas; ocorrendo interação significativa entre o efeito do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e o decorrer do tempo ( $F(12,62)=10,18$ ;  $p<0.01$ ).

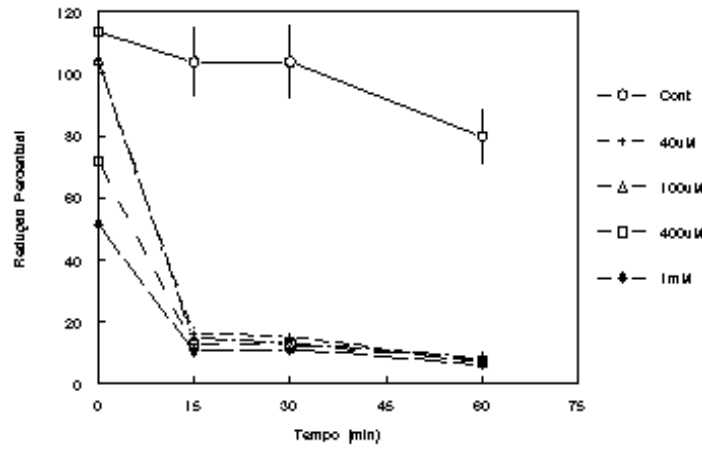
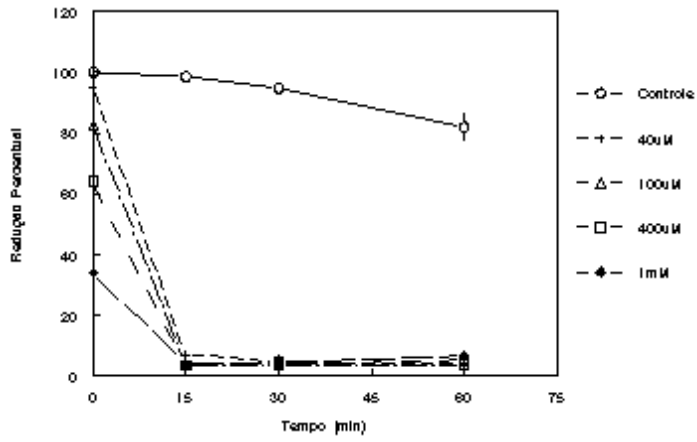
A FIGURA 14 A, mostra os resultados da oxidação na presença de S1 de fígado de peixe. Na ausência de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  o DTT sofreu pequena oxidação no decorrer do tempo ( $F(3,60)=192,15$ ;  $p<0.01$ ). O  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  acelerou a oxidação do DTT ( $F(4,60)=175,03$ ;  $p<0.01$ ). No T15 houve oxidação completa do DTT por todas as concentrações de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  testadas; ocorrendo interação significativa entre o efeito do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e o decorrer do tempo ( $F(12,60)=14,40$ ;  $p<0.01$ ).

A FIGURA 14 B, mostra os resultados de oxidação na presença de P55 de fígado de peixe. Na ausência de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  o DTT sofreu oxidação no decorrer do tempo

(F(3,61)=450,27;  $p<0.01$ ). A presença de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  acelerou a oxidação do DTT (F(4,61)=159,34;  $p<0.01$ ). No T15 houve oxidação completa do DTT por todas as concentrações de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  testadas; ocorrendo interação significativa entre o efeito do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e o decorrer do tempo (F(12,61)=24,14;  $p<0.01$ )

**A)**

**B)**



**FIGURA 13 - Efeito de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Absorbância do controle: 0,428**

**A) Sem tecido**

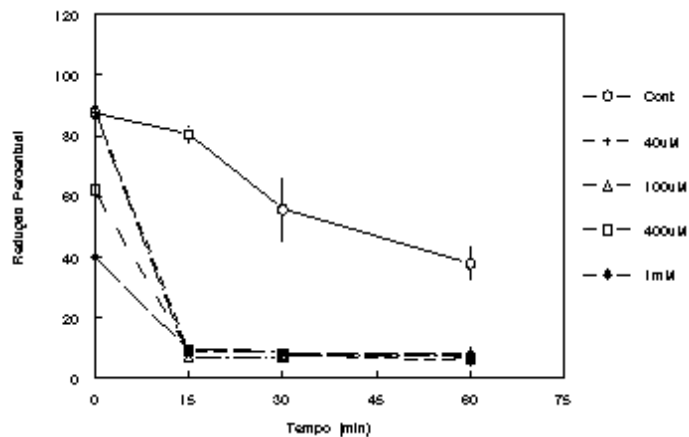
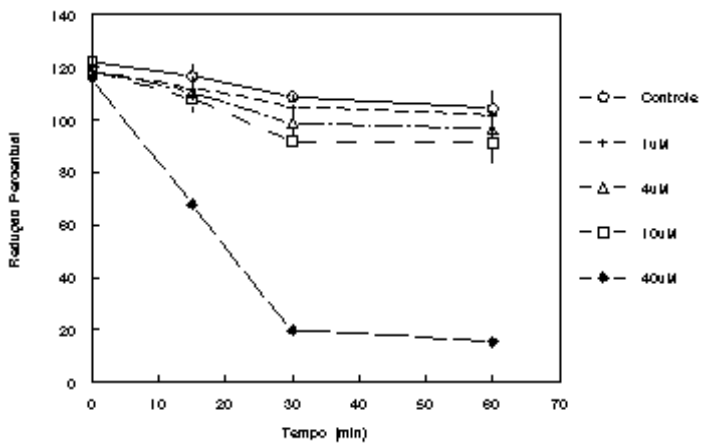
**B) S1 de brânquias de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8 e  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (zero, 40  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  e 1 mM), pré-incubado por 10 min a 39 °C. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzólico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao tempo zero do controle sem tecido (FIGURA 13 A). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP ( n=04).

**A)**

**B)**





**FIGURA 14 - Efeito de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Absorbância do controle: 0,428**

**A) S1 de fígado de peixe**

**B) P55 de fígado de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8 e  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (zero, 40  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  e 1 mM), pré-incubado por 10 min a 39 °C. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao tempo zero do controle sem tecido (FIGURA 13 A). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP (n=04).

Devido a rápida oxidação do DTT 2 mM por  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (em todas as concentrações testadas), completa já no T15 nos experimentos do protocolo anterior, repetiu-se o experimento utilizando  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  em concentrações menores (zero, 1  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ), testou-se novamente os sobrenadantes de fígado e brânquias de peixe e P55 de fígado de peixe, para verificar seu efeito na aceleração da oxidação do DTT 2 mM. Nos tempos zero, 15, 30 e 60 minutos. Os resultados obtidos são demonstrados em quatro gráficos (FIGURAS 15 e 16).

Os resultados são expressos em percentual em relação ao estado de redução do controle sem selênio, sendo sua leitura em absorbância no tempo zero considerada como 100% de redução. Nas descrições posteriores o tempo zero será representado por T0, tempo 15 minutos por T15, tempo 30 minutos por T30 e o tempo 60 minutos por T60.

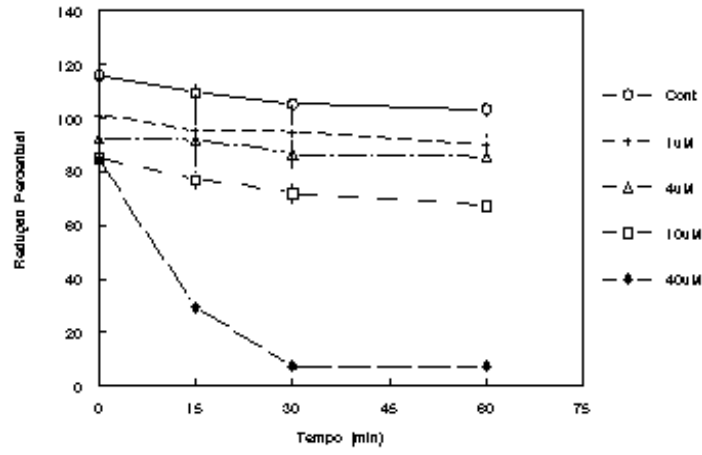
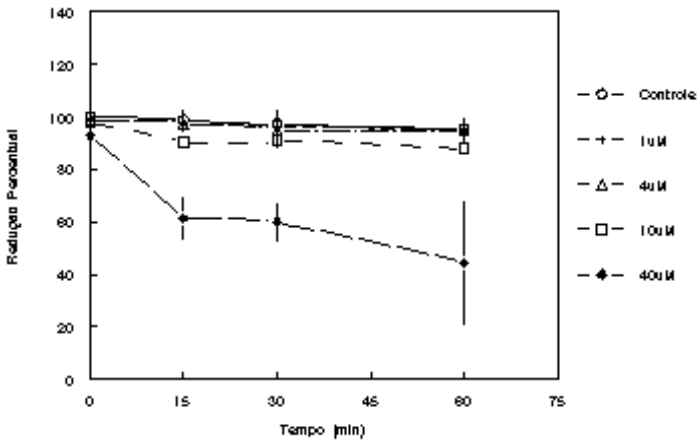
Na ausência de S1 e selênio, ocorreu pouca oxidação de DTT no decorrer do tempo ( $F(3,55)=2,8$ ;  $p<0.05$ ), mantendo redução de 95,43 % no tubo sem  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  no T60

em relação ao controle no T0. A adição de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  aumentou a oxidação do DTT ( $F(4,55)=10,11$ ;  $p<0.01$ ). O efeito foi mas acentuado na maior concentração ( $40 \mu\text{M}$ ) de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Não ocorreu interação significativa entre o efeito do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e o decorrer do tempo (FIGURA 15 A).

Na presença de S1 de brânquias de peixe o  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  acelerou a oxidação do DTT ( $F(4,54)=55,27$ ;  $p<0.01$ ). O efeito foi mas acentuado na maior concentração ( $40 \mu\text{M}$ ) de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e aumentou no decorrer do tempo, ocorrendo assim interação significativa entre o efeito do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e o decorrer do tempo ( $F(12,54)=3,26$ ;  $p<0.01$ ) (FIGURA 15 B).

Na presença de S1 de fígado de peixe o  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  acelerou a oxidação do DTT ( $F(4,48)=87,47$ ;  $p<0.01$ ). O efeito foi mas acentuado na maior concentração ( $40 \mu\text{M}$ ) de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e aumentou no decorrer do tempo, ocorrendo assim interação significativa entre o efeito do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e o decorrer do tempo ( $F(12,48)=10,04$ ;  $p<0.01$ ) (FIGURA 16 A).

Na presença de P55 de fígado de peixe o  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  acelerou a oxidação do DTT ( $F(4,52)=85,95$ ;  $p<0.01$ ). O efeito foi mas acentuado nas maiores concentrações de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ( $10$  e  $40 \mu\text{M}$ ) e aumentou no decorrer do tempo, ocorrendo assim interação significativa entre o efeito do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e o decorrer do tempo ( $F(12,52)=7,88$ ;  $p<0.01$ ) (FIGURA 16 B).

