



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR – PMBqBM



TÁSSIA LIZ ARAÚJO DOS SANTOS LESSA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NOVOS
SELENOCOMPOSTOS**

**VITÓRIA DA CONQUISTA - BA
OUTUBRO – 2021**

TÁSSIA LIZ ARAÚJO DOS SANTOS LESSA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NOVOS
SELENOCOMPOSTOS**

Tese de doutorado apresentado ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

**VITÓRIA DA CONQUISTA - BA
OUTUBRO – 2021**

L622a

Lessa, Tássia Liz Araújo dos Santos.

Atividade anti-inflamatória *in vitro e in vivo* de novos selenocompostos. /
Tássia Liz Araújo dos Santos Lessa, 2021.

106f.; il. (algumas color.)

Orientador (a): Dr. Raphael Ferreira Queiroz.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa
Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM, Vitória da Conquista,
2021.

Inclui referência F. 90 – 101.

1. Neutrófilos - Inflamação. 2. Selenocomposto. 3. Mieloperoxidase – Ácido
hipocloroso. 4. Constante de velocidade. I. Queiroz, Raphael Ferreira. II. Universidade
Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia
Molecular – PMBqBM. T. III.

CDD: 616.1

1

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

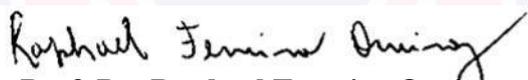
DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA IN VITRO E IN VIVO DE NOVOS SELENOCOMPOSTOS”.

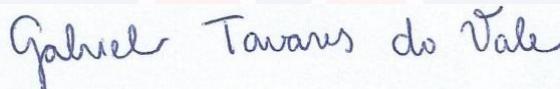
Autor (a): Tássia Liz Araújo dos Santos Lessa

Orientador (a): Professor Dr. Raphael Ferreira Queiroz

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



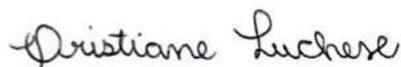
Prof. Dr. Gabriel Tavares do Vale
Universidade do Estado de Minas Gerais



Profa. Dra. Ana Paula de Araújo Boleti
Universidade Católica Dom Bosco



Prof. Dr. Ethel Antunes Wilhelm
Universidade Federal de Pelotas



Profa. Dra. Cristiane Luchese
Universidade Federal de Pelotas

Data de realização: 08 de novembro de 2021.

DEDICATÓRIA

*Ao meu filho, marido e meus pais,
pois eles sentiram e sentirão todas
as consequências deste trabalho.
Obrigada pelo amor e cuidado
diário.*

AGRADECIMENTOS

À Jesus, pela promessa, pela fidelidade, pelo cuidado, por me guiar e por ter me dado ânimo para perseverar no propósito! Toda honra e glória seja dada a Ti!

Ao meu filho, João, apenas por existir e mudar toda minha essência! Ah, e por acompanhar a mamãe no laboratório aos fins de semana cuidar dos “ratinhos”!!

Eu te amo, meu filho!!

Ao meu marido, João Paulo, ajudador nato! Mão, corpo e bolso presente! Até aqui, nada desse trabalho seria realizado sem você! Dedico a você tudo isso!!!

Te amo!!

Aos meus pais, por todas as renúncias, pelo exemplo de união familiar e pelo amor de todos os dias! Principalmente, por sempre estarem disponíveis para viajarem comigo ou então ficarem e cuidarem do meu bem mais precioso, como se fosse eu! Sem vocês, eu não conseguiria! Amo vocês.

À minha irmã, Maiara, e meu cunhado, Márcio e minha pululuquinha, Laura! pela amizade, parceria! por me receberem, escutarem e distraírem nas minhas várias idas a Jequié e pelos momentos maravilhosos em Conquista! Por torcerem sempre por mim! Amo vocês!

À minha sogra, Neuza Lessa, pela disponibilidade, pelo amor e ternura que cuida da minha família! Te amo!!

À minha cunhada, Amanda e minha sobrinha Lilica! Por serem alegria pro meu filhote nos finais de semana que mamãe precisava estudar! Obrigada pelas brincadeiras, pelas histórias contadas, presentes e todo amor!!! amo vcs!

Ao Professor Raphael Ferreira Queiroz, pela orientação, persistência e por todos os conhecimentos transmitidos desde meu mestrado! Muito obrigada.

À Thiago, “anjo” que Deus colocou em meus caminhos! Pela mão, ou melhor corpo inteiro que me deu! Ajudou, ensinou, fez.... como se fosse dele! Esse trabalho é nosso, amigo! Você é diferenciado!! Muito, muito, muito obrigada!

Aos amigos Felipe e Leonardo, presentes do doutorado, por estarem sempre disponíveis para me ajudar! Pelos conselhos e conhecimentos transmitidos a mim! Pelos dias alegres no laboratório, pela convivência e auxílio nos experimentos! Sem vocês tudo seria mais difícil e sem graça. Rs!! Vocês são incríveis!!

À Talita, por sempre estar pronta e disponível para ajudar! E pelos lanches que sempre levava! Muito obrigada, Tali!!

À Lorena, por me ajudar com as tecnologias da vida, rs!! Obrigada, Rori!!

À Aline, minha mão, braço e um pouquinho mais! por cuidar e conseguir entreter meu pequeno para a mamãe estudar! Por cuidar de minha casa como se fosse a dela! Pelos cafés... Sem você teria sido difícil! Rs. Muito obrigada!!

À professora Janaína por me fazer retornar ao meu propósito! Muito obrigada!

À professora Flávia Meotti pela recepção, disponibilidade e carinho que me recebeu em seu laboratório. Muito Obrigada!

À professora Regiane Yatsuda pela disponibilidade, por sempre me abrir portas quando precisei. Muito obrigada!!

Ao professor Alcindo e Marcos por sintetizarem e concederem os compostos que estamos estudando. Muito obrigada!!

À Railmara, pela disponibilidade, recepção e, principalmente, por amar a pesquisa! Esse seu amor incentiva as pessoas, e eu com certeza, fui uma delas! Aos professores do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da UESB pelos conhecimentos compartilhados.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, à Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realização do doutorado.

À Universidade de São Paulo pelos dias maravilhosos que passei por lá! Espero um dia voltar lá....

À Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia pela concessão da bolsa e fomento ao projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fomento ao projeto.

EPÍGRAFE

*“Toda via eu me alegrarei no
Senhor, exultarei no Deus da
minha salvação pois o Senhor
Deus é a minha força!”*

Habacuque 3:18

RESUMO

A inflamação é uma resposta inespecífica do organismo frente às agressões de diversas naturezas envolvendo diversos tipos celulares, e os neutrófilos compreendem as primeiras e mais abundantes células a alcançarem o sítio inflamatório. A mieloperoxidase (MPO), uma enzima abundante nessas células, é importante na defesa imune inata por formar oxidantes e radicais livres, especialmente o ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante considerado específico da MPO. Essas espécies quando produzidas por longos períodos e/ou altas concentrações podem modificar biomoléculas, incluindo proteínas, lipídeos, DNA e lipoproteínas, e causar danos teciduais. O selênio é um micronutriente essencial com propriedades antioxidantes e constitui o sítio ativo de algumas enzimas, incluindo as tiorredoxinas redutases e glutathiona peroxidases. Por esse motivo, moléculas sintéticas contendo selênio são potencialmente promissoras para o tratamento de desordens com base redox e inflamatórias. Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de 38 compostos inéditos de selênio em inibir a atividade clorinante da MPO *in vitro* e os processos oxidativos mediados pela enzima *in vivo*. Inicialmente, a reação desses compostos com HOCl equimolar foi triada *in vitro*. A formação de HOCl por neutrófilos humanos ativados foi determinada na presença dos 38 compostos (10 μM). A constante de velocidade da reação dos três compostos mais promissores, selecionados acima, foi determinada por competição com a taurina. Os compostos 2, 14 e 34 reagiram rapidamente com HOCl ($\sim 10^7\text{-}10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$) na mesma ordem que a glutathiona. Quando incubadas com MPO, H_2O_2 e NaCl, as moléculas 2, 14 e 34 inibiram a atividade clorinante da MPO com IC_{50} de 3,8, 4,5 e 4,9 μM , respectivamente. Em paralelo, a formação do HOCl por neutrófilos humanos foi reduzida com IC_{50} de 4,6, 2,6 e 3,9 μM pelos compostos 2, 14 e 34, respectivamente. Em seguida, o efeito desses três compostos foi avaliado sobre o *burst* oxidativo em neutrófilos diferenciados de células HL-60. Em termos gerais, apenas o composto 2 reduziu o consumo de O_2 , e a taxa de formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 durante o *burst* oxidativo dos neutrófilos sem evidência de toxicidade celular até 20 μM por 48h. Quando incubado com neutrófilos humanos, o composto 2 (10 μM) também inibiu a migração das células em câmara de Boyden em 74,5%. Diante dos resultados, o composto 2, um novo disseleneto, foi

selecionado para os ensaios *in vivo*. Conforme esperado, a carragenina aumentou a migração de leucócitos, essencialmente neutrófilos, para a cavidade peritoneal de camundongos machos, linhagem C57BL/6, mas o disseleneto (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) reduziu a infiltração celular bem como atenuou todos os índices empregados para monitorar a inflamação no fluido peritoneal (atividade da MPO, peroxidação lipídica, exsudação de albumina, nitrito, níveis de TNF- α e IL-1 β). Quando avaliado em modelo de inflamação de pata de camundongo induzido por carragenina, o disseleneto (50 mg/kg, i.p.) também diminuiu o edema na pata do animal ao longo de 5h. As análises histológica e imunohistológica das patas inflamadas demonstraram também uma diminuição na contagem de neutrófilos, área de edema, marcação para MPO, proteína carbonilada e proteína nitrada. Por fim, os camundongos tratados com dose única da molécula (50 mg/kg, i.p.) não apresentaram quaisquer sinais de toxicidade ao longo de 15 dias. No bioensaio da *Artemia salina*, esse composto (0,05-2 mM) também se mostrou atóxico. Esses achados foram corroborados pela predição *in silico* utilizando o programa Protox II. Em conjunto, os dados apontam o potencial anti-inflamatório desses novos selenocompostos, principalmente o composto 2, por reduzir e/ou limitar o dano oxidativo mediado pela MPO na inflamação ao modular a migração leucocitária.

Palavras-chave: Selenocompostos; mieloperoxidase; ácido hipocloroso; neutrófilos; constante de velocidade; inflamação.

ABSTRACT

Inflammation is a nonspecific response of the organism against aggressions from different types. Neutrophils comprise the first and most abundant cells to reach into inflammatory site. Myeloperoxidase (MPO), an abundant enzyme in these cells, is important for innate immune defense by forming oxidants and free radicals, especially hypochlorous acid (HOCl), a potent and specific oxidant from MPO. These species, when produced for long periods and/or high concentrations, may oxidize biomolecules, including proteins, lipids, DNA and lipoproteins, and lead to tissue damage. Selenium is an essential micronutrient with antioxidant properties, and it constitutes the active site of some enzymes, such as thioredoxin reductases and glutathione peroxidases. Taking this into consideration, synthetic selenium-containing compounds are potentially promising for the treatment of redox-based and inflammatory disorders. In this context, this work aimed to investigate the effect of 38 novel selenium compounds on MPO-chlorinating activity *in vitro* and the resulting MPO-related oxidative damage *in vivo*. Firstly, the reaction of these compounds with equimolar HOCl was screened *in vitro*. HOCl formation by PMA-activated human neutrophils was determined in the presence of 38 compounds (10 μM). The reaction rate constant of the three most promising molecules, selected above, was determined by competition with taurine. Compounds 2, 14 and 34 rapidly reacted with HOCl ($\sim 10^7\text{-}10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$) similarly to glutathione. In the system containing MPO, H_2O_2 and NaCl, molecules 2, 14 and 34 inhibited the chlorinating activity of MPO with IC_{50} values of 3.8, 4.5 e 4.9 μM , respectively. Likewise, HOCl production by human neutrophils was reduced with IC_{50} values of 4.6, 2.6 and 3.9 μM by compounds 2, 14 and 34, respectively. Their effects on the oxidative burst of culture neutrophils were next evaluated. Overall, only compound 2 reduced O_2 consumption, and the rate of $\text{O}_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 formation by culture neutrophils without evidence of cell toxicity up to 25 μM for 48 h. After incubation of human neutrophils and compound 2 (10 μM), the cell migration was inhibited at 74,5% by using Boyden chamber assay. Compound 2, a new diselenide, was then selected for *in vivo* testing. As expected, carrageenan increased the migration of

leukocytes, essentially neutrophils, into C57BL/6 male mouse peritoneal cavity, and the diselenide (25, 50 and 75 mg/kg, i.p.) reduced cell infiltration as well as attenuated all the inflammatory indexes in peritoneal fluid (MPO activity, lipid peroxidation, albumin exudation, nitrite, TNF- α and IL-1 β levels). When evaluated in a carrageenan-induced paw edema in mice, the diselenide (50 mg/kg, i.p.) also diminished the paw edema over 5 h. Histological and immunohistological analysis from inflamed paws also demonstrated a reduction in neutrophil count, edema area, MPO levels, and marking of carbonylated and nitrated proteins. Mice treated with a single dose of the molecule (50 mg/kg, i.p.) did not show any signs of toxicity over 15 days. Using *Artemia salina* bioassay, the diselenide (0.05-2 mM) was also non-toxic. These findings were corroborated by *in silico* prediction using Protox II software. Altogether, these data highlight the anti-inflammatory potential of these novel selenocompounds, mainly compound 2, to reduce and/or limit the MPO-mediated oxidative damage by modulating the leukocyte migration.

Keywords: Selenium compounds; myeloperoxidase; hypochlorous acid; neutrophils; rate constant; inflammation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
2.2.1 Estudos <i>in vitro</i>	19
2.2.2 Estudos <i>in vivo</i>	19
3. DESENVOLVIMENTO	21
3.1 CAPÍTULO 01: REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1.1 Inflamação	21
3.1.2 Radicais livres, oxidantes e antioxidantes	22
3.1.3 Mieloperoxidase	24
3.1.4 Selênio	28
3.2 CAPÍTULO 02: ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA “CHEMICO- BIOLOGICAL INTERACTIONS”	50
1.Introdução	53
2.Material	54
2.1. Materiais	54
2.2.Ensaio	55
2.2.1 Reação das moléculas com HOCl <i>in vitro</i>	55
2.2.2 Cinética da reação entre HOCl e selenocompostos.....	56
2.2.3 Isolamento de neutrófilos do sangue humano periférico	56
2.2.3.1 Avaliação da atividade clorinante em neutrófilos humanos	57
2.2.3.2 Ensaio de quimiotaxia <i>in vitro</i>	56

2.2.4	Atividade clorinante de mieloperoxidase in vitro	58
2.2.5	Cultivo e diferenciação de HL-60	58
2.2.5.1	Formação de O ₂ ^{•-} pela dHL-60	58
2.2.5.2	Consumo de O ₂ por dHL-60.....	59
2.2.5.3	Formação de H ₂ O ₂ por dHL-60	59
2.2.5.4	Formação de HOCl por dHL-60	59
2.2.5.5	Viabilidade Celular	59
2.3.	Ensaio <i>in vivo</i>	60
2.3.1	Animais.....	60
2.3.2	Inflamação peritoneal induzida pela carragenina	60
2.3.2.1	Contagem de leucócitos totais e neutrófilos no lavado peritoneal	61
2.3.2.2	Dosagem de albumina no lavado peritoneal	61
2.3.2.4	Avaliação da atividade peroxidásica da MPO	61
2.3.2.5	Quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	
2.3.2.6	Determinação de citocinas.....	61
2.3.3	Edema de pata induzido por carragenina.....	61
2.3.3.1	Análise histológica.....	62
2.3.3.2	Análise imunohistoquímica.....	62
2.3.4	Ensaio de toxicidade	63
2.3.4.1	Toxicidade sobre larvas de <i>Artemia salina</i> Leach.....	63
2.3.4.2	Toxicidade <i>in vivo</i>	64
2.3.4.3	Estudos <i>in silico</i>	64
2.4	Análises estatísticas	65
3.	Resultados	66
4.	Discussão.....	80
5.	Conflito de interesse	84

6.Agradecimentos	84
7.Contribuição dos autores	85
REFERÊNCIAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fontes de ROS e defesa endógena.

Figura 2. Ciclos clorinante e peroxidásico da MPO.

Figura 3. Produtos primários e secundários provenientes da atividade clorinante e peroxidásica da mieloperoxidase (MPO) com os efeitos fisiológicos e patológicos correspondentes.

Figura 4. Importância do sistema Trx.

Capítulo I

Figura 1. Cinética competitiva da reação entre HOCl com os compostos 2, 14 e 34 e glutatona.....53

Figura 2. Inibição da formação de taurina cloramina pelos selenocompostos.....54

Figura 3. Efeito dos selenocompostos sobre o *burst* oxidativo em células dHL-60.....55

Figura 4. Viabilidade de dHL-60 frente aos compostos 2, 14 e 34.....56

Figura 5. Tirosina reverte parcialmente a inibição da atividade clorinante de neutrófilos pelo composto 2.....57

Figura 6. Viabilidade dos neutrófilos isolados na presença do composto 02.....58

Figura 7. Efeito do composto 2 sob a formação de HOCl e consumo de O₂.....59

Figura 8. Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 na peritonite induzida por carragenina.....60

Figura 9. Inibição da transudação (A), atividade da MPO (B), concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) (C) e de nitrito (D) no sobrenadante do lavado peritoneal pelo composto 02.....61

Figura 10. Diminuição dos níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β no sobrenadante do lavado peritoneal pelo composto 02.....62

Figura 11. Diminuição dos níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β no sobrenadante do lavado peritoneal pelo composto 02.....63

Figura 12. Efeito do composto 02 no edema da pata induzida por carragenina..64

Figura 13. Espessura do edema (A e C) e quantificação de neutrófilos (B e D) no tecido da pata.....64

Figura 14. Determinação de células imunomarcadas para MPO (A e D), proteínas nitradas (B e E) e carboniladas (C e F) no tecido da pata.....66

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Parecer da Comissão Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia

Anexo 2. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA – Análise de variância, do inglês;
- CAT – Catalase;
- DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês;
- DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico, do inglês;
- DTPA – Ácido dietilenotriaminopentacético, do inglês;
- dHL-60 – Células HL-60 diferenciadas em neutrófilos;
- GPx – Glutathione peroxidase;
- GSH – Glutathione;
- GSSG – Dissulfeto de glutathione;
- GR – Glutathione reductase;
- HOX – ácido de halogênio;
- MPO – Mieloperoxidase na forma nativa (MPO-Fe³⁺);
- MPO-I – Composto I ou MPO-Fe^{4+=O}•+;
- MPO-II – Composto II ou MPO-Fe^{4+=O};
- Msr – Metionina sulfóxido reductase;
- NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase;
- NETs – Armadilha extracelular de neutrófilos (do inglês, neutrophil extracellular traps);
- PBS – Tampão fosfato salino;
- PBS-g – Tampão fosfato salino contendo glicose;
- PhSe – Disseleneto de fenila;
- Prxs – Peroxirredoxinas;
- PrxR – Peroxirredoxina reductase;
- RNR – Ribonucleotídeo reductase;
- ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, reactive species of oxygen);
- SOD – Superóxido dismutase;
- TNB – Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, do inglês;
- Trxs – Tioredoxinas;
- TrxR – Tioredoxina reductase.

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta geralmente inespecífica do organismo frente à agressões, incluindo patógenos, queimaduras, radiações, traumas mecânicos, toxinas, dentre outros (Medzhitov, 2008; Kund & Surh, 2012; Feehan & Gilroy, 2019). Os neutrófilos desempenham papel crucial nesse processo e constituem a principal população celular na resposta inflamatória aguda (Hampton et al., 1998; Eum et al, 2010; Mayadas et al, 2013; Winterbourn et al., 2016). Essas células destroem os patógenos por mecanismos oxidativos, através da formação de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) oriundos das enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase (MPO), principalmente, e por mecanismos não oxidativos, através da ação das enzimas lisozima, lactoferrina, lipocalina, catepsina G, elastase e alfa-defensinas (Winterbourn & Kettle, 2000a, 2000b; Teng et al., 2017).

MPO é a enzima mais abundante em neutrófilos, correspondendo a 5% da proteína total nessas células e, portanto, suas reações são as mais importantes no contexto da inflamação aguda. Essa enzima é capaz de amplificar o potencial oxidativo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao formar ácidos de halogênio a partir de haletos (por exemplo, HOCl e HOBr), dentre os quais o HOCl (ácido hipocloroso) é o mais estudado por ser um produto específico da MPO, além de produzir radicais livres a partir de substratos endógenos (por exemplo, radicais tirosila, glutatiónila e ascorbila) (Winterbourn & Kettle, 2000a, 2000b; Davies et al., 2008; 2013; Meotti et al., 2011; Nauseef, 2014).

Os danos mediados pela MPO não se limitam aos micro-organismos externos, pois em condições inflamatórias exacerbadas, o HOCl e as demais espécies podem oxidar as biomoléculas do hospedeiro e causar dano tecidual. De fato, diversos estudos sugerem o envolvimento da enzima no dano pulmonar em pacientes portadores de COVID-19 (Guéant et al., 2020; Zuo et al., 2020), sepse (Podrez et al., 2000; Nussbaum et al., 2013), diabetes (Rosales-Corral et al, 2015), aterosclerose (Nauseef, 2001, Stark, 2015, Cheng et al., 2019), disfunção endotelial (Cheng et al., 2019), doença de Alzheimer (Pohanka, 2014; Rosales-Corral et al, 2015), e na instabilidade da placa aterosclerótica (Teng et al., 2017; Cheng et al., 2019).

A concentração de ROS na célula é mantida em equilíbrio pela ação de sistemas antioxidantes endógenos, enzimáticos e não enzimáticos, e exógenos capazes de atenuar os níveis de radicais livres e oxidantes, no intuito de compensar as alterações nas concentrações de ROS provenientes do metabolismo basal ou do estresse redox. Desse modo, a manutenção da homeostase redox celular pelos antioxidantes é essencial não apenas para a manutenção da integridade tecidual como também nos mecanismos de sinalização celular (Winterbourn, 2008; Zhang et al., 2016). O selênio é um oligoelemento importante e essencial na biologia redox de mamíferos, e desde a descoberta de seu papel na atividade catalítica de enzimas antioxidantes esse elemento tem recebido considerável atenção (Reich & Hondal., 2016).

O selênio é um elemento presente no sítio ativo de proteínas que atuam na homeostase celular e na limitação dos danos oxidativos, incluindo glutathione peroxidase (GPx) (Almondes et al., 2010; Comasseto, 2010) e tioredoxina redutase (TrxR) (Capacho, 2012; Arner, 2018), no transporte do selênio, como selenoproteína P (Shchedrina et al., 2010), e no metabolismo de hormônios tireoidianos, como iodotironina deiodinase (Meyer et al., 2007; Shchedrina et al., 2010). Esse micronutriente essencial aos mamíferos é capaz de modular processos redox ao capturar radicais livres e oxidantes, principalmente devido seu baixo potencial de redução (Wang et al., 2016). O selênio também previne a apoptose, entretanto, em doses supranutricionais, mas não tóxicas, pode estimulá-la (Zeng, 2009). Do ponto de vista farmacológico, diversos estudos descreveram as atividades antidepressiva (Jesse et al., 2010), ansiolítica (Paltian et al., 2020), antibacteriana (Mosolygó et al., 2019), leishmanicida (Martins-Montez et al., 2017), anti-inflamatória (Nakamura et al. 2002; Luchese et al., 2012; Noguchi, 2016; Pinz et al., 2016; Wang et al., 2016; Reis et al., 2019), analgésica (Reis et al., 2019; Pinz et al., 2016) e antioxidante (Luchese et al., 2019; Pinato-Botelho et al., 2019; Tapiero et al., 2019) aos derivados orgânicos de selênio.

Diante do exposto, selenocompostos são candidatos em potencial à antioxidantes e/ou anti-inflamatórios, considerando a capacidade de reagir com espécies derivadas da MPO e peróxidos orgânicos (Nakamura et al., 2002; Susan et al., 2013; Pinatto-Botelho et al., 2020). Por esse motivo, esta tese

objetivou avaliar a capacidade anti-inflamatória de 38 novos compostos de selênio *in vitro* e *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* de moléculas sintéticas contendo selênio.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estudos *in vitro*

- Realizar triagem da reação dos compostos com HOCl *in vitro*;
- Realizar triagem da capacidade dos compostos em inibir a atividade clorinante de neutrófilos;
- Selecionar as três moléculas mais promissoras e investigar o efeito sobre a atividade clorinante da MPO *in vitro*;
- Determinar a constante de velocidade da reação desses três compostos com HOCl e/ou MPO;
- Investigar os efeitos dessas três moléculas sobre o consumo de oxigênio e formação de superóxido e peróxido de hidrogênio por neutrófilos;
- Determinar a toxicidade desses três compostos sobre neutrófilos;
- Avaliar a toxicidade *in vitro* desses três compostos frente à *Artemia salina* Leach;
- Investigar o efeito do composto mais promissor sobre a migração de neutrófilos humanos *in vitro* usando câmara de Boyden;
- Realizar a predição farmacocinética e toxicológica *in silico* através dos programas Swiss ADME e ProToxII.

2.2.2 Estudos *in vivo*

- Avaliar a toxicidade aguda do composto mais promissor *in vivo*;
- Definir a dose anti-inflamatória do composto mais promissor em modelo de migração peritoneal *in vivo* induzido por carragenina;

- Determinar a exsudação, número de leucócitos, atividade de MPO, concentração de citocinas inflamatórias, concentração de nitrito e peroxidação lipídica no lavado peritoneal dos camundongos;
- Investigar o efeito do composto mais promissor em dose fixa sobre o edema de pata induzido por carragenina;
- Quantificar o infiltrado celular no músculo da pata por histologia;
- Determinar a presença de biomarcadores redox e inflamatórios no músculo da pata por imunohistoquímica;

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 CAPÍTULO 01: REVISÃO DE LITERATURA

3.1.1 Inflamação

A inflamação é uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor como micro-organismos, queimaduras, radiações, fatores mecânicos e toxinas. O sistema imunológico dos vertebrados desenvolveu essa estratégia de sobrevivência para eliminar ou limitar o agente da lesão, facilitar o reparo tecidual e restaurar a função do tecido lesado (Medzhitov, 2008; Mittal et al., 2014). Esse sistema é dividido em sistema imune inato e adaptativo (Medzhitov et al., 1997).

O sistema imune inato fornece a primeira linha de defesa imunológica contra a infecção, que apesar de ser também conhecido como sistema imunológico inespecífico existem discussões quanto a isso (Medzhitov et al., 1997; Vidya et al., 2017). Compreende-se por eosinófilos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células *natural killers*, receptores do tipo TLR (do inglês, *toll-like receptors*) e uma série de mediadores solúveis, como o sistema de complemento (Turvey et al., 2009). Por outro lado, o sistema adaptativo ou específico ataca principalmente invasores específicos, e se constitui de células altamente especializadas como linfócitos T e linfócitos B, que reconhecem especificamente diferentes antígenos e produzem uma resposta citotóxica ou humoral, via anticorpos, e mais importante geram memória imunológica (Bonilla & Boettgen, 2010).

Durante a inflamação, vários mecanismos bioquímicos, como a cascata do sistema complemento e da coagulação, são ativados, que auxiliam no estabelecimento, evolução e resolução do processo. Adicionalmente, substâncias solúveis de meia-vida curta são liberadas, exercem sua ação e são degradadas. Em geral, o sucesso na remoção do estímulo desencadeador leva ao término da resposta aguda e reparo tecidual completo (Clarck e Kupper, 2005; Turvey et al., 2009; Mittal et al., 2014).

A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular iniciada pelas células residentes no tecido imediatamente após o dano. Os macrófagos estimulados pelos indutores da resposta inflamatória produzem citocinas, como TNF- α e IL-1 β , as quais induzem as células endoteliais das vênulas endoteliais a expressarem selectinas, ligantes para integrinas e quimiocinas. As selectinas

medeiam a adesão leve dos neutrófilos, as integrinas promovem a adesão forte e as quimiocinas ativam e estimulam a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório. Essas células são as primeiras e mais abundantes a alcançarem o sítio inflamatório (Hampton et al., 1998; Eum et al, 2010; Mayadas et al, 2013; Winterbourn et al., 2016).