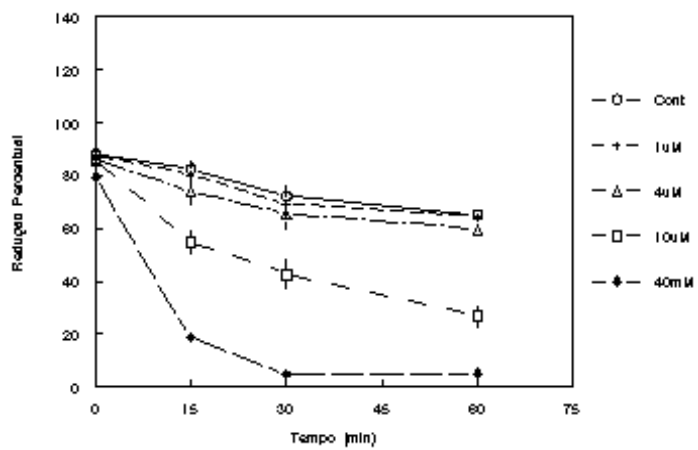
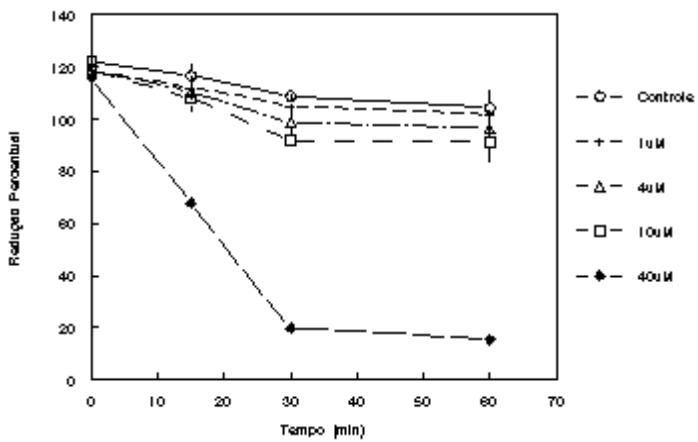


A)

B)

**FIGURA 15 - Efeito de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Absorbância do controle: 1,214**

**A) Sem tecido**



**B) S1 de brânquias de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8 e  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (zero, 1  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ), pré-incubado por 10 min a 39 °C. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzólico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao tempo zero do controle sem tecido (FIGURA 15 A). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP (n=04).

A)

B)

**FIGURA 16 - Efeito de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) na aceleração da oxidação do DTT nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Absorbância do controle: 1,214**

A) S1 de fígado de peixe

B) P55 de fígado de peixe

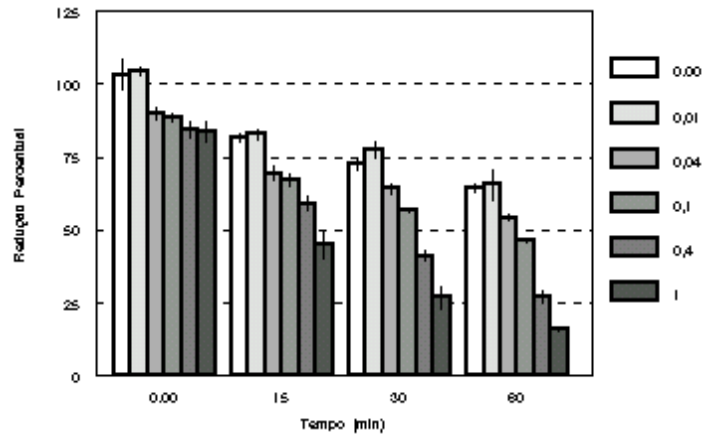
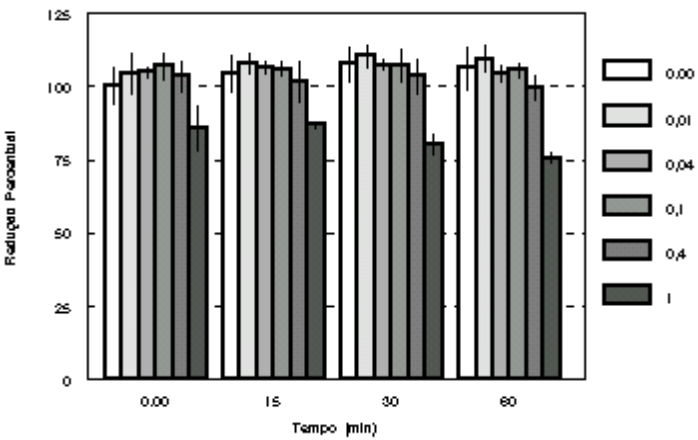
A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8 e  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (zero, 1  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ), pré-incubado por 10 min a 39 °C. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao tempo zero do controle sem tecido (FIGURA 15 A). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP ( n=04).

### **3.6 - Efeito do disseleneto de dibutila ( $\text{BuSe}_2$ ) sobre a velocidade de oxidação de DTT, na ausência e presença de fontes enzimáticas.**

Testou-se ainda o efeito de outra fonte de selênio orgânico ( $\text{BuSe}_2$ ) sobre a aceleração da velocidade de oxidação do DTT 2 mM (mesma concentração utilizada nos protocolos anteriores), na presença e ausência de tecido. Como fonte de tecido utilizou-se P55 de fígado de peixe. O ( $\text{BuSe}_2$ ) foi testado nas concentrações zero, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,1mM e 0,4mM e 1 mM, nos tempos zero, 15 , 30 e 60 minutos. Os resultados obtidos foram demonstrados em dois gráficos (FIGURA 17 ).

Os resultados são expressos em percentual em relação ao estado de oxidação do controle sem selênio, sendo sua leitura em absorbância no tempo zero considerada como 100% de redução. Nas descrições posteriores o tempo zero será representado por T0, tempo 15 minutos por T15 , tempo 30 minutos por T30 e o tempo 60 minutos por T60.





Na ausência de tecido o  $(\text{BuSe})_2$  não acelerou significativamente a oxidação do DTT. O DTT não sofreu oxidação no decorrer do tempo. Não ocorreu interação significativa entre o efeito do  $\text{BuSeSeBu}$  e o decorrer do tempo (FIGURA 17 A).

O  $(\text{BuSe})_2$  na presença de P55 de fígado de peixe aumentou a oxidação do DTT ( $F(4,57)=47,18$ ;  $p<0.01$ ). O DTT na presença de P55 de fígado de peixe sofreu oxidação no decorrer do tempo ( $F(3,57)=127,07$ ;  $p<0.01$ ). Não ocorreu interação significativa entre o efeito do  $(\text{BuSe})_2$  e o decorrer do tempo (FIGURA 17 B).

A)

B)

**FIGURA 17 - Efeito de disseleneto de dibutila  $(\text{BuSe})_2$  na aceleração da oxidação do DTT , nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Absorbância do controle: 1,162**

**A) Sem tecido****B) P55 de fígado de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8 e  $(\text{BuSe})_2$  (zero, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,1 mM e 0,4 mM e 1 mM), pré-incubado por 10 min a 39 °C. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os resultados são expressos em percentual em relação ao tempo zero do controle. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EP (n=04).

**3.7 - Efeito de frações sub-celulares obtidas por centrifugação diferencial de homogeneizado de fígado de rato sobre a velocidade de oxidação de DTT.**

Avaliou-se ainda o potencial de aceleração de oxidação de grupos -SH, por frações obtidas dos homogeneizados submetidos a centrifugações diferenciais, conforme técnica descrita no material e métodos. Utilizou-se o DTT na concentração de 2 mM como um modelo de composto contendo grupos -SH no estado reduzido. Foi avaliado o potencial de aceleração da oxidação de DTT de cada uma das frações separadas na ausência e presença de tecido, na presença e ausência de selênio [ $(\text{PhSe})_2$  0,08 mM]. Avaliou-se ainda a enzima termicamente desnaturada na presença e ausência de selênio [ $(\text{PhSe})_2$  0,08 mM]. O estado de oxidação foi mensurado nos tempos 00, 15, 30 e 60 minutos. A avaliação do potencial de aceleração da velocidade de oxidação do DTT das frações obtidas de fígado de rato são mostrados nas figuras 18, 19, 20 e 21.

Na ausência de P1 de fígado de rato praticamente não ocorreu oxidação do DTT, independente da presença de  $(\text{PhSe})_2$ . A presença de P1 de fígado de rato acelerou a oxidação do DTT ( $F(3,56)=9,78$ ;  $p<0.01$ ) aumentando seu efeito na presença de  $(\text{PhSe})_2$  ( $F(1,56)=8,09$   $p<0.01$ ). A ANOVA de três vias não mostrou interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo (FIGURA 18 A).

Na ausência de P2 de fígado de rato praticamente não ocorreu oxidação do DTT (independente da presença de  $(\text{PhSe})_2$ ). A adição de P2 causou um pequeno aumento na taxa de oxidação do DTT, que foi acentuada pela inclusão de  $(\text{PhSe})_2$  no meio. A ANOVA de três vias revelou um efeito significativo do tempo ( $F(3,67)= 16,63$ ;  $p<0.01$ ), do  $(\text{PhSe})_2$  ( $F(1,67)=7,77$ ;  $p<0.01$ ) e da presença de tecido ( $F(2,67)=17,09$ ;  $p<0.05$ ). As interações não foram significativas. De modo interessante, a desnaturação térmica aboliu este efeito (FIGURA 18 B).

A presença de P3 de fígado de rato (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) não acelerou significativamente a oxidação do DTT. A presença de  $(\text{PhSe})_2$  não aumentou significativamente a velocidade de oxidação do DTT. O DTT sofreu pequena oxidação no decorrer do tempo ( $F(3,72)=4,04$ ;  $p<0.01$ ). A ANOVA de duas vias demonstrou não haver interação significativa entre as variáveis testadas ( FIGURA 19 A ).

A presença de P4 de fígado de rato (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) não acelerou significativamente a oxidação do DTT. A presença de  $(\text{PhSe})_2$  não aumentou significativamente a velocidade de oxidação do DTT. O DTT sofreu pequena oxidação no decorrer do tempo ( $F(1,33)=5,8$ ;  $p<0.05$ ). Não houve interação significativa entre as variáveis testadas (FIGURA 19 B ).

A presença de S1 de homogeneizado de fígado de rato (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou modestamente a oxidação do DTT ( $F(2,72)=24,51$ ;  $p<0.01$ ). A desnaturação

térmica diminuiu este efeito. A presença de  $(\text{PhSe})_2$  (na ausência de S1) não afetou a velocidade de oxidação do DTT. Todavia a adição simultânea de  $(\text{PhSe})_2$  e S1 causou um aumento considerável na velocidade de oxidação do DTT ( $F(1,72)=11,77$ ;  $p<0.01$ ). De modo interessante, a desnaturação térmica do S1 aboliu completamente o efeito do  $(\text{PhSe})_2$  no aumento da velocidade de oxidação do DTT. A ANOVA de três vias mostrou interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e a presença de tecido ( $F(2,72)=3,90$ ;  $p<0.05$ ). Não ocorreu interação significativa entre o efeito do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo. Ocorreu interação significativa entre tecido e tempo ( $F(6,72)=3,38$   $p<0.01$ ). Não ocorreu interação significativa entre as três variáveis testadas ( $\text{PhSe})_2$ , tecido e tempo (FIGURA 20 A).

A presença de S2 de homogeneizado de fígado de rato (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou modestamente a oxidação do DTT ( $F(2,72)=18,56$   $p<0.01$ ), a desnaturação térmica diminuiu este pequeno efeito do S2. Na ausência de S2, o  $(\text{PhSe})_2$  não afetou a velocidade de oxidação do DTT, todavia na presença de S2, o  $(\text{PhSe})_2$  acelerou a oxidação do DTT ( $F(1,72)=11,20$ ;  $p<0.01$ ), este efeito foi abolido pela desnaturação térmica. A ANOVA de três vias demonstrou não haver interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e a presença de tecido. Não ocorreu interação significativa entre o efeito do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo. Ocorreu interação significativa entre tecido e tempo ( $F(6,72)=2,98$ ;  $p<0.05$ ). Não ocorreu interação significativa entre as três variáveis testadas ( $\text{PhSe})_2$ , tecido e tempo (FIGURA 20 B).

A presença de S3 de fígado de rato (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou modestamente a oxidação do DTT ( $F(1,48)=17,58$ ;  $p<0.01$ ). A desnaturação térmica aboliu este efeito. A presença de  $(\text{PhSe})_2$  simultaneamente com o S3 aumentou a velocidade de oxidação do DTT ( $F(1,48)=4,26$ ;  $p<0.05$ ), sendo este efeito diminuído pela

desnaturação térmica. A ANOVA de três vias demonstrou não haver interação significativa entre as três variáveis testadas  $(\text{PhSe})_2$ , tecido e tempo (FIGURA 21 A).