Os neutrófilos ativados produzem uma série de oxidantes e radicais livres, genericamente denominados de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) (Babior, 1984; Dinauer, 2014), através das enzimas NADPH oxidase, isoforma NOX2, e MPO. Além disso, são constituídos de uma maquinaria antimicrobiana não oxidativa compreendida por enzimas granulocíticas, incluindo lisozima, catepsina G, elastase e lactoferrina (Teng et al., 2017). As NOXs, não apenas a NOX2, reduzem O_2 ao ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) às custas do NADPH oriundo da via das pentoses fosfato. $O_2^{\bullet-}$ se dismuta espontaneamente ou mediado pela superóxido dismutase (SOD) ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fridovich, 1979), cujo potencial oxidativo é amplificado pela MPO. Além dos neutrófilos, existem isoformas de NOX presentes em outros tipos celulares, incluindo epitélio, células musculares lisas e endotélio, e estão envolvidas no crescimento, diferenciação, proliferação celular, apoptose, transdução de sinais, senescência, inflamação, dentre outras funções (Bedard & Krause, 2007; Mittal et al., 2014).

Dentre os sistemas citados acima, aquele envolvendo a MPO é inquestionavelmente o mais importante, não apenas pela abundância da enzima dentro dos neutrófilos – 5% da proteína total, mas também pelas reações que medeiam no contexto inflamatório (Klebanoff, 2005; Nussbaum et al., 2013; Teng et al., 2017).

3.1.2 Radicais livres, oxidantes e antioxidantes

Radicais livres e oxidantes podem elicitar a inflamação ou atuar como mediadores da sinalização celular a depender da concentração relativa (Winterbourn, 2008; Zhang et al., 2016). Em altas concentrações, eles normalmente são prejudiciais às células, porque oxidam proteínas, lipídeos e DNA irreversivelmente, o que pode levar ao dano celular. No entanto, em baixas e moderadas concentrações, ainda não definidas, essas espécies modificam reversivelmente mediadores intracelulares, principalmente proteínas, regulando

crescimento celular, adesão celular, diferenciação, senescência e apoptose (Zhang et al., 2016). Na literatura ainda é discutível como ROS atuam como mediadores de sinalização celular considerando a miríade de antioxidantes endógenos, mas hipóteses sugerem o envolvimento dos sistemas da peroxirredoxinas (Prxs) e glutathiona peroxidase (GPx), principalmente, e distintos modelos de sinalização (Netto & Antunes, 2016).

Os ROS mais estudados são $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxila (OH^{\bullet}), H_2O_2 e ácido hipocloroso (HOCl), provavelmente por terem sido os primeiros a serem descritos (Klebanoff, 2005; Mittal et al., 2014). $O_2^{\bullet-}$ é gerado pela redução do O_2 por sistemas enzimáticos ou como subproduto da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. $O_2^{\bullet-}$ se dismuta espontaneamente ao H_2O_2 ($k = 2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$) ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) ($k = 1,6 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) (Fridovich, 1979; Thannickal e Fanburg, 2000; Babior, 2004; Lambeth, 2004; Mittal et al., 2014). Na inflamação sustentada, óxido nítrico (NO) é sintetizado pelo óxido nítrico sintase indutível (iNOS) que, por sua vez, reage rapidamente com $O_2^{\bullet-}$, resultando no peroxinitrito ($ONOO^-$), um oxidante altamente reativo (Bonini e Augusto, 2001; Mittal et al., 2014). Essa molécula se decompõe em meio ácido aos radicais HO^{\bullet} e NO_2^{\bullet} e/ou se combina com o par HCO_3^-/CO_2 para formar o intermediário peroximonocarbonato ($ONOO(O)O^-$), que decai em segundos para $CO_3^{\bullet-}$ e NO_2^{\bullet} . HO^{\bullet} e $CO_3^{\bullet-}$ são altamente reativos ($E = 2,8 V$ e $1,57 V$, respectivamente) (Bonini e Augusto, 2001; Armstrong et al., 2013). HO^{\bullet} tem tempo de vida muito curto e oxida indistintamente DNA, lipídeos, proteínas e moléculas de baixo peso molecular com constantes de velocidade contraladas pela difusão, normalmente, enquanto $CO_3^{\bullet-}$ reage principalmente com proteínas, mais especificamente os resíduos de tirosina, histidina e triptofano. NO_2^{\bullet} , apesar de relativamente menos oxidante ($E = 1,04 V$), causa nitração do DNA, lipídeos e proteínas (Bonini e Augusto, 2001; Armstrong et al., 2013; Augusto et al., 2019).

Os metais normalmente não são encontrados livres, mas em condições inflamatórias esses íons são liberados dos complexos proteicos, principalmente o ferro. $O_2^{\bullet-}$ reage com o íon férrico (Fe^{3+}) para formar o íon ferroso (Fe^{2+}) e O_2 na reação chamada de Haber-Weiss. No entanto, essa reação é termodinamicamente desfavorável sob condições fisiológicas (Kehrer, 2000). A segunda etapa, mais importante e conhecida como reação de Fenton, ocorre a

oxidação do íon ferroso (Fe^{2+}) pelo H_2O_2 para formar OH^\bullet e OH^- (Saran e Bors, 1989, Thannickal e Fanburg, 2000). Contudo, no contexto da inflamação aguda, onde a quantidade de neutrófilos é abundante, H_2O_2 é preferencialmente consumido pela MPO sob alta constante de velocidade e ocorre geração de ácidos de halogênio e radicais livres, a depender da disponibilidade dos substratos (Bos et al., 1978; Klebanoff, 2005; Davies, 2021)

Os efeitos deletérios de ROS às células são reduzidos às custas dos sistemas antioxidantes endógeno (enzimático e não enzimático) e exógeno, que removem ou limitam a ação de ROS. Os antioxidantes enzimáticos incluem SOD, catalase (CAT), GPx, Prxs e tiorredoxinas (Trxs), enquanto os não enzimáticos mais importantes incluem ácido úrico, glutathiona (GSH), flavonoides, vitaminas A, C e E (Mittal et al., 2014; Qian et al., 2019).

Diante do complexo aparato de enzimas antioxidantes endógenas, o estresse redox ocorre apenas quando a capacidade antioxidante dessas importantes enzimas é superada pela produção acentuada de oxidantes e/ou quando a atividade desse sistema se encontra reduzida (Mittal et al., 2014; Singla et al., 2019).

3.1.3 Mieloperoxidase

As peroxidases compreendem um grupo de oxidorreduções que utilizam os peróxidos como aceptores de elétrons e podem ser do tipo hemeperoxidases ou tiol peroxidases, de acordo com a presença do grupo heme ou tiois no sítio ativo, respectivamente (Davies et al., 2008; Dunford, 2010, Nussbaum et al, 2013).

MPO é uma peroxidase que merece destaque na inflamação. Trata-se uma hemeperoxidase catiônica e heterodimérica com peso molecular de ~150 kDa, sendo presente em altas concentrações nos grânulos azurófilos primários de neutrófilos, correspondendo a 5% da massa seca do neutrófilo, e em menor grau nos lisossomos primários de monócitos (Klebanoff, 2005).

MPO nativa (MPO-Fe^{3+}) amplifica o potencial oxidante do H_2O_2 ($k = 1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Furtmüller et al., 2000) através dos intermediários reativos MPO-I ($\text{MPO-Fe}^{4+}=\text{O}^{\bullet+}$) e MPO-II ($\text{MPO-Fe}^{4+}=\text{O}$). MPO-I pode retornar ao seu estado nativo através da via clorinante, em um passo de dois elétrons, ou pela via peroxidásica, em dois passos de um elétron (Klebanoff, 2005). No ciclo

clorinante, MPO-I oxida haletos (X^-) ao respectivo ácido de halogênio (HOX) regenerando a MPO nativa, enquanto no ciclo peroxidásico a MPO-I oxida diversos substratos endógenos (AH_2) nos respectivos radicais livres ($\bullet AH$) através do intermediário MPO-II ($MPO-Fe^{4+}=O$) (Figura 2) (Podrez et al., 2000; Winterbourn, 2008; Winterbourn et al., 2016; Davies, 2021).

Dependendo do local e concentração relativa de substratos, o par MPO- H_2O_2 é capaz de gerar uma ampla gama de espécies oxidantes, incluindo HOCl, cloraminas, $HO\bullet$, oxigênio singlete (1O_2) e ozônio (O_3) (Klebanoff, 2005; Davies et al., 2008; 2021). Todos esses produtos têm vida relativamente curta, com exceção das cloraminas, mas são compostos altamente reativos que podem reagir com qualquer grupo oxidável, incluindo tiois, tiol-ésteres, grupos heme e ácidos graxos insaturados. Essas modificações oxidativas podem alterar a atividade da biomolécula e, como consequência, afetar as funções e atividades celulares (Davies et al 2008; 2021).

HOCl ($pK_a = 7,53$), provavelmente, é o produto mais abundante da MPO, uma vez que a concentração fisiológica dos íons cloreto é ~ 150 mM em fluidos fisiológicos (Winterbourn & Kettle, 2000b; 2013; Nauseef, 2014; Davies, 2021). HOCl reage rapidamente com um grupo extenso de moléculas funcionais, em pH fisiológico, particularmente com enxofre (tiois e tioésteres), com constantes de velocidade na ordem 10^7 - 10^8 $M^{-1}s^{-1}$ (Pattison & Davies, 2006; Storkey et al., 2014), o que pode levar a modificações irreversíveis em enzimas que contém cisteína no sítio ativo (Davies et al., 2008; 2021). Além de grupos contendo cisteína, HOCl também reage rapidamente com moléculas contendo selênio (Skaf et al., 2012; Storkey et al., 2014; Pinato-Botelho et al., 2020).

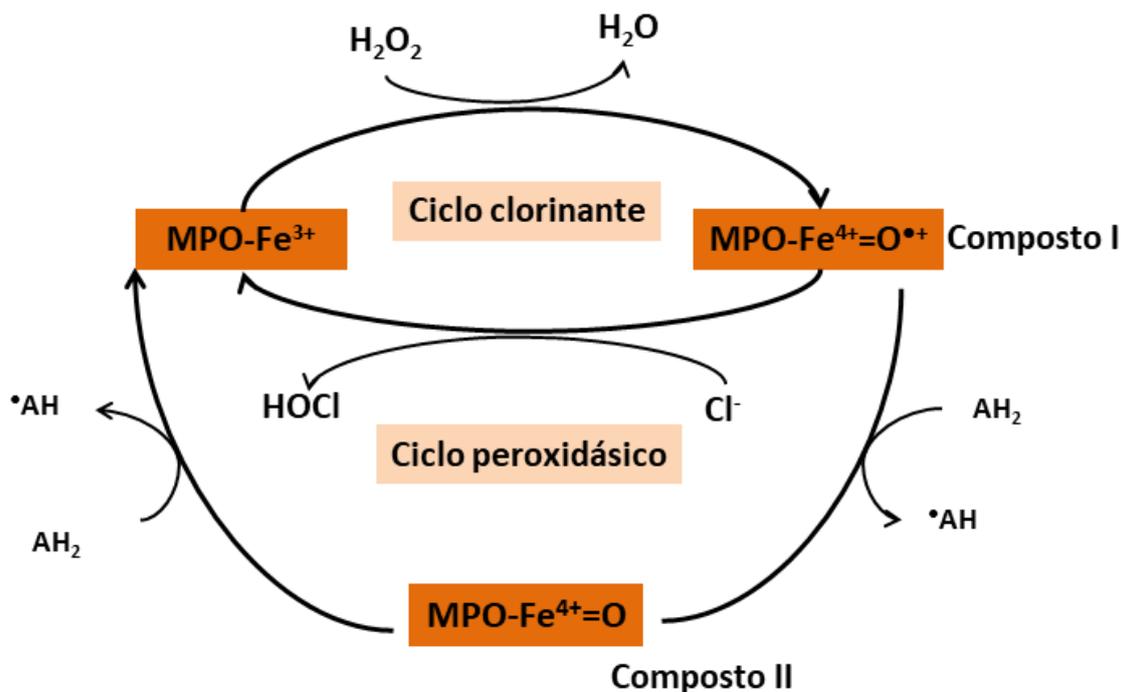


Figura 1. Ciclos clorinante e peroxidásico da MPO. As reações catalisadas pela MPO podem ser divididas em dois ciclos: o ciclo clorinante e ciclo peroxidásico. No clorinante, o composto-I ($\text{MPO-Fe}^{4+=\text{O}\bullet+}$) oxida haletos (X^-) ao respectivo ácido de halogênio (HOX) regenerando a MPO. No peroxidásico, o composto-I retorna a MPO nativa por dois passos de um elétron, através do composto-II ($\text{MPO-Fe}^{4+=\text{O}}$), ao passo que oxida diversos substratos endógenos (AH_2) em radicais livres ($\bullet\text{AH}$).

HOCl também pode reagir com compostos contendo nitrogênio, como aminas e amidas, presentes em uma ampla variedade de substratos biológicos, incluindo fosfolípidos, glicosamiglicanos, grupamentos amino de proteínas, DNA e RNA (Davies et al., 2008; 2010; 2021), o que resulta na formação de mono- ou di-cloraminas de longa duração. Essas cloraminas aumentam o tempo de vida do HOCl , permitindo que cisteínas, metionina e centros metálicos em sítios distantes daquele de formação sejam oxidados, contribuindo sobremaneira com a lesão celular (Thomas et al., 1986; Van der Veen et al., 2009; Aratani, 2018).

Particularmente no pH ácido do ambiente inflamatório, HOCl está em equilíbrio com o cloro molecular ($\text{HOCl} + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}$), que é um dos agentes envolvidos na formação de 3-clorotirosina (3-Cl-Tyr) ou 3,5-diclorotirosina (Hazen et al., 1996, Nussbaum et al., 2013). Esses dois produtos

são extensivamente empregados como marcador da atividade MPO, como podem contribuir indiretamente com o processo inflamatório e dano tecidual subsequente (Kettle, 1996; Kang & Neidigh, 2008).

HOCl também reage com éter de fosfolipídios, encontrado em partículas de lipoproteína imersas nas membranas biológicas, o que leva a formação de 2-cloroexadecanal, um aldeído clorado que é abundante em lesões ateroscleróticas humanas (Zhang et al., 2001; Ndrepepa et al., 2008; Heslop et al., 2010) e de infarto do miocárdio (Zhang et al., 2001).

NO e seu principal produto oxidado nitrito (NO_2^-) foram identificados como substratos adicionais para MPO em condições fisiológicas (Domigan et al., 1995; Abu-Soud & Hazen, 2000; Gaut et al., 2002). Em tecidos e fluidos biológicos, NO_2^- é encontrado em altas concentrações (1 a 5 mM), mas os níveis aumentam significativamente na inflamação (>200 mM), servindo como um importante redutor para a MPO-I, principalmente em pH ácido (Farrell et al., 1992; Gaston et al., 1993; Ueda et al., 1997; Van der Veen et al., 2009; Aratani, 2018). A oxidação da NO_2^- pela MPO-I e MPO-II leva a formação do NO_2^\bullet que, por sua vez, promove a nitração de proteínas e lipídeos (Eiserich et al., 1998; Hazen et al., 1999; Schmitt et al., 1999; Kirsch et al., 2002; Radi, 2004). Na verdade, os resíduos de 3-nitrotirosina (3- NO_2Tyr) são frequentemente utilizados como impressão digital biológica de estresse redox envolvendo agentes nitrantes (Radi, 2004; Lancaster, 2006, Van der Veen, 2009, Aratani, 2018.), além de contribuírem com a disfunção celular na inflamação (Van der Veen, 2009, Aratani, 2018).

Diversos estudos demonstraram o envolvimento da MPO e seus oxidantes com doenças humanas, sendo considerada um biomarcador preditivo para doenças cardiovasculares (Moccata et al., 2007; Vries et al., 2016; Ndrepepa., 2019), cuja concentração encontra-se elevada no soro e/ou tecidos de pacientes com insuficiência cardíaca isquêmica (Arslan et al., 2011), infarto do miocárdio e doença arterial coronariana (Heslop et al., 201.; Nussbaum et al., 2013; Ndrepepa., 2019), diabetes (Rosales-Corral et al., 2015), aterosclerose (Nauseef, 2001, Wong et al., 2009; Stark, 2015; Teng et al., 2017; Cheng et al., 2019), doença de Alzheimer (Pohanka, 2014; Rosales-Corral et al., 2015), e COVID-19 (Gueánt et al., 2020; Petite et al., 2021)

Mais recentemente, demonstrou-se que os neutrófilos ativados também produzem os chamados NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*), que são estruturas secretadas por essas células compostas por MPO, DNA, e peptídeos antimicrobianos (Brinkmann et al., 2004). Os NETs contribuem sobremaneira com a patogênese de desordens microvasculares, inclusive em pulmões de pacientes com síndrome de desconforto respiratório agudo (Schreiber et al., 2017), doenças inflamatórias crônicas, autoimunes, em diversos tipos de cânceres (Kaplan & Radic, 2012; Zawrotniak et al., 2013). Ademais, alguns autores relataram alto conteúdo de DNA livre, complexos MPO-DNA e histona citrulinada H3, sendo os dois últimos marcadores específicos de NETs, em soro e lavado broncoalveolar de pacientes com COVID-19 (Veras et al., 2020; Zuo et al., 2020). Em conjunto, esses achados endossam a íntima relação da MPO com a fisiopatogênese de inúmeros processos inflamatórios agudos e crônicos.

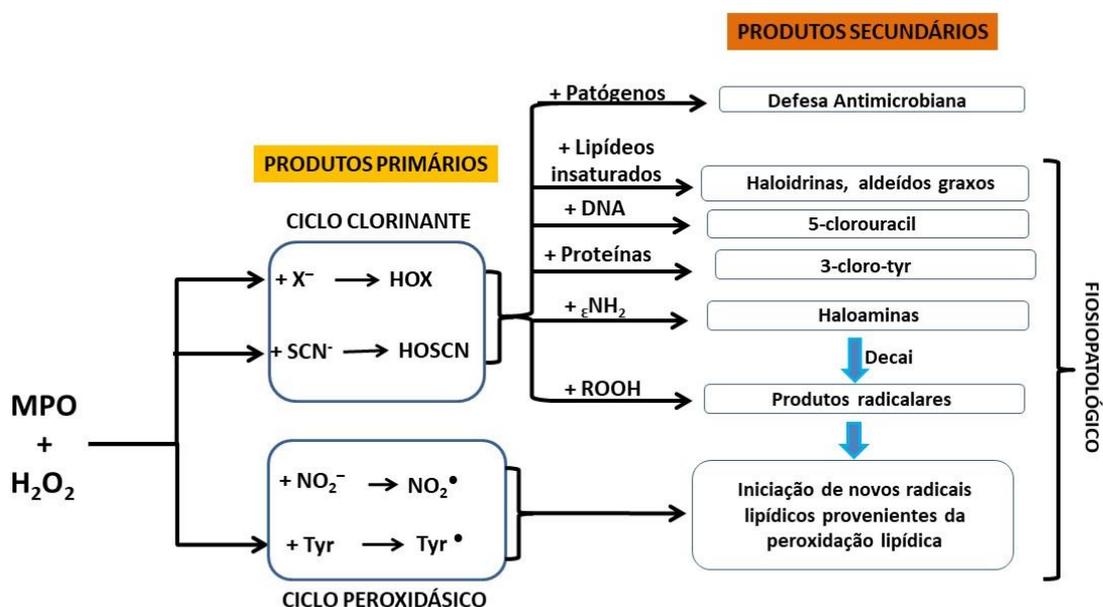


Figura 2. Produtos primários e secundários provenientes da atividade clorinante e peroxidásica da mieloperoxidase (MPO) com os efeitos fisiológicos e patológicos correspondentes. Tyr= tirosina.

3.1.4 Selênio

Selênio (Se) é um elemento da família 16 (VIA) da tabela periódica, descoberto por Berzelius em 1816, sendo um micronutriente essencial para o desenvolvimento e a saúde de animais e humanos (Trofast, 2011; EFSA, 2014;

Reich & Hondal, 2016). Esse elemento foi considerado como tóxico (Oldfield, 1987; Reich & Hondal, 2016), pois causava halitose, calvície e onicólise, irritabilidade e fadiga (MacFarquhar et al., 2010). A descoberta do selênio como um oligoelemento essencial se estabeleceu quando descobriram sua presença em algumas proteínas, e que sua deficiência poderia causar doenças musculares, alterações gastrointestinais e reumáticas (Shamberger, 1983; EFSA, 2014; Reich & Hondal, 2016).

Os alimentos contêm diversas formas e quantidades de selênio. Como suplemento, ele pode ser utilizado na forma inorgânica, sendo os selenitos e selenatos os principais, e nas formas orgânicas como selenetos (dimetilselenida), selenoproteínas e aminoácidos de selênio (L-selenometionina, L-selenocisteína) (Zeng, 2009; EFSA, 2014). A selenocisteína, derivada da cisteína, é uma das principais formas de selênio biológico, sendo considerada um resíduo de aminoácido específico de proteínas denominadas selenoproteínas (EFSA, 2014; Rich & Hondal 2016; Guillin et al., 2019)

3.1.5 Selenoproteínas

As selenoproteínas mais estudadas são as glutathione peroxidases (Flohé et al., 1995; Flohé et al., 2000; Reich & Hondal, 2016), selenoproteína P, iodotironina deiodinases (Reich e Hondal, 2016;), TrxR (Arner, 2018; Guillin., et al 2019), e metionina sulfóxido redutase (Fomenko et al., 2009; Reich e Hondal, 2016; Guillin et al., 2019). Os sistemas das Trxs e GPxs são uma grande família de enzimas que assumem função crítica na proteção celular contra danos oxidativos (Figura 1). Atualmente, das 8 isoenzimas das GPx humanas, cinco contêm selenocisteínas, exibindo expressões tecido-específico e diferentes especificidades à substratos (Brigelius-Flohé, 1999; Margis et al., 2008; Steinbrenner & Sies, 2009). GPx-1 é encontrada no citosol, GPx-2 é uma enzima específica do trato gastrointestinal, GPx-3 é secretada no plasma, GPx-4 é ubiquamente distribuída é chamada de glutathione peroxidase fosfolipídio hidroperóxido, pois é a única enzima capaz de reduzir eficientemente hidroperóxidos de colesterol e lipídeos (Ursini et al., 1997; Conrad et al., 2013), e GPx-sn é enzima específica do núcleo de espermatozoides (Margis, 2008). Todas as isoenzimas GPx têm em comum a tríade catalítica no centro ativo

constituída de selenocisteína, glutamina e triptofano (Stadtman & Daves, 1991; Maiorino et al., 1995).

As GPxs atuam como antioxidante ao reduzir eficientemente peróxido de hidrogênio ($4,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Takebe et al., 2002; Cardoso et al., 2016), hidroperóxidos orgânicos ($\sim 10^3 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Takebe et al., 2002) e fosfolípido hidroperóxido (somente a GPx-4) a água ou respectivos álcoois, utilizando normalmente dois equivalentes de glutatona (GSH) como co-substrato (Brigelius-Flohé, 1999; Almondes et al., 2010). A enzima em sua forma ativa, selenol (Enz-SeH) (1), reage com um equivalente de peróxido, reduzindo-o a água ou respectivo álcool e formando o ácido selênico (Enz-SeOH) (2). Esse então é atacado por um equivalente da GSH para formar dissulfeto misto, (Enz-SeSG) (3) e água. Na última etapa, o selenosulfeto (3) reage com um segundo equivalente de GSH para regenerar a forma ativa da enzima ao passo que produz simultaneamente a glutatona oxidada (GSSG) (Maiorino et al., 1995; Back & Dick, 1997) (Figura 3). A redução da glutatona oxidada para GSH é mediada pela glutatona-redutase (GR), a qual NADPH da via das pentoses como fonte de elétrons (Almondes et al., 2010).

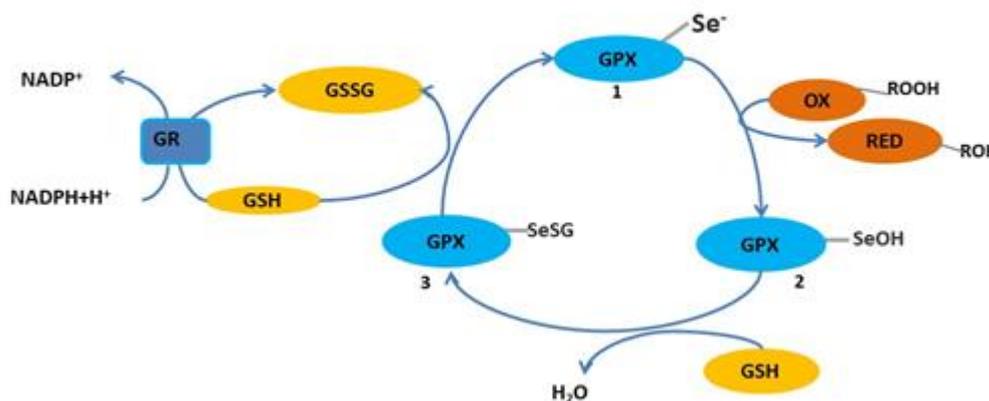


Figura 3. Ciclo catalítico da glutatona peroxidase (GPx). A GPx possui uma selenocisteína no seu sítio ativo, que quando reduzida encontra-se na forma de selenol (CysSeH), este é oxidado por peróxidos (ROOH) a ácido selênico (CysSeOH). Em sequência, uma glutatona (GSH) reage com o ácido selênico, formando o selenil dissulfeto (CysSeSG). Uma segunda molécula de GSH ataca o enxofre desse grupamento, gerando dissulfeto de glutatona (GSSG) e regenerando o selenol, completando o ciclo catalítico. A glutatona redutase (GR) catalisa a redução do GSSG à GSH, utilizando NADPH como substrato.

O sistema da Trx, composto pela TrxR, Trx e NADPH, é essencial não apenas na defesa antioxidante, mas também no controle redox celular. Além

disso, destaca-se pela importância em outros processos celulares, incluindo síntese de DNA, regulação de apoptose, proliferação celular (Arner et al., 1999; Lu e Holmgren, 2013; Arner 2018). TrxR é uma selenoproteína que contém um resíduo de selenocisteína próximo à porção carboxi-terminal, o qual é essencial para sua atividade (Capacho, 2012; Arner, 2018). Ela catalisa principalmente a redução da Trx, mas devido à alta acessibilidade e reatividade do selenolato da porção C-terminal do sítio ativo da enzima, ela também pode de reduzir outros substratos como hidroperóxidos lipídicos (Bjornstedt et al., 1995), vitamina C (Almondes et al., 2010) e selenitos (Lu & Holmgren, 2009; 2013).

Trx reduzida mantém as enzimas peroxirredoxina (Prx), ribonucleotídeo redutase (RNR) e metionina sulfóxido redutase (Msr) reduzidas e, conseqüentemente, ativas (Holmgren & Lu, 2010; Lee et al., 2013). Prx, Rnr e Msr catalisam a redução de peróxidos, ribonucleotídeos e metionina sulfóxidos, respectivamente (Lee et al., 2013). Trx também interage diretamente com proteínas redox sensíveis, como a quinase 1 regulada por sinal de apoptose (ASK1), a proteína de interação com tioredoxinas (Txnip) e o homólogo de fosfatase e tensina (PTEN), modulando a atividade dessas proteínas, que estão associadas com desenvolvimento, proliferação, migração, apoptose, inflamação e metabolismo celular (Lee et al., 2013; Arner, 2018).