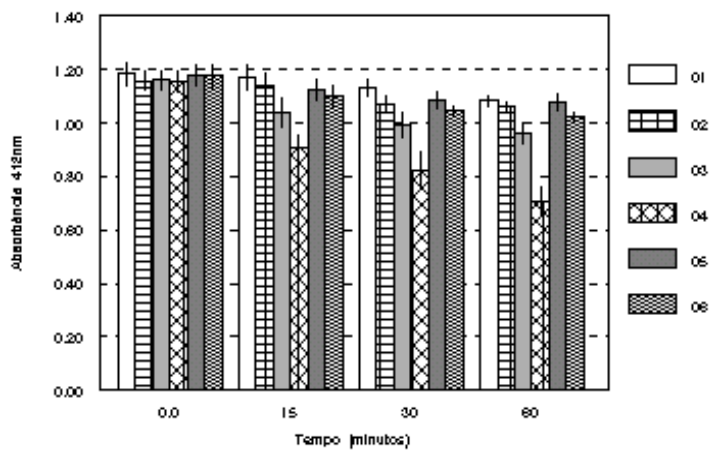
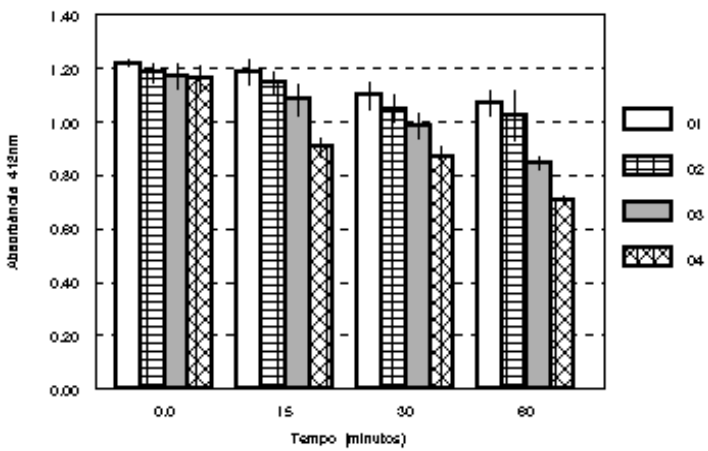
A presença de S4 de fígado de rato (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou modestamente a oxidação do DTT ( $F(2,73)=5,89$ ;  $p<0.01$ ), A desnaturação térmica aboliu este efeito. A presença simultânea de  $(\text{PhSe})_2$  e S4 tendeu a aumentar a velocidade de oxidação do DTT, mas não atingiu significância estatística. A ANOVA de três vias demonstrou não haver interação significativa entre as três variáveis testadas  $(\text{PhSe})_2$ , tecido e tempo. (FIGURA 21 B).

**A)**

**01:** Controle    **02:** Controle +  $(\text{PhSe})_2$  0,08mM    **03:** P    **04:** P +  $(\text{PhSe})_2$  0,08 mM

**05:** P desnaturado termicamente    **06:** P desnaturado termicamente +  $(\text{PhSe})_2$  0,08 mM

**B)**



**FIGURA 18 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença frações sub- celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos.**

**A) P1 de fígado de rato**

**B) P2 de fígado de rato**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Pré-incubados a 39 °C por 10 minutos antes da adição do DTT. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os dados estão expressos como média ± EP (n=04).

**A)**

**01:** Controle  
mM

**05:** P desnaturado termicamente  
mM

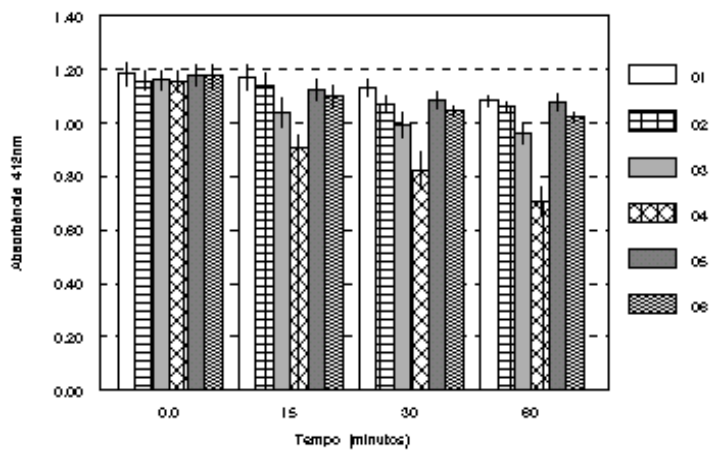
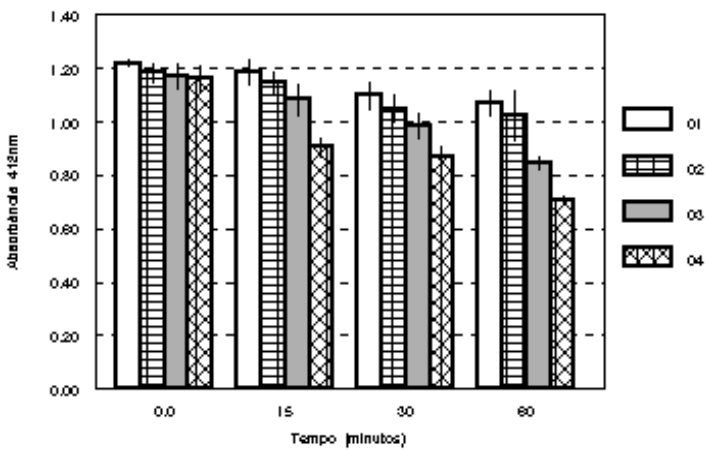
**B)**

**02:** Controle + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08mM      **03:** P      **04:** P + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08

mM

**06:** P desnaturado termicamente + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08  
mM





**FIGURA 19 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença frações sub- celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos**

**A) P3 de fígado de rato**

**B) P4 de fígado de rato**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Pré-incubados a 39 °C por 10 minutos antes da adição do DTT. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os dados estão expressos como média ± EP (n=04).

**A)**

**01:** Controle  
mM

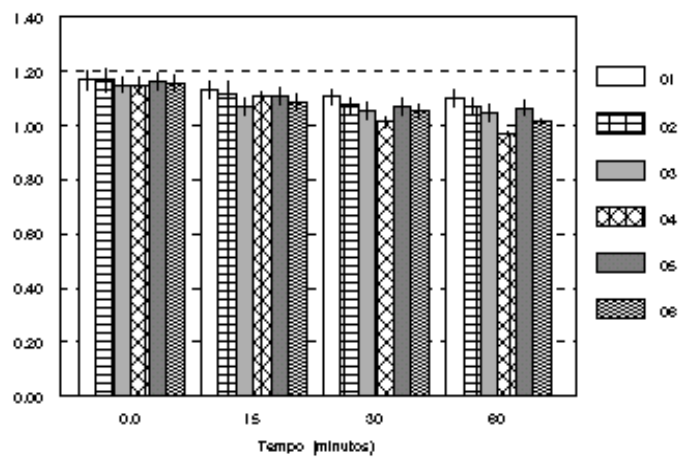
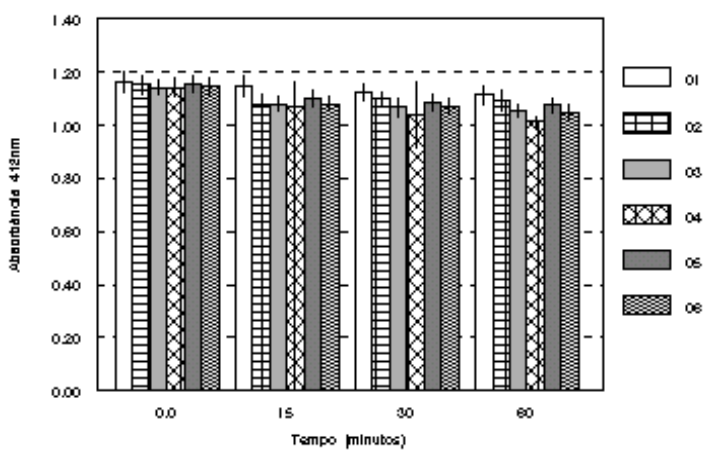
**05:** S desnaturado termicamente  
mM

**B)**

**02:** Controle + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08mM      **03:** S      **04:** S + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08

mM

**06:** S desnaturado termicamente + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM



**FIGURA 20 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença frações sub- celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos**

**A) S1 de fígado de rato**

**B) S2 de fígado de rato**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Pré-incubados a 39 °C por 10 minutos antes da adição do DTT. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os dados estão expressos como média ± EP (n=04).

**A)**

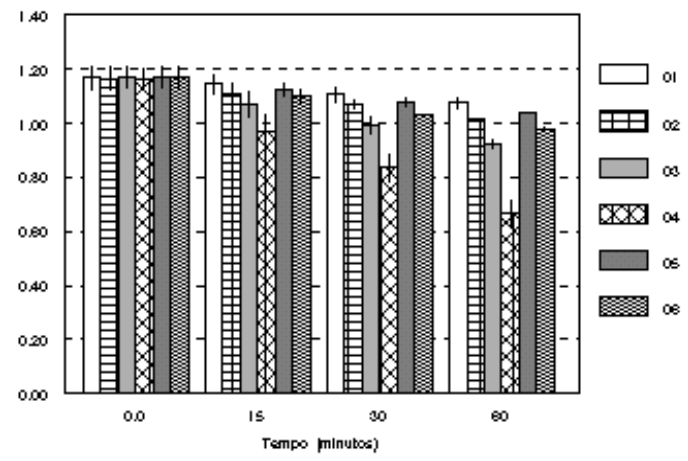
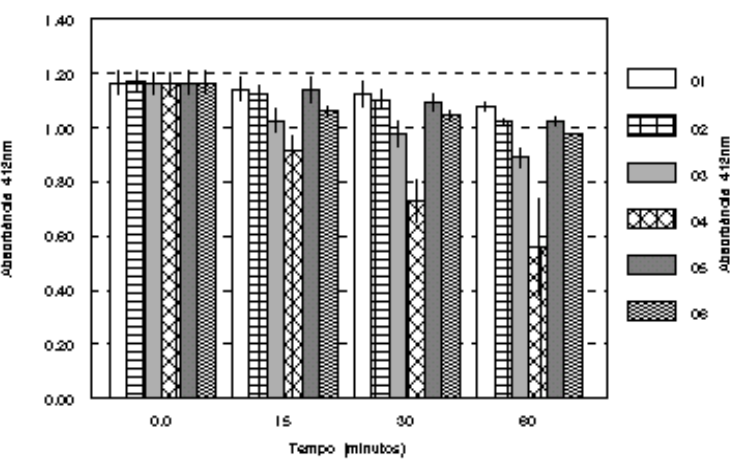
**01:** Controle  
mM

**05:** S desnaturado termicamente  
mM

**B)**

**02:** Controle + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08mM      **03:** S      **04:** S + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08

mM      **06:** S desnaturado termicamente + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08



**FIGURA 21 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença frações sub- celulares de fígado de rato nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos**

**A) S3 de fígado de rato**

**B) S4 de fígado de rato**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Pré-íncubados a 39 C° por 10 minutos antes da adição do DTT. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os dados estão expressos como média ± EP ( n=04).

**3.8 - Efeito de frações sub-celulares obtidas por centrifugação diferencial de homogeneizado de fígado de peixe sobre a velocidade de oxidação de DTT.**

A presença de P1 de fígado de peixe (na ausência de (PhSe)<sub>2</sub>) acelerou modestamente a oxidação do DTT (F(1,48)=49,46 p<0.01). Na ausência de tecido, o (PhSe)<sub>2</sub> não afetou a oxidação do DTT, todavia na presença de P1 o (PhSe)<sub>2</sub> aumentou a velocidade de oxidação do DTT (F(1,48)=25,50; p<0.01). A ANOVA de três vias não mostrou interação significativa entre os efeitos do (PhSe)<sub>2</sub> e o decorrer do tempo. Ocorreu interação significativa entre os efeitos do (PhSe)<sub>2</sub> e a presença de tecido (F(1,48)=14,17; p<0.01). Ocorreu também interação significativa entre tecido e tempo (F(3,48)=3,74; p<0.05). Porém na análise conjunta não ocorreu interação significativa entre as três variáveis testadas (PhSe)<sub>2</sub> , tecido e tempo (FIGURA 22 A).