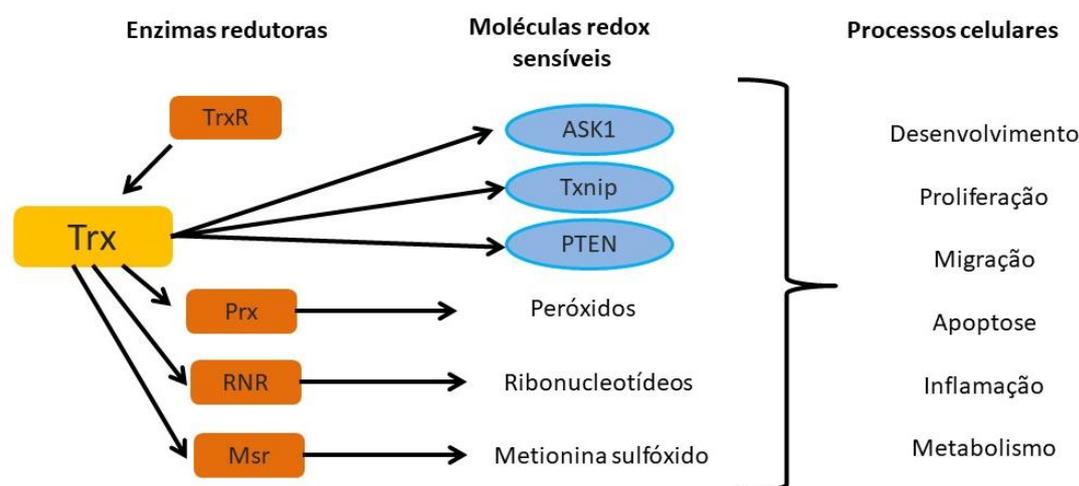


Figura 4. Importância do sistema Trx. O sistema tioredoxina (Trx) é dependente da atividade da tioredoxina redutase (TrxR) para manter sua atividade redutora. Trx reduz peroxirredoxina (Prx), ribonucleotídeo redutase (RNR) e metionina sulfóxido redutase (Msr). Essas enzimas redutoras catalisam a redução de peróxidos, ribonucleotídeos e metionina sulfóxidos, respectivamente. Trx também interage diretamente com moléculas redox sensíveis como a sinal-

regulação da apoptose quinase 1 (ASK1), proteína que interage com tioredoxina (Txnip) e proteína homóloga a fosfatase e tensina (PTEN) que modulam diferentes processos celulares.

A selenoproteína P (SeP) é uma glicoproteína extracelular abundante e é bastante rica em selenocisteína. Ela é responsável por mais de 50% do conteúdo de selênio no plasma de ratos e humanos, cuja função ainda não é completamente compreendida, mas a ação antioxidante extracelular é o mais provável (Takebe et al., 2002; Mostert, 2000; Burk & Hill, 2005; Steinbrenner & Sies, 2009). SeP reduz hidroperóxidos de fosfolipídios usando Trx como co-substrato *in vitro*. Desse modo, ela protege proteínas plasmáticas e de superfície contra oxidações induzidas por hidroperóxidos de fosfolipídeos (Takebe et al., 2002).

As iodotironinas desiodases (D1, D2 e D3) formam uma família de selenoenzimas com propriedades catalíticas distintas que ativam ou inativam os hormônios tireoidianos via deiodinação do anel fenólico ou de tirosina da molécula de tiroxina (T4), transformando-a em T3 (triiodotironina), forma ativa do hormônio tireoidiano (Meyer et al., 2007). D1 e D2 ativam as iodotironinas, convertendo T4 para T3. D1 fornece T3 para o plasma, enquanto D2 para o espaço intracelular. D3 por outro lado inativa as iodotironinas, catalisando a desiodação do anel interno de T4 e T3, resultando na formação dos metabólitos inativos rT3 (T3 reverso) e T2 (Meyer et al., 2007; Germain et al., 2009). A D3 catalisa unicamente a deiodinação do anel interno das moléculas de T4 e T3, resultando na formação dos metabólitos inativos rT3 e T2 (Meyer et al., 2007).

Msr é uma enzima que reduz, especificamente, a metionina oxidada em metionina. Os resíduos de metionina expostos à superfície de proteínas podem atuar como sequestradores de uma variedade de oxidantes. Essa enzima se destaca entre as outras enzimas antioxidantes, pois assumem funções importantes no metabolismo celular, tais como *scavenger* de ROS, enzima de reparo, manter resíduos críticos de metionina na forma reduzida e reguladora da atividade enzimática através da interconversão cíclica de resíduos específicos de metionina entre formas oxidadas e reduzidas (Lee et al., 2009; Sreekumar et al., 2011)

É notória a vantagem evolutiva e catalítica que o selênio confere às selenoproteínas. Kanzok e colaboradores (2001) reportaram que este elemento

não fornece apenas esta função, como também propriedades redox vantajosas. Por ser um bom nucleófilo e eletrófilo, o selênio alterna entre os estados reduzido e oxidado sem se tornar permanentemente oxidado, atuando cataliticamente. Essa capacidade foi referida como o "paradoxo do selênio". Snider e seus colaboradores (2013) testaram essa hipótese em TrxR contendo Sec (Sec-TrxR) e um ortólogo Cys de *D. melanogaster* (DmTrxR) para investigar qual isoforma era mais resistente à inativação por H₂O₂. DmTrxR foi inativado em 50% a 1 mM H₂O₂, enquanto Sec-TrxR manteve-se inalterado. Quando o resíduo de Cys da DmTrxR foi substituído por Sec, a enzima mutada se tornou resistente à inativação pelo H₂O₂ (Snider et al., 2013).

As propriedades biológicas do selênio estão para além da função antioxidante, tanto que foi recentemente demonstrado que compostos orgânicos contendo selênio também atuam como antibacteriano (Mosolygó et al., 2019) e leishmanicida (Martins-Montez et al., 2017), por exemplo. O selênio pode ainda modular a apoptose ao estimular o ciclo celular e reduzir a apoptose, mas em doses supranutricionais e atóxicas, este elemento pode apresentar efeito contrário por induzir a apoptose e inibir o ciclo celular (Zeng, 2009). Além disso, um derivado de purina contendo selênio mostrou efeitos benéficos na memória e ansiedade pela modulação do sistema colinérgico e Na⁺/K⁺-ATPase em um modelo de doença de Alzheimer (Pinz et al., 2021)

O ebselen (2-fenil-1,2-benzoisosselenazol-3-(2H)-ona), um derivado orgânico de selênio, apresenta atividade tiol peroxidásica (Parnham et al., 1991; Zhao et al., 2002, Noguchi, 2016), inibe 15-lipoxigenase e NOX e age como anti-inflamatório (Nakamura et al. 2002; Noguchi, 2016; Wang et al., 2016), e neuroprotetor (Parnham & Sies, 2000; Herin et al., 2001; Unsal et al., 2016). A atividade anti-inflamatória do ebselen também decorre da inibição da atividade da NOX1 e 2, além do bloqueio da translocação da p47phox para membrana neutrofílica e, conseqüentemente, a montagem do complexo enzimático (Smith et al., 2012). Além disso o ebselen se mostrou eficaz na reversão do comprometimento da memória, estresse redox e apoptose em modelo animal de Alzheimer (Martine et al., 2018). O dietil selenodiglicolato reage com HOCl com constante de velocidade de $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Pinatto-Botelho et al., 2020), comparável àquela da reação de HOCl com GSH (Storkey et al., 2014). Além disso, é capaz de inibir a produção de HOCl por neutrófilos derivados da HL-60,

sem alterar a formação de oxidantes *upstream* ao HOCl, provavelmente por inibir diretamente a MPO e/ou devido o efeito *scavenger* sobre HOCl (Pinatto-Botelho et al., 2020).

O disseleneto de difenila (PhSe)₂ assim como o ebselen, é um composto orgânico de selênio que reage eficientemente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos, através de reação similar a catalisada pela GPx . Este composto possui propriedades antioxidante (Meotti et al., 2004; Nogueira et al., 2004), anti-inflamatória, antinociceptiva (Nogueira et al., 2003; Reis et al., 2019; Wang et al., 2021) relatadas, além disso, o (PhSe)₂ é uma molécula estável, com baixa toxicidade em animais (Maciel et al., 2003; Prigol et al., 2009). Neste contexto, e diante das importantes propriedades farmacológicas descritas para o (PhSe)₂ e do dano causado pela inflamação, hipotetizamos que um novo disseleneto pode ser efetivo para inibir/ minimizar os danos causados pela inflamação.

3.1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SOUD HM & HAZEN SL. 2000. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 5425– 5430.

ALMONDES, KGS.; LEAL, GVS; COZZOLINO, SMF; PHILIPPI, ST; RONDÓ, PH. C. 2010. The role of selenoproteins in cancer. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 484-488.

ANSCHAU, V; FERRER-SUETA, G; ALEIXO-SILVA, RL; FERNANDES, RB; TAIRUM, CA.; COSTA, T.; CELISA C.; MURAKAMI, MT.; ANTONIO DE OLIVEIRA, M; SOARES, LE. 2020. Reduction of sulfenic acids by ascorbate in proteins, connecting thiol-dependent to alternative redox pathways. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.015

ARATANI, Y. 2010. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 640, p. 47-52.

ARNER, ES.; ZHONG, L.; HOLMGREN, A. 1999. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Oxidants and Antioxidants*, Pt B, v.300, p.226-239.

ARNER, ESJ. 2018. Selective Evaluation of Thioredoxin Reductase Enzymatic Activities. *Methods in Molecular Biology*, v. 1661, p. 301–309.

ARSLAN, F.; DE KLEIJN, DP & PASTERKAMP, G. 2011. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nature Reviews Cardiology*, v. 8, p. 292–300.

AUGUSTO, O.; GOLDSTEIN, S.; HURST, JK.; LIND, J.; LYMAR, SV.; MERENYI, G.; RADI, R. 2019. Carbon Dioxide-catalyzed peroxyxynitrite reactivity – The Resilience of the radical mechanism after two decades of research. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 135, p. 210-215.

ÁVILA DS.; GUBERT P.; PALMA A.; et al. 2008. An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Research Bulletin*, v. 76, p. 114–123.

BA LA.; DORING M.; JAMIER V.; JACOB C. 2010. Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 8, p. 4203–4216.

BARBOSA, NV.; NOGUEIRA, CW.; NOGARA, PA.; DE BEM, AF.; ASCHNER, M. 2017. Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents. *Metallomics*, v. 9, n. 12, p.1703-1734.

BABIOR, BM. 1999. NADPH Oxidase: an Update. *Blood*, v. 93, p. 1464-76.

BABIOR, BM. 2004. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, v. 16, p. 42-47.

BACK, TG.; DYCK, BP. 1997. A Novel Champor- Derived Selenenamide That Acts As A Glutathione Peroxidase Mimetic. *Journal of The American Chemical Society*, v. 7863, p. 2079-2083.

BEDARD, K. & KRAUSE, KH. 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, v. 87, p. 245-313.

BJORNSTEDT, M.; HAMBERG, M.; KUMAR, S.; XUE, J.; HOLMGREN, A. 1995. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *The Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.11761-11764.

BOLES, JO.; LEBIODA, L.; DUNLAP, RB.; ODOM, JD. 1995. Telluromethionine in structural biochemistry. *Saas Bull. Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 8, p. 29-34.

BOS, A.; WEVER, R.; ROOS, D. 1987. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 525, p. 37-44.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 27, p. 951-65.

BRIGELIUS-FLOHE, R. 2015. The evolving versatility of selenium in biology. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 23 p. 757-760.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; UHLEMANN, Y.; WEISS, DS.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535.

BRIVIBA K.; TAMLER R.; KLOTZ LO.; ENGMAN L.; COTGREAVE IA.; SIES H. 1998. Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochemical Pharmacology*. V. 55, p. 817–823.

BURK, RF & HILL, KE. 2005. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annual Review of Nutrition*, V. 25, p. 215-35.

BONINI, MG & AUGUSTO, O. 2000. Carbon Dioxide Stimulates the Production of Thiyl, Sulfinyl, and Disulfide Radical Anion from Thiol Oxidation by Peroxynitrite. *Journal of Biological Chemistry*, v, 276(13), p.9749–9754.

BROWN, KM & ARTHUR, JR. 2001. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition*, v. 4, p. 593- 599.

CAPACHO, ASC. 2012. Avaliação in silico da tioredoxina redutase como alvo para terapia anti-tumoral. Dissertação de Mestrado em Química Inorgânica Biomédica-Aplicações em Diagnóstico e Terapia. Lisboa: Universidade de Lisboa, 100p.

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. 1998. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a twoelectronoxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochemical Journal*, v. 336, p. 395-404, 1998.

CARDOSO, BR.; HARE, DJ., BUSH, AI.; ROBERTS, BR. (2016). Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? *Molecular Psychiatry*, v. 22, p. 328–335.

CARROLL, L.; PATTISON, DI.; FU, S.; SCHIESSER, CH.; DAVIES, MJ.; HAWKINS, CL. 2015. Reactivity of selenium-containing compounds with myeloperoxidase-derived chlorinating oxidants: Second-order rate constants and implications for biological damage. *Free Radical Biology & Medicine*, v.84, p. 279-288

CARROLL, L.; PATTISON, DI.; FU, S.; SCHIESSER, CH.; DAVIES, MJ.; HAWKINS, CL. 2017. Catalytic oxidant scavenging by selenium-containing compounds: Reduction of selenoxides and N-chloramines by thiols and redox enzymes. *Redox Biology*, v. 12, p. 872-882.

CLARK, R. & KUPPER, T. 2005. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 125, p. 629–637, 225–232.

COHEN, BL. 1984. Anomalous behavior of tellurium abundances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 48, p. 203–205.

COMASSETO, JV. Selenium and tellurium chemistry: Historical Background. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 2027-2031.

CONRAD, M.; SCHICK, J.; ANGELI, JPF. 2013. Glutathione and thioredoxin dependent systems in neurodegenerative disease: What can be learned from reverse genetics in mice. *Neurochemistry International*, v. 62, p. 738-749.

CUNHA, RL.; GOUVEA, IE.; JULIANO, L. 2009. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 81, p. 393–407.

DAVIES MJ.; HAWKINS CL.; PATTISON DI.; REES MD. 2008. Mammalian heme peroxidases. From molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants Redox Signaling*, v. 10, p. 1199–1234.

DAVIES, M. 2011. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 48, n. 1, p. 8-19.

DINAUER, MC. 2014. Disorders of neutrophil function: an overview. *Methods in Molecular Biology*, v. 1124, p. 501-515.

DOMIGAN NM, CHARLTON TS, DUNCAN MW, WINTERBOURN CC, AND KETTLE AJ. 1995. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 16542–16558.

DUNFORD, HB. 2010. *Peroxidases and catalases*, 2 nd ed. New York: Wiley-VCH.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2014. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal*, v.12, p. 3846-3867.

EISERICH, JP.; HRISTOVA, M.; CROSS, CE.; JONES, AD.; FREEMAN, BA.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET A. 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, v. 391, p. 393–397.

EUM, SY.; KONG, JH.; HONG, MS.; LEE, YJ.; KIM, JH.; HWANG, SH.; CHO, SN.; VIA, LE. & BARRY, CE. 2010. Neutrophils Are the Predominant Infected Phagocytic Cells in the Airways of Patients With Active Pulmonary TB. *CHEST Journal*, v. 137, p. 122-128.