A presença de P2 de fígado de peixe (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou a oxidação do DTT ( $F(2,72)=60,41$ ;  $p<0.01$ ), a desnaturação térmica aboliu este efeito. A presença simultânea de  $(\text{PhSe})_2$  e P2 aumentou a velocidade de oxidação do DTT ( $F(1,72)=27,34$ ;  $p<0.01$ ). Sendo este efeito completamente abolido pela desnaturação térmica. A ANOVA de três vias mostrou interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e a presença de tecido ( $F(2,72)=13,75$ ;  $p<0.01$ ). Ocorreu interação entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo ( $F(3,72)=3,57$ ;  $p<0.05$ ). Também ocorreu interação entre a fonte tecidual e o decorrer do tempo ( $F(6,72)=6,75$ ;  $p<0.01$ ). Como visto acima a presença de P2 de fígado de peixe potencializa a aceleração da oxidação do DTT causada pelo  $(\text{PhSe})_2$ , essa interação é acentuada no decorrer do tempo, o que é demonstrado pela interação significativa entre as três variáveis testadas  $(\text{PhSe})_2$ , tecido e tempo ( $F(6,72)=2,48$ ;  $p<0,05$ ) (FIGURA 22 B).

A presença de P3 de fígado de peixe (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou modestamente a oxidação do DTT ( $F(2,72)=32,14$ ;  $p<0.01$ ). A desnaturação térmica aboliu este efeito quase completamente. A presença simultânea de  $(\text{PhSe})_2$  e P3 aumentou a velocidade de oxidação do DTT ( $F(1,72)=20,44$ ;  $p<0.01$ ). Este efeito foi abolido pela desnaturação térmica. A ANOVA de três vias mostrou interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e a presença de tecido ( $F(2,72)=9,08$ ;  $p<0.01$ ). Não ocorreu interação entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo. Ocorreu interação da fonte tecidual e o decorrer do tempo ( $F(6,72)=4,23$ ;  $p<0.01$ ). A ANOVA de três vias demonstrou não haver interação significativa entre as três variáveis testadas  $(\text{PhSe})_2$ , tecido e tempo (FIGURA 23 A).

A presença de P4 de homogêneo de fígado de peixe (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou modestamente a oxidação do DTT ( $F(2,73)=29,31$ ;  $p<0.01$ ). A

desnaturação térmica aboliu este efeito. A presença simultânea de  $(\text{PhSe})_2$  e P4 aumentou significativamente a velocidade de oxidação do DTT ( $F(1,73)=27,67$ ;  $p<0.01$ ). Todavia este efeito do  $(\text{PhSe})_2$  foi completamente abolido pela desnaturação térmica. A ANOVA de três vias mostrou interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e a presença de tecido ( $F(2,73)=5,79$ ;  $p<0.01$ ). Ocorreu interação entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo ( $F(3,73)=3,14$ ;  $p<0.05$ ). Ocorreu interação fonte tecidual e o decorrer do tempo ( $F(6,73)=4,11$ ;  $p<0.01$ ). A ANOVA de duas vias demonstrou não haver interação significativa entre as três variáveis testadas  $(\text{PhSe})_2$ , tecido e tempo (FIGURA 23 B).

A presença de S1 de fígado de peixe (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou a oxidação do DTT ( $F(2,73)=80,94$ ;  $p<0.01$ ), todavia a desnaturação térmica aboliu este efeito. A presença simultânea de  $(\text{PhSe})_2$  e S1 aumentou consideravelmente a velocidade de oxidação do DTT ( $F(1,73)=42,69$ ;  $p<0.01$ ). Este efeito estimulatório do  $(\text{PhSe})_2$  foi abolido pela desnaturação térmica. A ANOVA de três vias mostrou interação significativa entre os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e a presença de tecido ( $F(2,73)=12,68$ ;  $p<0.01$ ). Ocorreu interação significativa entre o efeito do  $(\text{PhSe})_2$  e o decorrer do tempo ( $F(3,73)=4,22$ ;  $p<0.01$ ). Ocorreu interação significativa entre tecido e tempo ( $F(6,73)=9,85$ ;  $p<0.01$ ). Entretanto a análise conjunta não mostrou interação significativa entre as três variáveis testadas  $(\text{PhSe})_2$  tecido e tempo (FIGURA 24 A).

A presença de S2 de fígado de peixe (na ausência de  $(\text{PhSe})_2$ ) acelerou modestamente a oxidação do DTT ( $F(2,72)=39,66$ ;  $p<0.01$ ). A desnaturação térmica aboliu este efeito. A presença simultânea de  $(\text{PhSe})_2$  aumentou a velocidade de oxidação do DTT ( $F(1,72)=34,75$ ;  $p<0.01$ ). sendo este efeito abolido pela desnaturação térmica. A ANOVA de três vias mostrou interação significativa entre os efeitos do



(PhSe)<sub>2</sub> e a presença de tecido (F(2,72)=13,88; p<0.01). Ocorreu interação significativa entre o efeito do (PhSe)<sub>2</sub> e o decorrer do tempo (F(3,72)=3,97; p<0.05). Ocorreu interação significativa entre tecido e tempo (F(6,72)=5,16; p<0.01). Entretanto a análise conjunta não demonstrou interação significativa entre as três variáveis testadas (PhSe)<sub>2</sub>, tecido e tempo (FIGURA 24 B).

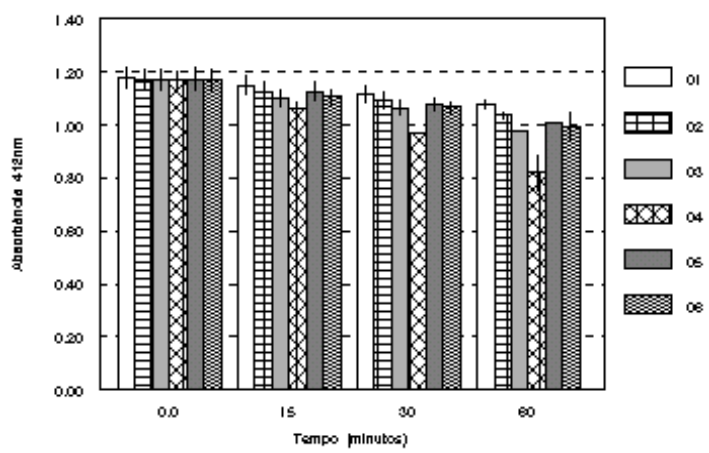
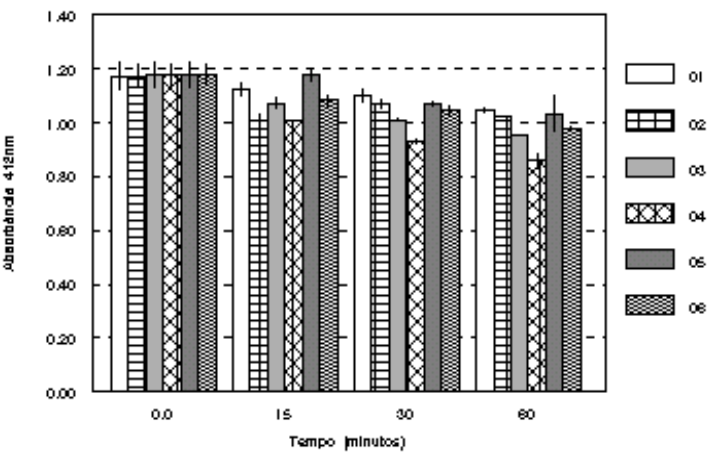
A presença de S3 de fígado de peixe (na ausência de (PhSe)<sub>2</sub>) acelerou modestamente a oxidação do DTT (F(2,72)=103,72; p<0.01). A desnaturação térmica aboliu este efeito. A presença simultânea de (PhSe)<sub>2</sub> e S3 aumentou a velocidade de oxidação do DTT (F(1,72)=73,27; p<0.01). Este efeito do (PhSe)<sub>2</sub> foi completamente abolido pela desnaturação térmica. A ANOVA de três vias mostrou interação significativa entre os efeitos do (PhSe)<sub>2</sub> e a presença de tecido (F(2,72)=47,94; p<0.01). Ocorreu interação significativa entre o efeito do (PhSe)<sub>2</sub> e o decorrer do tempo (F(3,72)=9,07; p<0.01). Ocorreu interação significativa entre tecido e tempo (F(6,72)=14,17; p<0.01). A presença de S3 de fígado de peixe potencializa a aceleração da oxidação do DTT causada pelo (PhSe)<sub>2</sub>, essa interação é acentuada no decorrer do tempo, o que é demonstrado pela interação significativa entre as três variáveis testadas (PhSe)<sub>2</sub>, tecido e tempo (F(6,72)=6,02; p<0.01) (FIGURA 25 A).

A presença de S4 de fígado de peixe (na ausência de (PhSe)<sub>2</sub>) acelerou modestamente a oxidação do DTT (F(2,72)=43,49; p<0.01). A desnaturação térmica aboliu este efeito. A presença simultânea de (PhSe)<sub>2</sub> e S4 aumentou a velocidade de oxidação do DTT (F(1,72)=37,92; p<0.01), sendo este efeito abolido pela desnaturação térmica. A ANOVA de três vias mostrou interação significativa entre os efeitos do (PhSe)<sub>2</sub> e a presença de tecido (F(2,72)=25,55; p<0.01). Ocorreu interação significativa entre o efeito do (PhSe)<sub>2</sub> e o decorrer do tempo (F(3,72)=5,25; p<0.01). Ocorreu

também interação significativa entre tecido e tempo ( $F(6,72)=7,14$ ;  $p<0.01$ ). A presença de S4 de fígado de peixe potencializa a aceleração da oxidação do DTT causada pelo  $(\text{PhSe})_2$ , essa interação é acentuada no decorrer do tempo, o que é demonstrado pela interação significativa entre as três variáveis testadas  $(\text{PhSe})_2$ , tecido e tempo ( $F(6,72)=3,55$ ;  $p<0.01$ ) (FIGURA 25 B).

**A)**

**B)**



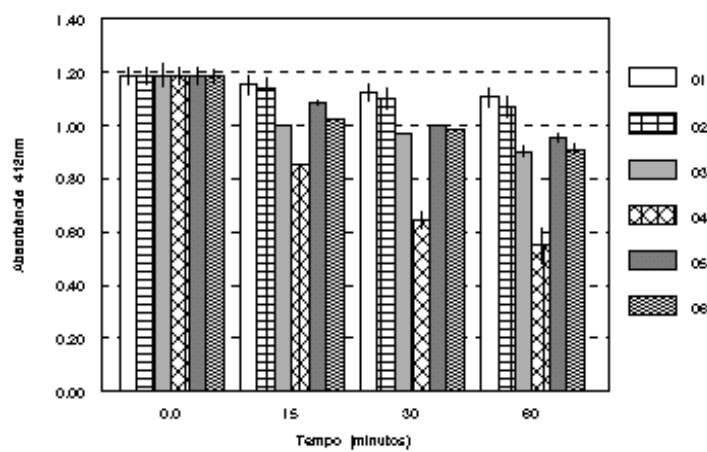
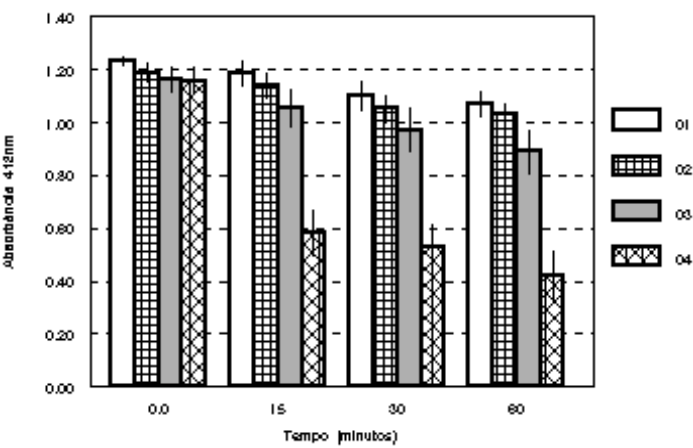
**01:** Controle   **02:** Controle + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08mM   **03:** P   **04:** P + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM  
**05:** P desnaturado termicamente   **06:** P desnaturado termicamente + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM

**FIGURA 22 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença frações sub- celulares de fígado de peixe nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos**

**A) P1 de fígado de peixe**

**B) P2 de fígado de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Pré-incubados a 39 °C por 10 minutos antes da adição do DTT. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os dados estão expressos como média ± EP (n=04).



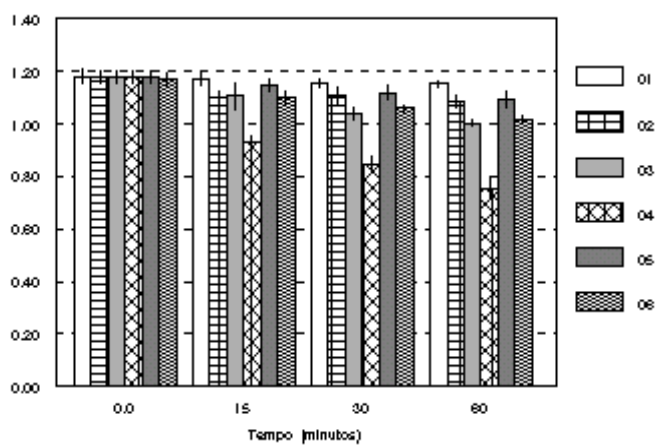
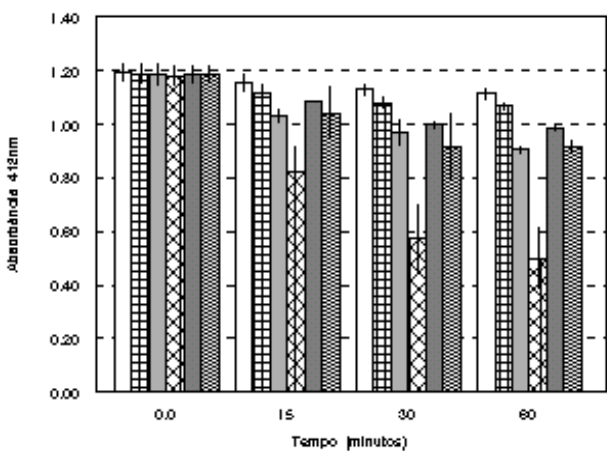
- A)**
- 01:** Controle    **02:** Controle + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08mM    **03:** P    **04:** P + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM
- 05:** P desnaturado termicamente    **06:** P desnaturado termicamente + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM
- B)**

**FIGURA 23 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença frações sub- celulares de fígado de peixe nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos**

**A) P3 de fígado de peixe**

**B) P4 de fígado de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Pré-incubados a 39 °C por 10 minutos antes da adição do DTT. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os dados estão expressos como média ± EP (n=04).



**A)** **01:** Controle **02:** Controle + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08mM **03:** S **04:** S + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM  
**05:** S desnaturado termicamente **06:** S desnaturado termicamente + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM

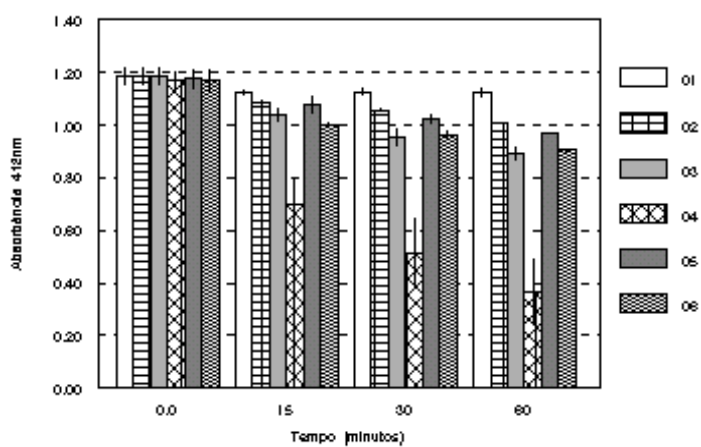
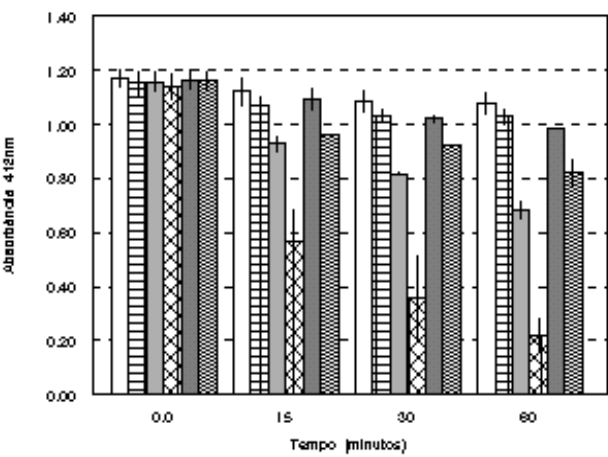
**FIGURA 24 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença frações sub- celulares de fígado de peixe nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos**

**A) S1 de fígado de peixe**

**B) S2 de fígado de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Pré-incubados a 39 °C por 10 minutos antes da adição do DTT. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os dados estão expressos como média ± EP ( n=04).





- A) **01:** Controle **02:** Controle + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08mM **03:** S **04:** S + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM  
**05:** S desnaturado termicamente **06:** S desnaturado termicamente + (PhSe)<sub>2</sub> 0,08 mM

**FIGURA 25 - Efeito de disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> na aceleração da oxidação do DTT na presença frações sub- celulares de fígado de peixe nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos**

**A) S3 de fígado de peixe**

**B) S4 de fígado de peixe**

A reação foi iniciada por adição de DTT (2 mM) a um meio contendo 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Pré-incubados a 39 °C por 10 minutos antes da adição do DTT. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos de incubação para a determinação do conteúdo de -SH livres pelo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM. A taxa de oxidação do DTT foi avaliada através da medida do desaparecimento do seus grupos -SH. A determinação de grupos -SH foi realizada de acordo com o método de ELLMAN (1959). A leitura da densidade ótica foi realizada em 412 nm. Os dados estão expressos como média ± EP (n=04).

#### 4.0 – DISCUSSÃO

A enzima δ-ALA D de S1 de fígado de rato e de fígado de peixe sofre inibição “*in vitro*” por selenetos orgânicos (FIGURA 05). A inibição desta enzima e conseqüentes alterações na rota de síntese de tetrapirróis podem ser responsáveis pelos efeitos tóxicos de selenetos orgânicos e inorgânicos “*in vivo*” em peixes e outros animais. Em peixes os efeitos tóxicos mais relatados referem-se a deficiências reprodutivas, principalmente na redução da sobrevivência larval. Coincidentemente os ovários são o local de maior acumulação de selênio nos tecido de peixe e o

desenvolvimento larval exige intensa atividade da enzima  $\delta$ -ALA D (CUMBIE and VANHORN 1978; SAGER and COFIELD 1984; BROOKS et al., 1984; LEMLY 1985; BAUMANN and GILLESPIE 1986; KAI et al., 1986; ONGLE and KNIGHT 1989).

Os resultados demonstram que a enzima  $\delta$ -ALA D de peixe [FÍGADO  $IC_{50} = 0,27$  mM para  $(PhSe)_2$  e  $IC_{50} = 0,98$  mM para  $(BuSe)_2$  e BRÂNQUIAS  $IC_{50} = 0,69$  mM para  $(BuSe)_2$ ] é menos sensível a inibição por duas formas orgânicas de disselenetos [ $(PhSe)_2$  um aril disseleneto e  $(BuSe)_2$  um alquil disseleneto], quando comparadas a enzima de rato [FÍGADO  $IC_{50} = 0,007$  mM para  $(PhSe)_2$  e  $IC_{50} = 0,021$  mM para  $(BuSe)_2$  (FIGURA 05)]. Todavia peixes podem ser expostos a altas concentrações de selênio por processos de biomagnificação de selênio nas cadeias alimentares de ambientes aquáticos (CUMBIE and VANHORN, 1978; FAUST and ALY, 1981; EISLER, 1985; OHLENDORF, 1989).

Com objetivo de investigar o possível envolvimento de resíduos cisteinil no efeito inibitório de formas orgânicas de selênio sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D, testou-se o efeito protetor do DTT, um ditiol que protege a  $\delta$ -ALA-D de reagentes sulfidrílicos clássicos, mantendo os grupos -SH da enzima no estado reduzido (RODRIGUES et al., 1989). O DTT na condições testada protegeu a enzima da inibição por selenetos orgânicos e selenito de sódio em concentrações inferiores a 1 mM (FIGURAS 06 e 07). Já em concentrações superiores a 1 mM de selênio orgânico o efeito protetor do DTT não foi estatisticamente significativo em proteger a atividade da enzima (FIGURAS 08, 09 e 10). O fato do DTT proteger a inibição da enzima confirma que a oxidação de grupos -SH essenciais para a atividade enzimática faz parte do mecanismo de ação inibitória destes selenetos orgânicos sobre a atividade da  $\delta$ -ALA D.

Nas FIGURAS 08 e 09 fica claro novamente a diferente susceptibilidade da enzima de rato e peixe frente a exposição a (PhSe)<sub>2</sub>, onde a enzima de S1 de fígado de peixe manteve atividade superior a enzima de S1 de fígado de rato. Uma possibilidade para explicar tal fato poderia estar relacionado a ausência em peixes de um sistema, previamente descrito para ratos (BARBOSA et al., 1998), que acelera cataliticamente a oxidação do DTT, na presença de disseleneto de difenila.

O diferente comportamento da enzima  $\delta$ -ALA D destas duas fontes pode ser devido a influência de fatores teciduais que integram o metabolismo dos disselenetos, podendo dar origem a compostos mais reativos em ratos. Em estudos prévios demonstrou-se que formas orgânicas e inorgânicas de selênio aceleram cataliticamente a oxidação de grupos -SH, incluindo a glutatona reduzida (BARBOSA et al. 1998., MACIEL et al., 2000). Desta forma compostos de selênio ou seus produtos de biotransformação são inibidores da  $\delta$ -ALA-D. A existência de um sistema enzimático que forma algum composto mais ativo já foi sugerido em sobrenadantes de fígado de ratos (BARBOSA et al., 1998). A hidroxilação dos organocalcogênios por sistemas microsossomais de fígado de rato poderia ativar estes compostos. Esta explicação é plausível, uma vez que os sistemas de hidroxilação são menos ativos em peixes. (TIMPRELL., 1991). Menor grau de hidroxilação dos compostos de selênio pode significar menor formação de compostos oxidantes nos tecidos de peixe.

Para esclarecer esta possibilidade investigamos se S1 de fígado e brânquias de peixe e fígado de rato poderiam acelerar a oxidação de DTT na presença de selênio orgânico. Os resultados demonstraram claramente que P1 e S1 de fígado de rato aceleram a oxidação do DTT e que este efeito é potencializado na presença dos disselenetos (FIGURA 18 A e 20 A ), Estes resultados estão de acordo com os estudos

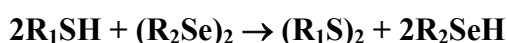
de BARBOSA et al., em 1998. Todavia o S1 de fígado de peixe teve comportamento similar ao observado com S1 de fígado de rato, também sendo capaz de acelerar a oxidação de DTT e este efeito também foi potencializado na presença de  $(\text{PhSe})_2$  (FIGURA 21 A e 23 A ). De modo que o sistema previamente descrito por BARBOSA et al. (1998) em tecidos de rato também ocorre em tecidos de peixe. Entretanto este fenômeno (aumento da oxidação do DTT por fatores teciduais na presença do disseleneto de difenila e disseleneto de dibutila) não pode explicar a menor sensibilidade da  $\delta$ -ALA D de peixe aos organocalcogênios, permanecendo as causas do diferente comportamento ainda a serem esclarecidas.

A avaliação do potencial de aceleração da oxidação de DTT por compostos de selênio demonstrou que o selenito de sódio (selênio inorgânico) acelera a oxidação do DTT em grau superior ao diseleneto de difenila, na presença e ausência de fatores teciduais de peixe (FIGURAS 11 a 16 ).