FARRELL, AJ., BLAKE, DR.; PALMER, RM.; MONCADA, S. 1992. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Annals of Rheumatic Diseases*, v. 51, p. 1219–1222.

FLEMING, A & YOUNG, MY. 1940. The inhibitory action of potassium tellurite on coliform bacteria. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, v.51, p. 29–35.

FLEMING, A (1932) On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. Incorporating a method of demonstrating some bacterial antagonisms. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 35, p. 831–842.

FOMENKO, DE.; NOVOSELOV, SV.; NATARAJAN, SK.; LEE, BC.; KOC, A.; CARLSON, BA.; LEE, TH.; KIM, HY.; HATFIELD, DL.; GLADYSHEV, VN. 2009. MsrB1 (methionine-R-sulfoxide reductase 1) knock-out mice: Roles of MsrB1 in redox regulation and identification of a novel selenoprotein form. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 5986–5993.

GASTON, B.; REILLY, J.; DRAZEN, JM.; FACKLER, J.; RAMDEV, P.; ARNELLE, D.; MULLINS, ME.; SUGARBAKER, DJ.; CHEE, C.; SINGEL, DJ.; LOSCALZO, J.; STAMLER, JS. 1993. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Archives of Proceedings of the national Academy* v, 90, p. 10957–1096.

GAUT JP, BYUN J, TRAN HD, LAUBER WM, CARROLL JA, HOTCHKISS RS, BELAAOUAJ A, AND HEINECKE JW. 2002. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 109, p. 1311–1319.

GUÉANT, J.; FROMONOT, J.; GUÉANT-RODRIGUEZ, R.; LACOLLEY, P.; GUIEU, R.; REGNAULT, V. 2020. Blood Myeloperoxidase-DNA, a biomarker of early response to SARS-CoV-2 infection? *Allergy*. doi:10.1111/all.14533

GUILLIN, OM.; VINDRY, C.; OHLMANN, T.; CHAVATTE, L. 2019. Selenium, Selenoproteins and Viral Infection. *Nutrients*, v.11, p. 2101. <https://doi.org/10.3390/nu11092101>

GROSS, M.; STANCIU, E., KENIGSBUCH-SREDNI, D.; SREDNI, B.; PINHASOV, A. 2017. The immunomodulatory tellurium compound ammonium trichloro (dioxoethylene-O,O') tellurate reduces anxiety-like behavior and corticosterone levels of submissive mice. *Behavioural Pharmacology*, v. 28, p. 458–465.

HAZEN, SL.; HSU, FF.; MUELLER, DM.; CROWLEY, JR.; HEINECKE, JW. 1996. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 98, p. 1283–1289.

HAZEN, SL.; ZHANG, R.; SHEN, Z.; WU, W.; PODREZ, EA.; MACPHERSON, JC.; SCHMITT, D.; MITRA, SN.; MUKHOPADHYAY, C.; CHEN, Y.; COHEN, PA.; HOFF HF e ABU-SOUD, HM. 1999. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation in vivo. *Circulation Research*, v. 85, p. 950–958.

HAMPTON, MB.; KETTLE, AJ.; WINTERBOURN, CC. 1998. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood Journal*, v. 92, n. 9, p. 3007-3017.

HERIN, GA.; DU, S.; AIZENMAN, E. 2001. The neuroprotective agent ebselen modifies NMDA receptor function via the redox modulatory site. *Journal of Neurochemistry*, v. 78, p. 1307–1314.

HESLOP, CL.; JIRI, J.; FROHLICH, JJ.; HILL, JS. 2010. Myeloperoxidase and C-Reactive Protein Have Combined Utility for Long-Term Prediction of Cardiovascular Mortality After Coronary Angiography. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 55, p. 1102-1109.

HOLMGREN, A & LU, J. 2010. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 396 p.120–124. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.083

JANEWAY, CA.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Principles of innate and adaptive immunity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>

JESSE, CR.; WILHELM, EA.; NOGUEIRA, CW. 2010. Depression-like behavior and mechanical allodynia are reduced by bis selenide treatment in mice with chronic constriction injury: a comparison with fluoxetine, amitriptyline, and bupropion, *Psychopharmacology*, v. 212, p. 513–522. doi:10.1007/s00213-010-1977-6

JUKES, TH. 1983 Selenium, an “essential poison. *Journal of Applied Biochemistry*, v. 5, p. 233–234.

KANG, JI J & NEIDIGH, JW. 2008. Hypochlorous acid damages histone proteins forming 3-chlorotyrosine and 3,5-dichlorotyrosine. *Chemical Research in Toxicology*, v. 21, p. 1028– 1038.

KANZOK, SM.; FECHNER, A.; BAUER, H.; ULSCHMID, JK.; MÜLLER, HM.; BOTELLA-MUNOZ, J.; SCHNEUWLY, S.; SCHIRMER, R.; BECKER, K. 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, v. 291, p. 643–646.

KAPLAN, MJ & RADIC M. 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology*, v.189, p.2689-2695.

KANSKI, J.; DRAKE, M.; AKSENOVA, L.; ENGMAN, DA. 2001. Butterfield, Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(*N,N*-dimethylamino) Benzenetellurenyl propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures, *Brain Research*, v. 911, p. 12–21. doi: org/10.1016/S0006-8993(01)02541-0

KETTLE, AJ. 1996. Neutrophils convert tyrosyl residues in albumin to chlorotyrosine. *FEBS Letters*, v. 379, p.103–106.

KIRSCH, M.; KORTH, HG.; SUSTMANN, R.; GROOT H. 2002. The pathobiochemistry of nitrogen dioxide. *Biological Chemistry*, v. 383, p. 389– 399.

KLEBANOFF, S.J. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, n. 5, p. 598-625.

KUNDU, JK & SURH, YJ. 2012. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 52, p. 2013–2037.

LANCASTER JR. 2006. Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chemical Research in Toxicology*, v. 19, p. 1160–1174.

LEE, BC.; DIKIY, A.; KIM, HY.; GLADYSHEV, VN. 2009. Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et biophysica acta*, v, 1790, p. 1471–1477.

LEE, S, KIM, SM, LEE, RT. 2011. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidant & Redox Signaling*. V.18, n.1^o, p. 1165-1207.

LEWANDOWSKI, EC. 2006. Update on Cardiac Biomarkers. *American Society for Clinical Pathology*, v.37, n.10, p.598-605.

LIN, ZH.; LEE, CH.; CHANG, HY.; CHANG, HT. 2012. Antibacterial activities of tellurium nanomaterials. *Chemistry Asian Journal*, v.7, p. 930–934.

LU, J & HOLMGREN, A. 2009. Selenoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v.284, p. 723–727.

LU, J & HOLMGREN, A. 2013. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology & medicine*, v. 66, p. 75-87.

LUCHESE, C.; PRIGOL, M.; DUARTE, MMMF.; NOGUEIRA, CW. 2012. Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. *V*, 61, p. 1117–1124. doi:10.1007/s00011-012-0504-0

LUCHESE, C.; BARTH, A.; DA COSTA, GP.; ALVES, D; NOVO, DLR; MESKO, MF; WILHELM, EA. 2019 . Role of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline as an anti-aging drug fighting oxidative damage in different tissues of aged rats. *Experimental Gerontology* –. doi:10.1016/j.exger.2019.110804

MACFARQUHAR, JK.; BROUSSARD, DL.; MELSTROM, P.; HUTCHINSON, R.; WOLKIN, A.; MARTIN, C.; BURK, RF.; DUNN, JR.; GREEN, AL.; HAMMOND, R.; SCHAFFNER, W & JONES, TF. 2010. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Archives of internal medicine*, v. 170, p. 256–261.

MAIORINO, FM.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANNA, KD.; ROVERI., A; SCHOMBURGL, D.; FLOHÉ, L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*, v. 252, p.38-48.

MALLE, E.; BUCH, T.; GRONE, HJ. 2003. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney International*, v. 64. p. 1956-1967.

MARGIS, R.; DUDAND, C.; TEIXEIRA, FK.; PINHEIRO, MM. 2008. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, v. 275, p. 3959–3970.

MARTINI, F.; ROSA, SG; KLANN, IP; FULCO, BCW; CARVALHO, FB; RAHMEIER, FL; FERNANDES, MC; NOGUEIRA, CW. 2018. A multifunctional compound ebselen reverses memory impairment, apoptosis and oxidative stress in a mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatric Research*.. doi:10.1016/j.jpsychires.2018.11.021

MARTÍN-MONTES, Á.; PLANO, D.; MARTÍN-ESCOLANO, R.; ALCOLEA V.; DÍAZ M, PÉREZ-SILANES, S.; ESPUELAS, S.; MORENO, E.; MARÍN, C.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, RSANMARTÍN, C.; SÁNCHEZ-MORENO, M. 2017. Library of seleno-compounds as novel agents against *Leishmania* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi: org/10.1128/AAC.02546-16

MAYADAS, TN.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. 2013. The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology*, v. 9, p.181-218.

MEDZHITOV, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p.428-435.

MEOTTI, FC.; JAMESON, GNL.; TURNER, R.; HARWOOD, DT.; STOCKWELL, S.; REES, MD.; KETTLE, AJ. 2011. Urate as a Physiological Substrate for Myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286(15), p. 12901–12911.

MEOTTI, F.; STANGHERLIN, E.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.; ROCHA, J. 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environmental Research*, v. 94,p. 276–282.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; IANEWAY CA, JR. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v. 388, p. 394-397.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, MR.; TRAN, K.; REDDY, SP AND MALIK, AB. 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 20, p. 1127-1167.

MOCATTA, TJ.; PILBROWL, AP.; CAMERON, VA.; SENTHILMOHAN, R.; FRAMPTON, CM.; RICHARDS, AM.; WINTEBOURN, CC. 2007. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 49, n. 20, p. 1993-2000.

MOSOLYGÓ, T.; KINCSES, A.; CSONKA, A.; TÖNKI, ÁS.; WITEK, K.; SANMARTÍN, C.; SPENGLER, G. 2019. Selenocompounds as Novel Antibacterial Agents and Bacterial Efflux Pump Inhibitors. *Molecules*, v. 24, p. 1487-1500.

MOSTERT V. 2000. Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 376, p. 433-438.

NAKAMURA, Y.; FENG, O. KUMAGAI, T.; TORIKAI, K.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T.; NOGUCHI, N.; NIKI, E.; UCHIDA, K. 2002. Ebselen, a Glutathione Peroxidase Mimetic Seleno-organic Compound, as a Multifunctional Antioxidant. Implication for inflammation-associated carcinogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 2687-2694.

NAUSEEF, WM. 2014. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cellular Microbiology*, v. 16, p. 1146-1155.

NDREPEPA, G.; BRAUN, J.; MEHILLI, N.; VON BECKERATH, A.; SCHOMIG, A. KASTRATI, A. 2008. Myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes, *European Journal Clinical Investigation*, v. 38, p. 90–96.

NDREPEPA, G. 2019. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.cca.2019.02.022 .

NETTO, LE.; ANTUNES, F. 2016. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Molecules and Cells*, v.39, p. 65-71. doi:10.14348/molcells.2016.2349

NOGUEIRA, CW; QUINHONES, EB; JUNG, EA.; ZENI, G AND. ROCHA, JBT. 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflammation Research*, v. 52, p. 56-63.

NOGUEIRA CW.; ZENI G.; ROCHA JB. 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews*, v. 104, p. 6255–6286. doi: 10.1021/cr0406559.

NOGUCHI, N. 2016. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. *Archives of Biochemistry And Biophysics*, v. 595: p. 109-112.

NUSSBAUM, C.; KLINKE, A.; ADAM, M.; BALDUS, S.; SPERANDIO. 2013. Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and cardiovascular Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 18, p. 692-713.

OGRA, Y.; KOBAYASHI, R.; ISHIWATA, K AND SUZUKI, KT. 2007. Identification of urinary tellurium metabolite in rats administered sodium tellurite, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* , v. 22, p.153–157.

OLDFIELD, JE. 1987. The two faces of selenium. *The Journal of Nutrition*, v. 117, p. 2002–2008.

PALTIAN, JJ.; DOS REIS, AS.; DE OLIVEIRA, RL.; DA FONSECA, CAR.; DOMINGUES, WB.; DELLAGOSTIN, EN.; CAMPOS, VF.; KRUGER, R; ALVES, D; LUCHESE, C; WILHELM, EA. 2020. The anxiolytic effect of a promising quinoline containing selenium with the contribution of the serotonergic and GABAergic pathways: Modulation of parameters associated with anxiety in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 393. doi:10.1016/j.bbr.2020.112797

PARNHAM, MJ & KINDT, S. 1984. A novel biologically active seleno-organic compound-III Effects of pz 51 (ebselen) on glutathione peroxidase and secretory activities of mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology*, v. 33, p. 3247-3250.

PARNHAM, M & GRAF, E. 1991. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Progress in Drug Research*, v. 36, p. 10-47.

PARNHAM, MJ.; LEYCK, S.; GRAF, E.; DOWLING, EJ & BLAKE, DR. 1991. The pharmacology of ebselen. *Agents and Actions*, v. 32, p. 4–9.

PARNHAM, MJ & SIES, H. 2013. The early research and development of ebselen. *Biochemical Pharmacology*, v. 86, p. 1248–1253.

PARNHAM, MJ & SIES H .2000. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischemia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 9, p. 607–619.

PATTISON, DI & DAVIES, MJ. 2001. Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds. *Clinical Research in Toxicology*, v. 14, p. 1453-1464.

PESKIN, AV & WINTERBOURN, CC. 2001. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 30, p.572-579.

PIMENTEL, IAS.; PALADI, CS.; KATZ, S.; JÚDICE, WAS.; CUNHA, RLOR.; BARBIÉRI, CL. 2012. In Vitro and In Vivo Activity of an Organic Tellurium Compound on *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Plos one*, v.7. doi:10.1371/journal.pone.0048780

PINZ, M; REIS, AS.; DUARTE, V; DA ROCHA, MJ.; GOLDANI, BS.; ALVES, D; SAVEGNAGO, L; LUCHESE, C; WILHELM, EA. 2016. 4-phenylselenenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. *European Journal of Pharmacology* –. doi:10.1016/j.ejphar.2016.03.039

PINZ, MP.; VOGT, AG.; DA COSTA RODRIGUES, K.; DOS REIS, AS.; DUARTE, LFB.; FRONZA, MG.; LUCHESE, C. 2021. Effect of a purine derivative containing selenium to improve memory decline and anxiety through modulation of the cholinergic system and Na⁺/K⁺-ATPase in an Alzheimer's disease model. *Metabolic Brain Disease*, v. 36, p. 871–888. doi:10.1007/s11011-021-00703-w

PODREZ, EA.; ABU-SOUD, HM.; HAZEN, SL. 2000. Myeloperoxidase-Generated Oxidants And Atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 28, n.12, p. 1717-1725.