A purificação parcial da enzima  $\delta$ -ALA D de fígado de peixe (P55) demonstra efeito mais dose dependente da concentração de diseleneto de difenila (FIGURA 12) e de selenito de sódio (FIGURA 16) na aceleração da oxidação do DTT, do que os mesmos experimentos com S1 de fígado de peixe .

Embora o comportamento dos tecidos de peixes e ratos (S1) tenham sido similares no que diz respeito a acelerarem a oxidação do DTT, na presença de  $(\text{PhSe})_2$ , o sub fracionamento do S1 por centrifugação diferencial revelou diferenças entre as espécies. Com efeito, as frações S1, P1, S2 e P2 de ratos foram extremamente ativas em acelerar a oxidação do DTT na presença de  $(\text{PhSe})_2$  , sendo todavia pouco efetivas as frações S3, P3, S4 e P4. Por outro lado, todas as frações obtidas a partir do S1 de fígado de peixes foram bastante ativas em promover a oxidação do DTT na presença de

(PhSe)<sub>2</sub>. Os dados de rato sugerem que o sistema enzimático ou atividade(s) enzimática(s) que aceleram a oxidação do DTT na presença de (PhSe)<sub>2</sub> localizam-se em frações relativamente mais pesadas, incluindo a fração mitocôndrial clássica P2. Estes resultados sugerem que a hidroxilação do (PhSe)<sub>2</sub> não deve estar contribuindo para seu efeito inibitório, uma vez que a fração microsomal P4 não acelerou a oxidação do DTT na presença de (PhSe)<sub>2</sub>. Em peixes a distribuição desta(s) atividade(s) enzimática(s) foi mais ampla. Baseado neste achados, sugerimos que nos tecidos de ratos e peixes existem sistemas enzimáticos capazes de catalisar a reação abaixo:



Onde R1 poderia representar uma variedade de compostos, incluindo enzimas e R2 um grupo alquil ou aril.

A desnaturação térmica das frações obtidas por centrifugação diferencial a partir de homogeneizados de fígado de rato e peixe, levou a incapacidade de tais frações em acelerar cataliticamente a oxidação do DTT promovidas pelo (PhSe)<sub>2</sub>, sugerindo que este efeito ocorre por ação ou participação de enzima(s) (FIGURAS 18 a 25).

A enzima de S1 de brânquias de peixe demonstrou ser sensível a inibição por (SePh)<sub>2</sub>. A presença de DTT no meio de incubação teve efeito significativo em proteger a enzima da inibição por (PhSe)<sub>2</sub> (FIGURA 08 A e 10 A). Todavia na proporção de DTT/(PhSe)<sub>2</sub> igual a 40/1, o DTT ao invés proteger a atividade enzimática da &-ALA D de brânquias potencializou o efeito inibitório do (PhSe)<sub>2</sub>. Tal fato ocorreu nas concentrações de DTT 40 mM e (PhSe)<sub>2</sub> 1 mM (FIGURA 08 A) e nas concentrações de DTT 4 mM e (PhSe)<sub>2</sub> 0,1 mM (FIGURA 10 A). Este achado sugere que os efeitos toxicológicos do selênio podem não depender exclusivamente de sua concentração, mas

também da sua relação proporcional com substâncias redutoras presentes no meio, uma vez que o efeito de potencialização inibitória foi observado na mesma relação proporcional em uma amplitude de concentração de 40 vezes.

O presente estudo comprova que a enzima  $\delta$ -ALA D de peixes é inibida “*in vitro*” por disseleneto de difenila e disseleneto de dibutila (selênio orgânico). O grau de inibição difere entre os compostos testados. Todos os compostos de selênio testados são capazes de acelerar a oxidação do DTT na presença de fatores teciduais de peixes, entretanto não foi possível relacionar este efeito oxidativo com a capacidade destes compostos de selênio em inibir a atividade da  $\delta$ -ALA D.

A inibição “*in vivo*” da  $\delta$ -ALA D pode ser alvo dos efeitos toxicológicos dos compostos de selênio em ambientes aquáticos contaminados por este elemento. A biossíntese de compostos tetrapirrólicos é muito ativa na fase reprodutiva e de desenvolvimento embrionário e larval. A inibição da enzima  $\delta$ -ALA D na rota de biossíntese de compostos tetrapirrólicos pode ser parte do mecanismo de ação dos compostos de selênio que leva a falhas reprodutivas em peixes.

## 5.0 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- A enzima  $\delta$ -ALA D de peixes e mamíferos é susceptível a inibição “*in vitro*” por compostos orgânicos e inorgânicos de selênio.
- A enzima  $\delta$ -ALA D de peixes é mais resistente a inibição por selênio em relação a de mamíferos.
- Cada composto de selênio testado apresenta efeito inibitório único na atividade  $\delta$ -ALA D, sendo variável em função de variações enzimáticas e ação de fatores teciduais.
- A oxidação de grupamentos –SH está envolvida na inibição da  $\delta$ -ALA D por compostos de selênio, pois a inibição foi parcialmente revertida por DTT.
- O selênio (orgânico e inorgânico) acelera a oxidação de DTT, o que é potencializado na presença de fatores de tecido.



- O selenito de sódio (selênio inorgânico) acelera a oxidação do DTT em concentrações menores que o disseleneto de difenila, na presença e ausência de fatores teciduais.
- As frações obtidas por centrifugação diferencial de tecidos de peixe apresentam maior potencial de aceleração da oxidação de DTT em relação as de rato.
- A desnaturação das frações obtidas por centrifugação diferencial por ação térmica reduz drasticamente a capacidade destes em acelerar a oxidação do DTT, na presença e ausência de selênio, demonstrando que o efeito ocorre por participação de fatores enzimáticos ou termolábeis
- Os efeitos inibitórios de compostos de selênio podem não ser exclusivamente dependentes de sua concentração mas também de sua relação proporcional com outras substâncias redutoras presentes no meio.
- A inibição da  $\delta$ -ALA D de mamíferos e peixes “*in vivo*” pode ser alvo de potencial dos efeitos toxicológicos induzidos por compostos de selênio.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abel, L. (1994) Delta-aminulevulinato desidratase em cultura de tecidos de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae): Características bioquímicas e efeito de metais tóxicos. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, UFRGS. Dissertação de Mestrado.
- Amazarray, M. T. R. (1986). Efeitos de metais pesados em plantas: delta-aminulevulinato desidratase em *Ricinus communis*. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Ecologia, UFRGS. Dissertação de Mestrado.

- Anderson, P. M.; Desnick, R.J. (1979). Purification and properties of  $\delta$ -aminolevulininate dehydratase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 254, 6929-6930.
- Barbosa, N. B. V.; Rocha, J. B. T.; Zeni, G.; Emanuelli, T.; Beque, M. C.; Braga, A. L. (1998). Effects of inorganic forms of selenium on  $\delta$ -aminolevulininate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149: 243-253.
- Barnard, G. F; Itoh, R.; Hohberger, L. H. & Shemin, D. (1977). Mechanism of porphobilinogen syntase – Possible role of essential thiol groups. *J. Biol. Chem.* 252, 8965-8974.
- Barreiro, O. C. (1967). 5-Aminolevulininate hydro-lyase from yeast. Isolation and purification. *Biochim.Biophys.Acta.* 139,479-486.
- Battle, A. M. del C.; Ferramola, A. M.; Grinsten, M. (1967). Purification and general properties of delta-aminolevulininate dehydratase from cow liver. *Biochem. J.* 104, 244-249.
- Baumann, P. C.; Gillespie, R. B. (1986). Selenium bioaccumulation in gonad of large-mouth bass and bluegill from three power plant cooling reservoirs. *Environ Toxicol Chem* 5: 695-702.
- Beber, F. A.; Wolsmeister, J.; Brigo, M. J. K.; Silva, M. C. J.; Pereira, C. N. and Rocha, J. B. T. (1998). Ascorbic acid inhibition of hepatic delta-aminolevulininate dehydratase is mediated by an oxyding system present in liver supernatants. *Int.J. Vitam.Nutr. Res.*(In press).
- Bechara, E. J. H.; Medeiros, M. H. G.; Monteiro, H. P.; Hermes-Lima, M.; Pereira, B.; Demasi, M.; Costa, C. A. ; Adballa, D. S. P.; Onuki, J.; Wendel, C. M. A. ; Masci, P. D. (1993). A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Química Nova.* 16: 385-392

- Behagel, O.; Seibert, H. (1932). Chem. Ber., 65, 815.
- Behne, D.; Kyriankopoulos, A. (1990). Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun 173:1143-1149.
- Bellinaso, M. L. (1985). Estudo comparativo da delta- aminolevulinato desidratase em eritrócito humano e de peixe (*Pimelodus maculatus*) e o efeito de metais pesados. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, UFRGS. Dissertação de Mestrado
- Bennet, W. N.; Brooks, A. S.; Boraas, M. E. (1986). Selenium uptake and transfer in an aquatic food chain and its effects on fathead minnow larvae. Arch Environ Contam Toxicol 15: 513-517.
- Bergdahl, I. A.; Grubb, A. A.; Schutz, R. J.; Desnick, J. G.; Wetmur, S.; Sassa & S. Skeefving. (1995). Lead binding to  $\delta$ -aminulevulinic acid dehydratase (ALA D) in human erythrocytes. Pharmacology & Toxicology. 81, 153-158.
- Bevan, D. R.; Bodlaender, P.; Shemin, D. (1980). Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of  $Zn^{2+}$  for enzyme activity. J. Biol. Chem. 255(5):2030-2035.
- Boese, Q. F.; Spano, A. J.; Timko, M. P. (1991).  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase in *pea* (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. J. Biol. Chem. 266: 17060-17066.
- Bonsignore, D. L. (1966). 'attivita ALA-deidratasica eritrocitaria quale test diagnostico nel saturnismo professionale. Med. Lav. 57:647-654.
- Borralho, L. M. (1990). Ácido delta-aminolevulinico desidratase de *Saccharomyces cerevisiae*: tópicos sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e regulatórias. Rio de Janeiro, Curso de Pós Graduação em Bioquímica, UFRJ, Tese de Doutorado.

- Borrvalho, L. M.; Malamud, D. R.; Panek, A. D.; Tenan, M. N. Oliveira, D. E., & Mattoon, J. R. (1989). Parallel changes in catabolite repression of hem biosynthesis and cytochromes in repression-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. Microbiol.* 135,1217-1227.
- Bottino, N. R.; Banks C. H.; Irgolic, K. J.; Micks, P.; Wheeler, A. E.; Zingaro, R. A. (1984). Selenium-containing amino acids and proteins in marine algae. *Phytochemistry* 23:2445-2452.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braga, A. L.; Silveira, C. C.; Zeni, G.; Severo, W. A. and Stefani, H. A. (1996). Synthesis of selenocetals from enol ether. *J. Chem. Research (S)* 206-207.
- Brennan, M. J. W. & Cantrill, R. C. Delta aminulivulinic acid is a potent agonist for GABA autoreceptors. *Nature.* 280: 514-515 (1979).
- Brennan, M. J. W. & Cantrill, R. C.; Kramer, S. (1980). Effect of delta aminulivulinic acid on GABA receptor binding in synaptic plasma membranes. *Int. J. Biochem.* 12; 833-835.
- Brooks, A. S.; Bertram, P. E.; Szmania, D. C.; Seale, D. B.; Boraas, M. E. (1984). The effect of selenium on the reproductive potential of the fathead minnow. EPRI Research Project 1631-1, Final Report, Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- Bryson, W. T.; MacPherson, K. A.; Mallin, M. A.; Partin, W. E.; Woock, S. E. (1984). Roxboro Steam Electric Plant Hyco Reservoir 1984 Bioassay Report. Carolina Power and Light Company, Nc.
- Buchan, R. F. (1947). Industrial selenosis. *Occupational Medicine.* 3: 439.
- Butler, G. W.; Peterson, P.J. (1967) Uptake and metabolism of inorganic forms of selenium-75 by *Spirodela oligorrhiza*. *Aust J Biol Sci* 20:77-86.

- Caldwell, K. A.; Tappel, A. L. (1965). Acceleration of sulfhydryl oxidations by selenocysteine. *Arch.Biochem.Biophys.* 112: 196-200.
- Callahan, M. A.; Slimak, M. W.; Gabel, N. W.; May, I. P.; Fowler, C. F.; Freed, J. R.; Jennings, P.; Durfee R. L.; hitmore, F. C.; Maestri, B.; Mabey, W. R.; Holt, B. R.; Gould, R. (1979) Water-related environmental fate of 129 priority pollutants. Vol. 1. EPA-440/4-79-029 a. US EPA, Washington, D.C.
- Calvert, C. C.; Nesheim, M. C.; Scott, M. L. (1962). Effectiveness of selenium in prevention of nutritional muscular dystrophy in the chick. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109: 16-18.
- Castelfranco, P. A . & Bergs, L.; Salamanca, R. E.; Batlle, A . M . (1983). Aminolevulinate dehydratase: Propietes y mechanism de acción. *N. Arch. Fac. Med.* 109, 16-70.
- Cerwenka, E. A.; Cooper, W. C. (1961). Toxicology of selenium and tellurium compounds. *Arch. Environ. Health.* 3: 189-199.
- Chapman, P. M. (1999). Human and risk assessment: Vol. 5, N° .6, pp. 1123-1138.
- Chauhan, S. & O'Brian, M.R. (1995). Amutant Bradyrhizobium japonicum delta-aminulinic acid dehydratase with an metal requirement function in situ for tetrapyrrole synthesis in soybean root nodules. *J. Biol. Chem.* 270 (34), 19823-19827.
- Cheh, A. & Neilands, J. B. (1973). Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinate dehydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 1060-1063.

- Chen, G.; Ziegler, D. M. (1994). Liver microsomes and flavin-containing monooxygenase catalyzed oxidation of organic selenium compounds. *Arch. Biochem. Biophys* 312: 566-572.
- Cooke, T. D.; Bruland, K. W. (1987). Aquatic chemistry of selenium: Evidence of biomethylation. *Environ Sci Technol* 21:1214-1219.
- Cowie, D. B.; Choen, G. N. (1957). Biosynthesis by *Escherichia coli* of altered proteins containing selenium instead of sulfur. *Biochim. Biophys. Acta.* 26: 252-261.
- Cumbie, P.M.; Van Horn, S.L. (1978). Selenium accumulation associated with fish mortality and reproductive failure. *Proc Ann Conf S E Assoc Fish Wildl Agencies* 32: 612-624.
- Cutter, G.A. (1989) Freshwater systems. In: Ilnat, M.(ed) Occurrence and distribution of selenium. CRC Press, Boca raton, FL, pp 243-262.
- Das, P. M.; Sadana, J. R.; Gupta, R. K. and Gupta, R. P. (1989). Experimental selenium toxicity in guinea pigs: Haematological studies. *Ann. Nutr. Metab.* 33,347-353.
- Dent, A, J.; BeYersamann, D.; BlocK, C.; Haasnain, S. S. (1990). Two different zinc sites in bivariate 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. *Biochemistry* 29: 7822-7828.
- Diskin, C. J.; Tomasso, C. L.; Alper, J. C.; Glaser, M. L.; Fiegel, S. E. (1979). Long-term selenium exposure. *Arch. Intern. Med.* 139: 824-826.
- Dixon, M. & Webb, E.C. (1964). *Enzymes*, 2nd ed., Longmans, London and Colchester, 950 pp.

- Dodd, D. C.; Blakely, A.A; Thornbury, R. S. & Dewes, H. F. (1960). Muscle degeneration and yellow fat disease in foals. *N.Z. Vet. J.* 8,45-50.
- Doran, J.W. (1982). Microorganisms and biological cycling of selenium. *Adv Microbiol Ecol* 6:1-32.
- Doss, M.; Blakely, A. A.; Thornbury, R. S. & Dewes, H. F. (1960). Muscle degeneration and yellow fat disease in foals. *N. Z. Vet. J.* 8, 45-50.
- Dresel, E. I. B. & Falk, J. E. (1953). Conversion of delta-aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. *Nature* 172:1185.
- Echelard, Y.; Dymetryzyn, J.; Drolet, M.; Sasarman, A. (1988). Nucleotide sequence of the hemB gene of *Echerichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 214:503-508.
- Eggert, R. G.; Patterson, E.; Akers, W. T.; Stokstad, E. L. R. (1957). The role of vitamin E and selenium in the nutrition of the pig. *J. Anim. Sci.* 16: 1037.
- Eisler, R. (1985). Selenium hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Contaminant hazard reviews rept 5, U.S. Fish and Wildlife Service.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Emanuelli, T.; Rocha, J. B. T.; Pereira, M. E.; Porciuncula, L. O.; Morch, V. M.; Martins, A.F.; Souza, D. O. G. (1996). Effects of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminulevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol. Toxicol.* 79: 136-143.

- Farina, M. (2000). Selênio: funções biológicas e efeitos tóxicos. Ciência e natura. Universidade Federal de Santa Maria.
- Faust, S. D.; Aly, O. M. (1981) Chemistry of natural waters. Butterworths, Boston, M.A.
- Finley, K. A. (1985). Observtions of bluegills fed selenium-contaminated *Hexagenia nymphs* Collected from Belews Lake, North Carolina. Bull Environ Contam Toxicol 35: 816-815.
- Flohe, L.; Gunzler, W. A .; Schock, H. H. (1973). Glutathione peroxidase: A selenium enzyme. FEBS Lett 32: 132-134.
- Fong, W.; Mann, K. H. (1980). Role of gut flora in the transfer of amino acids through a marine food chain. Can J Fish Aquat Sci 37: 88-96.
- Franke, K. W. (1934). A new toxicant occuring naturally in certain samples of plant foodstuffs. I. Results obtained in preliminary feeding trials. J. Nutr.8: 597-608.
- Fugita, H.; Orii, Y.; Sand, S. (1981). Evidence of incresed syntesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats. Biochim. Biophys. Acta. 678: 39-50.
- Ganther, H. E. (1968). Selenotrisulfides. Formation by reaction of thiols with selenious acid. Biochemistry. 7: 2898-2905.
- Ganther, H. E. (1971). Selenotrisulfides. Formation by reaction of thiols with selenious acid. Biochemistry. 10: 4089-4098.



- Garret, G. P.; Inman, C. R. (1984). selenium-induced changes in fish populations of a Heated reservoir. Proc Ann Conf S E Assoc Fish Wildl Agencies 38: 291-302.
- Gibbs, P. N. B. & Jordan, P. M. (1986). Identification of lysine at the active site of human delta-aminolaevulinate dehydratase. Biochem. J. 236: 447-451.
- Gibbs, P. N. B.; Gore, M. G.; Jordan, P. M. (1985). Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinate dehydratase. Biochem. J. 225:573-580.
- Gibson, K. D.; Neuberger, A. ; Scott, J. J. (1955). The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 61,618-629.
- Goeger, D.E.; Ganther, H.E. (1994). Oxidation of dimethyl selenide to dimethyl selenoxido by microsomes from rat liver and flaving-containing monooxygenase from big liver. Arch. Biochem. Biophys. 310: 448-451.
- Goering, P. L. & Fowler, B. A. (1985). Mechanism of renal lead-binding protein reversal of delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition by lead. J.Pharmacol. Exp. Therap. 234:365-371.
- Goering, P. L. & Fowler, B. A. (1984). Regulation of lead inhibition of delta-aminolevulinic dehydratase by a low molecular weight, high affinity renal lead-binding protein. J.Pharmacol. Exp. Therap. 231:66-71.
- Goering, P. L. (1993). Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. Neurotoxicology. 14:45-60.
- Goering, P. L.; Mistry, P.; Fowler, B. A. (1986). A low molecular weight lead-binding protein in brain attenuates lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydrase:

- comparison with a renal lead-binding protein. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 237:220-225.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958). Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. *The Journal of Biological Chemistry.* 232: 1119-1140.
- Guo, G.; Gu, M. and Etlinger, J. D. (1994). 24kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to delta-aminolevulinic acid dehydratase. *The Journal of Biological Chemistry.* 269 (17),12399-12402.
- Günzler, W. A.; Steffens, G. J.; Grossmann, A.; Kim, S. M.; Otting, F.; Wendel, A., Flohe, L. (1984). The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. *Hoppe seyler's Z Physiol Chem.* 365(2): 195-212.
- Hamilton, S. J.; Palmisano, A. N.; Wedermeyer, G. A. Yasutake, W. T. (1986). Impacts of selenium on early life stages and smoltification of fall chinook salmon. *Trans 51 st N Am Wildl Nat Res Conf:* 343-356.
- Hamilton, S. J.; (1999). Hypothesis of historical effects from selenium on endangered fish in the Colorado River basin. *Human and risk assessment: Vol. 5, N°6,* pp. 1153-1180.
- Hartley, W. J. & Grant, A. B. (1961). A review of selenium-responsive diseases of New Zealand livestock. *Fed. Proc.* 20: 679-688.
- Helzinsouer, J. F.; Scott, L. (1985). Selenium prevents mercuric chloride induced osmoregulatory failure without glutathione peroxidase involvement in the black bullhead (*Ictalurus melas*). *Comp Biochem Physiol* 80C: 295-297.
- Herneberg, S.; Nikkanen, J.; Mellin G.; Lilius, H. (1970). Delta-aminolevulinic acid dehydratase as a measure of lead exposure. *Arch. Environ. Health* 21: 140-145.

- Hicks, B. D. Hilton, J. W, Ferguson H. W. (1984). Influence of dietary selenium on the occurrence of nefrocalcinosis in the rainbow trout, *Salmo Gairdneri* Richardson. *J Fish Dis* 7: 379-389.
- Hilton, J. W.; Hodson, P. V.; Singer, S.J. (1980). The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Nutr* 110: 2572-2585.
- Hilton, J.W.; Hodson, P. V. (1983). Effects of increased dietary carbohydrate on selenium metabolism and toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Nutr* 113: 1241-1248.
- Hodson, P. V.; Blunt, B. R.; Spry, D. J.; Austen, K. (1977). Evaluation of erythrocyte delta-amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. *J. Fish.Res. Board can.* 33:501-508.
- Holnes, L. L.; Tarachuck, I. G.; Nethercott, J. R. (1989). Health status of cooper refinery workers with specific reference to selenium exposure. *Arch. Environ. Health.* 44:291-297.
- Hsieh, H. S.; Ganther, H. E. (1976). Effects of stock or purified diet on rat liver enzymes involved in the synthesis of dimethyl selenide. *J.Nutr.* 106(11): 1577-1582.
- Huber, R. E.; Criddle, R. S (1967). Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs. *Arch Biochem Biophys* 122: 164-173.
- Hudman, J. F.; Glenn, A. R. (1984) selenite uptake and incorporation by *Selenomonas ruminantium*. *Arc Microbiol* 140: 252-256.
- Hudman, J. F.; Glenn, A. R. (1985). Selenite uptake by *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Bacteroides rumicola*. *FEMS Microbiol Lett* 27: 215-220.
- Inhat, M. (1989). Occurrence and distribution of selenium. CRC Press, Boca raton, FL.

- Jaffe, E. K. & Hanes, D. (1986). Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalysed reaction - Requirement for Schiff's base formation. *J. Biol. Chem.* 261: 9348-9353.
- Jaffe, E. K. & Markham, G. D. (1987). Carbon-13 NMR studies of porphobilinogen synthase: observation of intermediates bound to a 280,000-daltons protein. *Biochem.* 26: 4258-4264.
- Jaffe, E. K. (1993). Predicting the Zn(II) ligands in metalloproteins: case study, porphobilinogen synthase. *Comm. Inorg. Chem.* 15: 67-93.
- Jaffe, E. K.; Abrams, W. R.; Kaempfen, H. X.; Harris, Jr. K. A. (1992). 5-Chlorolevulinate modification of porphobilinogen synthase identifies a potential role for catalytic zinc. *Biochem.* 31: 2113-2123.
- Jaffe, E. K.; Ali, S.; Mitchell, L. W.; Taylor, K. M.; Volin, M.; Markham, G. D. (1995). Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. *Biochem.* 34: 244-251
- Jaffe, E. K.; Markham, G. D.; Rajagopalan, J. S. (1990). <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>NMR studies of ligands bound to the 280 000-dalton protein porphobilinogen synthase elucidate the structures of enzyme-bound product and a schiff base intermediate. *Biochem.* 29:8345-8350.
- Jaffe, E. K.; Volin, M.; Myers, C. B. (1994). 5-Chloro[1,4-<sup>13</sup>C]levulinic acid modification of mammalian and bacterial porphobilinogen synthase suggest an active site containing two Zn(II). *Biochem.* 33:11554-11562.
- Jaffe, E.K. (2000). The porphobilinogen Synthase family of metalloenzymes. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* 115-128.
- Jordan, P. M.; & Seehra, J. S. (1980). Carbon-13 NMR as a probe for the study of enzyme-catalysed reactions. Mechanism of action of 5-aminolevulinic acid dehydratase. *FEBS lett.* 114:283-286.