POHANKA, M. 2014; Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 356-364.

PULLAR, JM.; WINTERBOURN, CC.; VISSERS, MC. 1999. Loss of gsh and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *American Journal of Physiology-Regulatory*, v. 277, p. 1505–1512.

PUNTEL RL.; ROOS DH.; SEEGER RL.; ROCHA JBT. 2013. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicology In Vitro*, v. 27, p. 59–70.doi:10.1016/j.tiv.2012.10.011

RADI, R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Archives and Proceedings of the National Academy*, v. 101, p. 4003–4008.

RAMADAN, SE.; RAZAK, AA.; RAGAB, AM AND EL-MELEIGY, M. 1989. Incorporation of tellurium into amino acids and proteins in a tellurium-tolerant fungi, *Biological Trace Element Research.*, v.20, p. 225–232.

REICH, HJ & HONDAL, RJ. 2016 Why nature chose selenium. *ACS Chemical Biology*, v.11, p 821-841.

REIS, AS.; VOGT, AG.; PINZ, MP. ; VOSS, GT. ; DA FONSECA, CAR. ; PALTIAN, JJ. ; PEGLOW, TJ. ; VAUCHER, RA. ; ECHENIQUE, JVZ. ; SOARES, P. ; SCHUMACHER, RF.; PERIN, G ; LUCHESE, C.; WILHELM, EA. 2019. Modulation of COX-2, INF--, glutamatergic and opioid systems contributes to antinociceptive, anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of bis(3-amino-2-pyridine) diselenide. *Chemico-biological interactions*. v. 311, p. 108790.

RUBARTELLI, A.;BAJETTO, A.; ALLAVENA, G.; WOLLMAN, E.;SITIA, R. 1992. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v.267, p. 24161-24164.

SAITO, I; ASANO, T.; SANO, K.; TAKAKURA, K.; ABE, H.; YOSHIMOTO, T.; KIKUCHI, H.; OHTA, T.; ISHIBASHI, S. 1998. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological. *Neurosurgery*, v. 42, p. 277-278.

SCHMITT, D.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; COLLES, SM, WU, W.; SALOMON, RG.; CHEN Y, CHISOLM GM E HAZEN SL. 1999. Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry*, v. 38, p. 16904–16915.

SCHREIBER, A.; ROUSSELLE, A.; BECKER, JU.; VON MASSENHAUSEN, A.; LINKERMANN, A.; KETTRITZ, R. 2017. Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.114, p. E9618–E9625.

SCHROEDER, HÁ.; BUCKMAN, J.; BALASSA, JJ. 1967. Abnormal trace elements in man: tellurium. *Journal of Chronic Diseases*, v. 20, p.147–161.

SHAKIBAIE, M.; ADELI-SARDOU, M, MOHAMMADI-KHORSAND T, ZEYDABADINEJAD M.; AMIRAFZALI E.; AMIRPOUR-ROSTAMI S.; AMERI A.; FOROOTANFAR, H. 2017. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Biologically Synthesized Tellurium Nanorods; A Preliminary In vitro Study. *Iranian Journal of Biotechnology*, v 15, p. 268-276.

SHAMBERGER, R.J. 1983. *Biochemistry of Selenium*. New York: Plenum Press.
SECHTER, Y; BURSTEIN, Y & PATCHORNIK, A. 1975. Selective oxidation of methionine residues in proteins, *Biochemistry*, v.14, p. 4497-503.

SHAMBERGER, R.J. 1983. Selenium and health. In *Trace elements in health: A review of current issues* (Rose, J., Ed.) p. 167–181, Elsevier, London.

SHCHEDRINA, VA.; ZHANG,Y.; LABUNSKYY, VM. 2010. Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins. *Antioxidants Redox Signaling*, v. 12, p.839–849

SKAFF, O.; PATTISON, DI.; MORGAN, PE.; BACHANA, R.; JAIN, VK.; PRIYADARSINI, K. I.; DAVIES, M. J. 2012. Selenium-containing amino acids are major targets for myeloperoxidase-derived hypothiocyanous acid: Determination of absolute rate constants and implications for biological damage. *Biochemistry Journal*, v. 441, p. 305-316

SMITH SM, MIN J, GANESH T, DIEBOLD B, KAWAHARA T, ZHU Y, MCCOY J, SUN A, SNYDER JP, FU H, DU Y, LEWIS I, LAMBETH JD. 2012. Ebselen and congeners inhibit NADPH oxidase 2-dependent superoxide generation by interrupting the binding of regulatory subunits. *Chemico Biological*, v. 22, p. 752-63. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.04.015.

SNIDER, GW.; RUGGLES, EL.; KHAN, N AND HONDAL, RJ. 2013. Selenocysteine confers resistance to inactivation by oxidation in thioredoxin reductase: Comparison of selenium and sulfur enzymes. *Biochemistry*, v. 52, p. 5472–5481.

SREDNI, B. 2012. Immunomodulating tellurium compounds as anticancer agents. *Seminars in Cancer Biology*, v. 22, p. 60–69. doi:10.1016/j.semcancer.2011.12.003

SREEKUMAR, PG.; HINTON, DR & KANNAN, R. 2011. Methionine sulfoxide reductase A: Structure, function and role in ocular pathology. *World journal of biological chemistry*, v. 2, p. 184–192. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v2.i8.184>

STADTMAN, TC.; DAVIS, JN. 1991. Glycine Reductase Protein-C - Properties and Characterization of Its Role in the Reductive Cleavage of Se-Carboxymethyl-Selenoprotein-A. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 22147- 22153.

STARK, J. 2015. Oxidative stress and atherosclerosis. *Orvosi Hetilap*, v. 156, p. 1115-1119.

STEINBRENNER, H & SIES, H. 2009. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1790, p. 1478-1485.

STORKEY, C.; PATTISON, DI.; WHITE, JM.; SCHIESSER, CH.; DAVIES, M J. 2012. Preventing protein oxidation with sugars: Scavenging of hypohalous acids by 5-selenopyranose and 4- selenofuranose derivatives. *Chemical Research in Toxicology*, v. 25, p. 2589-2599.

STORKEY, C.; DAVIES, MJ.; PATTISON, DI. 2014. Reevaluation of the rate constants for the reaction of hypochlorous acid (HOCl) with cysteine, methionine, and peptide derivatives using a new competition kinetic approach. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 73, p. 60-66.

STORKEY, C.; PATTISON, DI.; IGNASIAK, MT.; SCHIESSER, CH.; DAVIES, M. J.2015. Kinetics of reaction of peroxyxynitrite with selenium- and sulfur-containing compounds: Absolute rate constants and assessment of biological significance. *Free Free Radical Biology & Medicine*, V.89, p. 1049- 1056.

TAKEBE, G.; YARIMIZU, J.; SAITO, Y; HAYASHI,T.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; NAGASAWA, S.; TAKAHASHI, K. 2002. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 43, p. 41254-41258.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.; TEW, K. 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 57, p. 134–144.

TAYLOR, A. 1996. Biochemistry of tellurium. *Biological Trace Element Research*, v. 55, p. 231–239.

THANNICKAL, VJ & FANBURG BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 279, p.L1005–L1028.

THOMAS, EL.; GRISHAM, MB.; JEFFERSON, MM. 1986. Preparation and characterization of chloramines. *Methods in Enzymology*, v. 132, p. 569-585.

TENG, TS.; J, AL.; J, XY.; L, YZ. 2017. Neutrophil and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *Journal of Immunology Research*, v. 2017, p. 1-14.

THOMAS, EL; GRISHAM, MB & JEFFERSON, MM. 1986. Cytotoxicity of chloramines. *Methods in Enzymology*, v.132, p. 585–593.

THOMAS, J.; Z. DONG, Z.; DEHAEN, W.; SMET, M. 2012. Selenium/Tellurium-Containing Hyperbranched Polymers: Effect of Molecular Weight and Degree of Branching on Glutathione Peroxidase-Like Activity. *Macromolecular Rapid Communications*, v. 33, p. 2127-2132. doi: 10.1002/marc.201200519

TRAULSEN, H.; STEINBRENNER, H.; BUCHCZYK, D. P.; KLOTZ, L. O.; SIES, H. 2004. Seleno protein P protects low-density lipoprotein against oxidation. *Free Radical Research*, v. 38, n. 2, p. 123-128.

TRINDADE, C.; JUCHEM, A.; GUECHEVA, TN.,; DE OLIVEIRA, IM.; DOS SANTOS SILVEIRA, P.; VARGAS, JE.; PUGA, R.; PESSOA, CÔ AND HENRIQUES, J. 2019. Diphenyl Ditelluride: Redox-Modulating and Antiproliferative Properties. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2019. doi: 10.1155/2019/2510936

TROFAST, J. 2011. Berzelius' Discovery of Selenium. *Chemistry International*, v. 33, p. 16–19.

UEDA, T.; SAKAMAKI, K.; KUROKI, T.; YANO, I e NAGATA, S. 1997. Molecular cloning and characterization of the chromosomal gene for human lactoperoxidase. *European Journal of Biochemistry* v. 243, p. 32–41.

UNSAI, C.; ORAN, M.; ALBAYRAK, Y.; AKTAS, C.; ERBOGA, M.; TOPCU, B.; UYGUR, R.; TULUBAS, F.; YANARTAS, O.; ATES, O.; OZEN, OA. 2013. Neuroprotective effect of ebselen against intracerebroventricular streptozotocin-induced neuronal apoptosis and oxidative stress in rats. *Toxicology and Industrial Health*, v. 32, p. 730–740. doi:10.1177/0748233713509429

URSINI, F.; MAIORINO, M.; ROVERI, A. 1997. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme? *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 10, p. 327–332

VERAS, FP.; PONTELLI, M.; SILVA, C.; TOLLER-KAWAHISA, J, et al. 2020. SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps (NETs) mediate COVID-19 pathology. medRxiv preprint. Doi: doi.org/10.1101/2020.06.08.20125823

VRIES, MA.; ALIPOUR, A.; BIRNIE, E.; WESTZAAN, A.; VAN SANTEN, S; VAN DER ZWAN, E; LIEM, AH; VAN DER MEULEN, N; CABEZAS, MC. 2016. Coronary leukocyte activation in relation to progression of coronary artery disease. *Frontiers of Medicine*, v. 10, p. 85-90.

WANG, Q.; SUN, LC.; LIU, YQ.; LU, J.; HAN, F.; HUANG, Z. 2016. The Synergistic Effect of Serine with Selenocompounds on the Expression of SelP and GPx in HepG2 Cells. *Biological trace element research*, v. 173, p. 291-296.

WINTERBOURN, CC.; VISSERS, MCM.; KETTLE, AJ. 2000a. Myeloperoxidase. *Current Opinion in Hematology*, v. 7, p. 53-58.

WINTERBOURN, CC & KETTLE, AJ. 2000b. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29, p. 403-409.

WINTERBOURN, CC. 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*, p. 223–227.

WINTERBOURN, CC. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, v. 4, n. 5, p. 278-286.

WINTERBOURN, CC.; KETTLE, AJ.; HAMPTON, MB. 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual Review Biochemistry*, v. 14, n. 21, p. 15.1-15.28.

WINTERBOURN, CC.; KETTLE, AJ.; HAMPTON, MB. 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual Review Biochemistry*, v. 14, n. 21, p. 15.1-15.28.

WONG, ND.; GRANSAR H.; NARULA, J, et al. 2009. Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events. *JAAC: Cardiovascular imaging Journal*, v. 2, n. 9, p. 1093-1099.

YOSSIPOF, TE.; BAZAK, ZR.; KENIGSBUCH-SREDNI, D.; CASPI, RR.; KALECHMAN, Y AND SREDNI, B. 2019. Tellurium Compounds Prevent and Reverse Type-1 Diabetes in NOD Mice by Modulating $\alpha 4\beta 7$ Integrin Activity, IL-1 β , and T Regulatory Cells. *Frontiers in Immunology*, v. 10. doi:10.3389/fimmu.2019.00979

WOOD, Z. A; SCHRÖDER, E; HARRIS, E. J; POOLE, L. B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical Science*, 28(1), p. 32–40. doi:10.1016/s0968-0004(02)00003-8

ZARE, B.; SEPEHRIZADEH, Z.; FARAMARZI, MA.; SOLTANY-REZAEI-RAD, M.; REZAEI S, SHAHVERDI, AR. (2014) Antifungal activity of biogenic tellurium nanoparticles against *Candida albicans* and its effects on squalene monooxygenase gene expression. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 61, p. 395–400.

ZARE, B.; FARAMARZI, MA.; SEPEHRIZADEH Z.; SHAKIBAIE, M.; REZAEI, S.; SHAHVERDI, AR. 2012. Biosynthesis and recovery of rod-shaped tellurium nanoparticles and their bactericidal activities. *Materials Research Bulletin*, v. 47, p. 3719–3725. doi:10.1016/j.materresbull.2012.06.034

ZARE, B & NAMI, M. 2017. Tracing Tellurium and Its Nanostructures in Biology. *Biological Trace Element Research*, v. 180, p. 171-181. doi: 10.1007/s12011-017-1006-2.

ZAWROTNIAK, M & RAPALA-KOZIK, M. 2013. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta biochimica Polonica*, v. 60, p. 277-284.

ZENG, H. 2009. Selenium as an essential micronutrient: roles in cell cycle and apoptosis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 14, p. 1263–1278.

ZHANG, R.; BRENNAN, ML.; FU, X.; AVILES, RJ.; PEARCE, GL.; PENN, EJ.; TOPOL DL.; SPRECHER.; HAZEN, L. 2001. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease, v. 286, p. 2136–2142.

ZHANG, J.; WANG, X.; VIKASH, V.; YE, Q.; WU, D.; LIU, Y.; DONG, W. 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, v. 2016, 18p. doi:10.1155/2016/4350965

ZHAO, R.; MASAYASU, H.; HOLMGREN, A. 2002. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 8579–8584.