- Kai, N.; Ueda, T.; Takeda, M.; Kataoka, A. (1986). The levels of mercury and selenium in gonad of marlins from the Pacific Ocean. *Bull Jap soc Sci Fish* 52: 553-556.
- Kappas, S.; Sassa, S.; Galbraith, R.A.; Nordmann, Y. (1995). The Phorphyrias. In: *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, eds. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (McGraw Hill, New York), pp. 2103-2160.
- Kappas, S.; Sassa, S.; Galbraith, R. A.; Nordmann, Y. (1995). The Phorphyrias. In *The Metabolic Bases of inherited Disease*, eds. Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (McGraw Hill, New York). pp. 22103-22160.
- Klayman, D.L.; Klayman, D.L.; Ganther, W. H. (1973) (Eds.). *Organic Selenium compounds: Their Chemistry and Biology*, John Wiley and sons, New York, 68-157pp.
- Khan, M. Z.; Szareck, J.; Krasnodesbska-Depta, A. and Koncicki, A. (1993). Effects of concurrent administration of lead and selenium on some haematological and biochemical parameters of boiler chickens. *Acta. Vrt. Hung.* 41, 123-137.
- Kubota, J. (1980) Regional distribution of trace element problems in North America. In: Davies BE(ed) *Applied soil trace elements*. John Wiley and Sons, New York, pp 441-556.
- Lemly A. D (1985) Toxicology of selenium in a freshwater reservoir: Implications for environmental hazard evaluation and safety. *Ecotox Environ Saf* 10: 314-338.
- Lemly A. D. (1999). Selenium impacts on fish: an insidious time bomb. *Human and risk assessment: Vol. 5, N°.6*, pp. 1139-1151
- Linder, M. C. (1990). Nutrition and metabolism of the trace elements. 7: 216-277.

- Maier, K. J. and Knight, A. W. (1994). Ecotoxicology of Selenium in Freshwater Systems.
- Maines, M. D. and Kappas, A. (1976). Selenium regulation of hepatic heme metabolism. Induction of delta-aminolevulinic synthase and heme oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 4428-4431.
- Masscheleyn, P. H. and Patrick Jr., W. H. (1993). Biochemical processes affecting selenium cycling in wetlands. Environmental Toxicology, Chem. 12,2235-2243.
- Martins, V. (1986).  $\delta$ -aminolevulinato desidratase da glândula digestiva de *Ampularia canulata*; características bioquímicas e efeito de metais pesados. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, UFRGS. Dissertação de Mestrado.
- Meredith, P. A.; Moore, M. R.; Goldberg, A. (1979). Erythrocyte ALA dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. Clin Sci. Mol. Med. 56:61-69.
- Mitchell, L. W. & Jaffe, E. K. (1993). Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* is a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II). Arch. Biochem. Biophys. 300:169-177.
- Mullermann, F. (1999). A história do selênio. Feeding Times 3: 4-19.
- Nandi, D. L.; Baker-Cohen, K. F. & Shemin, D. (1968).  $\delta$ -aminolevulinato acid dehydratase of *Rhodopseudomonas spheroides*: I. Isolation and properties. J. Biol. Chem. 243,1224-1230.
- National Academy of Sciences (NAS) (1976): Medical and biological effects of environmental pollutants. Div Med Sci Natl Acad Sci, Washington, Dc.
- Ng, T. B.; Idler, D. R. (1983) Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In: Hoar, W.S. Randall, D.J.; Donaldson, E.(eds), Fish Physiology, Volume IXA. Academic Press, New York, pp 373-404.

- Ohlendorf, H. M. (1989) Bioaccumulation and effects of selenium from irrigation drain water. *Sci Total Environment*. Soil Sci Soc Amerca Spec Pupl no 23, pp 133-177.
- Oldifeld, J. E. (1987). The two faces of selenium (Historical commentary). *J. Nutr.* 117, 2002-2008.
- Ongle, R. S. Maier, K. J.; Kiffney, P.; Williams, M. J.; Brasher, A.; Melton, L. A.; Knight, A.W. (1988). Bioaccumulation of selenium in aquatic ecosystems. *Lake Res Mgt* \$(2): 165-173.
- Nelson, H. M.; Ughes, M. A.; Meredith, P. A. (1981). Zinc, copper and delta-aminolevulinic acid dehydratase in vitro and in vivo. *Toxicology* 21:261-266.
- Padmaja, K. and Prasad, A. R. (1993). Selenium altered regulation of heme biosynthesis in chick embryos. *Drug.chem. Toxicol.* 16, 395-408.
- Padmaja, K.; Ramamuthi, R.; Prasad, A. R. (1996). Inhibitory effect of selenium on enzyme involved in heme biosynthetic pathway in chick embryos. *J. Enzyme Inhib.* 11, 1-11.
- Painter, E. P. (1941). The chemistry and toxicity of selenium compounds which special reference to the selenium problem. *Chem.rev* 28: 179-213.
- Pillay, K. K. S.; Thomas Jr. C. C. Kaminski, J. W. (1969) Neutron Activation analysis of the selenium content of fossil foels. *Nucl Applic Technol* 7:478-483.
- Poston H. A.; Combs, G. F.; Leibovitz, L. (1976). Vitamin E and selenium inter-relations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological, and biochemical deficiency signs. *J Nutr* 106: 892-904.
- Ransone, J. W. (1961). Selenium sulfide intoxication. *New. Engl. J. Med.* 264, 384-385.

- Robberecht H, Van Grieken R. (1982) Selenium in Environmental waters: Determination, speciation and concentration levels. *Talanta* 29:823-844.
- Rocha, J. B. T.; Freitas, A. J.; Marques, M. B.; Pereira, M. E.; Emanuelli, T.; Souza, D. O. (1993). Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26:1077-1083.
- Rocha, J. B. T.; Pereira, M. E.; Emanuelli, T.; Christofari, R. S.; Souza, D. O. (1995). Effects of the treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, Kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 100:27-37.
- Rodrigues, A. L.; Bellinaso, M. L.; Dick, T. (1989). Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 94B:65-69.
- Rotruck, J. T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Swanson, A. B.; Hafeman, D. G.; Hoestra, W. G. (1973). Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 179,558-560.
- Sager, D. R.; Cofield, C. R. (1984) Differential accumulation of selenium among axial muscle, reproductive and liver tissues of four warmwater fish species. *Water Res Bull* 20: 359-363.
- Sassa, S.; Fugita, H.; Kappas, A. (1989). Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda; V. Paces and V. Kostka (Eds), *Highlights of Modern Biochemistry*, VSP, Utrecht, Vol. 1, pp. 329-338.
- Schamberger, R. J. (1983) *Biochemistry of selenium*. Plenum Press, New York and London.
- Schwarz, K., and C. M. Foltz. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Amer. Chem. Soc.* 79: 3292.



- Seydoux, F.; Malhotra, P. O. & Bernhard, S. A. (1974). Half-site reactivity. *Crit. Ver. Biochem.* 2, 227-257.
- Shemin, D. (1976). 5-Aminolevulinic acid dehydratase structure, function, and mechanism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 273B, 109-115.
- Shibata, H. & Ochiai, H. (1977). Purification and properties of delta-aminolevulinic dehydratase from radish cotyledons. *Plant & Cell Physiol.* 18, 421-429.
- Smith, M. I.; Franke, K. W.; Westfall, B. B. (1936). The selenium problem in relation to the public health. *Public. Health. Rep.* 51:1496.
- Spencer, P. & Jordan, P. M. (1993). Purification and characterization of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and study of the reactive thiols at the metal-binding domain. *Biochem. J.* 290: 279-287.
- Spencer, P. & Jordan, P.M. (1995). Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* *Biochem. J.* 305:151-158.
- Spencer, P. & Jordan, P.M. (1994). Investigation of the nature of two metal-binding sites in 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 300: 373-381.
- Stadtman, T. C. (1980). Selenium-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem.* 49: 93-110.
- Sunde, R.A.; Everson, J. K. (1987). Serine incorporation into the selenocysteine moiety of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 262(9): 933-937.
- Takayanagi, K.; Won, G.T.F. (1985) Dissolved inorganic and organic selenium in the Orca Basin. *Geochim Cosmochim acta* 49:539-546.
- Tigier, H. A.; Batlle, A. M. del C.; Locascio, G. A. (1968). Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system. Isolation, purification and general

properties of delta-aminolaevulinate dehydratase. *Biochem. Biophys. Acta* 151:300-302.

Tigier, H. A.; Batlle, A. M. del C.; Locascio, G. A. (1970). Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties of delta-aminolevulinate dehydratase. *Enzimologia* 38; 43-56.

Timbrell, J. A. (1991). *Principles of Biochemical Toxicology*, 2 ed, Biochemical Toxicology School of Pharmacy University of London.

Thompson, J. N. & Scott, M. L. (1969). Role of selenium in the nutrition of the chick. *J. Nutr.* 104: 1292-1296.

Thompson, J. N. & Scott, M. L. (1970). Impaired lipid and vitamin E absorption related to atrophy of the pancreas in selenium-deficient chicks. *J. Nutr.* 100, 797-809.

Tsen, C. C.; Tappel, A. L. (1958). Catalytic oxidation of glutathione and other sulphhydryl compounds biselenite. *J. Biol. Chem* 233: 1230-1232.

Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T.; Sano, S. (1979). The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta* 570:167-178.

Ursini, F.; Bindoli, A. (1987). The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chemistry and Physics of Lipids.* 44:255-276.

Ursini, F.; Maorino, M.; Valente, M.; Ferri, K.; Gregolin, C. (1982). Purification of pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* 710: 197-211.

Walter, E. D. & Jensen, L. S. (1964). Serum glutamic-oxalacetic acid transaminase levels, muscular dystrophy and certain hematological

measurements in chicks and poult as influenced by vitamin E, selenium and methionine. *Poult. Sci.* 43, 919-926.

Whanger, P. D.; Weswig, P.H.; Oldfield J.E. (1978). Selenium, sulfur, and nitrogen levels in ovine rumen microorganisms. *J Animal Sci* 46: 515-519.

Wilber, C.G. (1980). Toxicology of selenium: A review. *Clinical. Toxicology.* 17 (2): 171-230.

Wilson, E.L.; Burger, P.E.; Dowdle, E.B. (1972). Beef-liver 5-aminolevulinic acid dehydrase – Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 29:563-571.

Woock, S.E.; Garrett, W,R,; Partin, W.E.; Bryson, W.T. (1987) Decreased survival and teratogenesis during laboratory selenium exposures to bluegill *Lepomis macrochirus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 39: 998-1005.

Wrench, J.J. (1978) Selenium metabolism in the marine phytoplankton, *Tetraselmis tetrahele* and *Dunaliella minuta*. *Mar Biol* 49:231-236.

Wu, A. S. H.; Oldfield, J. E.; Whanger, P. D. & Weswig, P. H. (1973). Effects of selenium, vitamin E and antioxidants on testicular function in rats. *Biol. Reprod.* 8, 625-629.

Yang, G.; Warg, S.; Zhou, R. (1983). Endemic selenium intoxicant of humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 37: 872-881.

Yasuda, K.; Watanabe, H.; Yamazaki, S.; Toda, S. (1980). Glutathione peroxidase activity of D, L-selenocystine and Selenocystamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98: 243-249.