ZUO, Y.; YALAVARTHI, S.; SHI, H, et al. 2020. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight.*; v. 5, 11 p :e138999. doi:10.1172/jci.insight.138999

PERKINS A, NELSON KJ, PARSONAGE D, POOLE LB, AND KARPLUS PA. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci* 40: 435–445, 2015.

NAKAMURA T, KADO Y, YAMAGUCHI T, MATSUMURA H, ISHIKAWA K, AND INOUE T. Crystal structure of peroxiredoxin from *Aeropyrum pernix* K1 complexed with its substrate, hydrogen peroxide. *J Biochem* 147: 109–115, 2010.

3.2 CAPÍTULO 02: ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA “CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS”

Atenuação da inflamação induzida pela carragenina em camundongos por um novo disseleneto através da inibição da quimiotaxia de neutrófilos

A novel diselenide attenuates the carrageenan-induced inflammation in mice by inhibiting neutrophil chemotaxis

Tássia Liz Araújo dos Santos Lessa^a, Thiago Macêdo Lopes Correia^b, Talita Costa dos Santos^b, Railmara Pereira da Silva ^c, Beatriz Pereira Silva^c, Maria Magalhães Escavallini^d, Albert Souza Peixoto^e, William Festuccia^e, Thiago Mattar^d, Regiane Yatsuda^{f,b}, Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão^{f,c}, Alcindo Aparecido dos Santos^c, Flávia Carla Meotti^c, Raphael Ferreira Queiroz^{a,g*}

^aPrograma Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil; ^bPrograma de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil; ^cInstituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ^dDepartamento de farmacologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil; ^eInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ^fInstituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil; ^gDepartamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil

*Autor correspondente: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz, Departamento de Ciências Naturais, Estrada do Bem Querere, km 4, Caixa Postal 95, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, CEP 45031-900, Vitória da Conquista, Brasil. E-mail: rfqueiroz@uesb.edu.br

Link Guia ao Autor: <https://www.elsevier.com/journals/chemico-biological-interactions/0009-2797?generatepdf=true>

Resumo

Neste trabalho, investigamos o efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* de um novo disseleneto, o composto 2, previamente selecionado por uma triagem *in vitro*. O composto reagiu rapidamente com HOCl ($9,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) similarmente à glutationa ($1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), e reduziu a formação de HOCl por neutrófilos ativados ($4,6 \mu\text{M}$) e na enzima purificada ($3,8 \mu\text{M}$), sendo que a tirosina, um substrato de MPO-I e II, não restaurou os níveis de HOCl. Curiosamente, o disseleneto inibiu o *burst* oxidativo em células dHL-60 (consumo de O_2 , produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), sem evidência de toxicidade celular até $25 \mu\text{M}$ por 48 h. *In vivo*, a carragenina aumentou a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos, e o composto 2 (25, 50 e 75 mg/kg , i.p.) reduziu a quimiotaxia de leucócitos totais e neutrófilos, além de atenuar todos os índices empregados para monitorar a inflamação (atividade de MPO, peroxidação lipídica, exsudação de albumina, níveis de nitrito, TNF- α e IL-1 β). Da mesma forma, o disseleneto (50 mg/kg , i.p.) diminuiu o edema da pata após injeção subplantar de carragenina em camundongos ao longo de 5 h. As análises histológica e imuno-histológica das patas inflamadas mostraram uma redução considerável na contagem de neutrófilos, área de edema e marcação para MPO, proteínas carbonilada e nitradas. Em seguida, comprovamos que o disseleneto ($10 \mu\text{M}$) inibiu diretamente a migração de neutrófilos humanos em resposta ao fMLP em aproximadamente 75% utilizando a câmara de Boyden. Por último, o disseleneto não exibiu toxicidade no ensaio de toxicidade de dose única (50 mg/kg , i.p.) ao longo de 15 dias e no bioensaio da *Artemia salina* ($0,05$ - 2 mM). Por fim, a predição toxicológica *in silico* sugeriu nenhuma toxicidade ao composto. Estes dados demonstraram que o novo disseleneto atenuou a inflamação induzida por carragenina principalmente por reduzir a migração de neutrófilos e os danos resultantes da MPO.

Palavras-chave: selênio, inflamação, explosão oxidativa, quimiotaxia de neutrófilos, mieloperoxidase, ácido hipocloroso

Abstract

Here we investigated the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of a new diselenide, compound 2, previously selected by an *in vitro* screening. The compound rapidly reacted with HOCl ($k=9.2\times 10^7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) similarly to glutathione ($k=1.2\times 10^8\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$). It also reduced the HOCl formation by activated human neutrophils (4.6 μM) and in the purified enzyme (3.8 μM), but tyrosine, a MPO-I and II substrate, did not restore the HOCl levels. Interestingly, the diselenide inhibited the oxidative burst of differentiated HL-60 cells (O_2 consumption, $\text{O}_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 production) in a concentration-dependent manner with no evidence of cell toxicity (up to 25 μM for 48 h). *In vivo*, carrageenan increased leukocyte migration into peritoneal cavity of mice, and the compound (25, 50 and 75 mg/kg, i.p.) reduced both total leukocyte and neutrophil numbers beyond attenuating all the indexes employed to monitor inflammation in peritoneal fluid (MPO activity, lipid peroxidation, albumin exudation, nitrite, TNF- α and IL-1 β levels). Likewise, the diselenide (50 mg/kg, i.p.) decreased the paw edema after carrageenan-subplantar injection in mice over 5 h. Histological and immunohistological analysis from the inflamed paws showed a reduction in neutrophil counting, edema area, and marking for MPO, protein carbonyl and 3-nitrotyrosine. In addition, the diselenide (10 μM) inhibited the fMLP-dependent migration of human neutrophils by using Boyden chamber assay. Lastly, the diselenide did not exhibit toxicity according to the single dose (50 mg/kg, i.p.) toxicity study over 15 days and the brine shrimp (0.05-2 mM) bioassay. Indeed, *in silico* toxicological analysis predicted no hazard related to this molecule. Taken together, these data demonstrated that the novel diselenide attenuated carrageenan-induced inflammation mainly by reducing neutrophil migration and the resulting oxidative burst-mediated damage.

Keywords: selenium, inflammation, oxidative burst, neutrophil chemotaxis, myeloperoxidase, hypochlorous acid

1. Introdução

Os neutrófilos desempenham papel crucial na inflamação, pois respondem rapidamente aos estímulos quimiotáticos e constituem a principal população celular na resposta inflamatória aguda [1,2]. No sítio inflamatório, o complexo multimérico da NADPH oxidase em neutrófilos se ativa e o oxigênio molecular é reduzido ao ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) às custas dos elétrons da NADPH [3]. Por sua vez, $O_2^{\bullet-}$ se dismuta espontaneamente, ou mediado pela enzima superóxido dismutase, ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A mieloperoxidase (MPO) é responsável por amplificar o potencial oxidativo do H_2O_2 [4].

MPO é a enzima mais abundante em neutrófilos e, portanto, suas reações são consideradas as mais importantes no contexto da inflamação aguda. A enzima catalisa a reação entre peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons haleto (Cl^- , Br^-) ou pseudo-haleto (CSN^-), através do intermediário MPO-I (MPO- $Fe^{4+}=O^{\bullet+}$), para formar seus respectivos ácidos de halogênio (HOCl, HOBr, HOSCN), no chamado ciclo clorinante [4–6]. No ciclo peroxidásico, a MPO-I retorna à MPO nativa por dois passos de um elétron, através da MPO-II (MPO- $Fe^{4+}=O$), oxidando diversos substratos endógenos (AH_2) aos respectivos radicais livres ($\bullet AH$) [4–6].

HOCl é considerado o principal oxidante produzido por neutrófilos sob condições fisiológicas. Ele desempenha *in vivo* um papel fundamental na defesa imune inata, causando a morte de patógenos [5,7]. Entretanto, devido sua reatividade, HOCl também reage com um grupo extenso de biomoléculas do hospedeiro através de reações de oxidação e cloração. As modificações pelo HOCl foram extensivamente estudadas em proteínas celulares e extracelulares, incluindo lipoproteínas e lipídeos de membrana [8–10]. Assim, quando a taxa de modificação dessas biomoléculas é extensa, em decorrência da produção excessiva do HOCl e/ou menor remoção/reparo do dano, doenças podem se instalar [11–16]. Desse modo, os efeitos deletérios dos oxidantes às células são minimizados por sistemas antioxidantes endógenos, enzimáticos (SOD, CAT, GPx, Trx, Prx, etc) e não enzimáticos (GSH, vitamina A, C e E, etc) [17,18].

A suplementação com moléculas antioxidantes pode ser um estratégia promissora para a redução dos danos oxidativos subjacentes à inflamação [19]. Desde a descoberta de que o selênio é fundamental para a atividade catalítica de enzimas antioxidantes, o desenvolvimento de moléculas com propriedade farmacológica a partir de calcogênios têm atraído considerável atenção [20–22]. De fato, selenocompostos são excelentes candidatos à antioxidantes devido a maior nucleofilicidade em relação ao enxofre [23,24].

Selênio é um micronutriente essencial para a homeostase celular em animais [20,23] e seus efeitos biológicos decorrem da defesa antioxidante endógena, atuando como *scavengers* de radicais e oxidantes, ou através da modulação de processos redox [25–27]. O Ebselen, um selenocomposto mimético da GPx, possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias *in vivo* bem definidas [28–31], além de reagir com $O_2^{\bullet-}$ e inibir a NADPH oxidase [32,33], lipoxigenase e óxido nítrico sintase [34]. Tanto o Ebselen quanta outras moléculas contendo selênio, a exemplo dos selenois, selenetos e disselenídeos, reagem rapidamente com diferentes hidroperóxidos similarmente aos análogos contendo enxofre [28,35–39].

Recentemente, nossos colaboradores demonstraram que o selenodiglicolato reagiu com HOCl na ordem de $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [40], como também inibiu a síntese de HOCl por neutrófilos de cultura [37]. Além disso, outros selenocompostos foram descritos como anti-inflamatórios em diferentes modelos de inflamação [27,39,41,42]. Diante do exposto, selenocompostos são candidatos em potencial à antioxidantes e/ou anti-inflamatórios e, por esse motivo, este trabalho objetivou avaliar o efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* de novas moléculas contendo selênio.

2. Material e métodos

2.1. Materiais e reagentes

Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, fosfato monopotássico, peróxido de hidrogênio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, azul de tripan, citocromo C, taurina, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), Histopaques 1077 e 1119, MPO (M6908), catalase de fígado bovino (C9322) e Carragenina tipo I (C1013) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os meios de cultura Middlebrook 7H9 e 7H10 foram obtidos

da Interlab. HOCl foi obtido a partir de preparação comercial de água sanitária (ZAB[®]), e a concentração determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{290\text{nm}} = 3,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). PBS glicose (10 mM, pH 7,4) continha fosfato dibásico de sódio (10 mM), fosfato monopotássico (2 mM), cloreto de sódio (137 mM), cloreto de cálcio (1 mM), cloreto de magnésio (0,5 mM) e glicose anidra (1%). Os meios de cultura, solução salina e tampões foram esterilizados por autoclavagem, exceto a solução de glicose que foi filtrada a 0,22 μm (Millipore) e adicionada ao PBS glicose previamente autoclavado.

Os compostos de selênio foram sintetizados pelo Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, e gentilmente cedido para a pesquisa. As moléculas são inéditas e estão sob pedido de patente e, por esse motivo, os nomes químicos ainda não podem ser divulgados. Neste trabalho, as moléculas foram referidas de 1 a 38.

2.2. Ensaio *in vitro*

2.2.1 Reação das moléculas com HOCl *in vitro*

Os 38 compostos (50 μM) foram incubados em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4, contendo taurina (15 mM) e DTPA (0,1 mM). HOCl (50 μM) foi adicionado à mistura reacional e, após 5 min, a concentração de taurina cloramina residual foi determinada pelo método do TNB. O meio reacional foi diluído 5 vezes em uma solução de TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, 70 μM) ($\text{OD}_{412\text{nm}} = 0,5$) e a absorbância foi medida a 412 nm após 5 min. A concentração residual de HOCl (μM) foi calculada pela fórmula: $[(\text{controle negativo} - \text{controle positivo}) \times \text{fator de diluição} \times 10^6] / \epsilon$, sendo o controle negativo a absorbância do meio reacional sem HOCl, e o controle positivo a absorbância do meio reacional com HOCl, o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $2,82 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e fator de diluição de 5 [29,30].

Como controle, um estoque de taurina-cloramina (15 mM) foi preparado pela reação da taurina (15 mM) com HOCl (15 mM) em tampão fosfato pH 7,4 por 5 min. Em seguida, taurina cloramina (50 μM) foi incubada com os compostos (50 μM) em tampão fosfato (50 mM), por 5 min à 37 °C, seguido pela determinação da taurina cloramina residual pelo método do TNB, conforme acima.

2.2.2 Cinética da reação entre HOCl e selenocompostos

HOCl (50 μM) foi incubado com taurina (15 mM) na ausência ($\text{rendimento}_{\text{max}}$) ou presença ($\text{rendimento}_{\text{scavenger}}$) de diferentes concentrações (2-50 μM) das moléculas 2, 14 e 34 em 300 μL de tampão fosfato (50 mM), pH 7,4. A oxidação do TNB foi quantificada conforme acima. O gráfico [τ -HOCl]. $\text{Rend}_{\text{max}}/\text{Rend}_{\text{scavenger}}$ *versus* as concentrações dos compostos foi construído, no qual a constante da reação entre o HOCl e o respectivo composto ($k_{\text{scavenger}}$) foi obtida pela multiplicação da tangente da reta pelo valor de $k_{\tau\text{-HOCl}}$ ($4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [31,32]. Glutathione (2-25 μM) foi utilizada como controle para garantir a eficiência do método.

2.2.3 Isolamento de neutrófilos do sangue humano periférico

As amostras de sangue humano foram obtidas de doadores voluntários ($28,5 \pm 2,5$ anos), de ambos os sexos, saudáveis, não fumantes, através de punção venosa periférica por protocolos submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, sob parecer CAAE 46135315.4.0000.0055, como parte de um projeto maior. O isolamento de granulócitos foi realizado como descrito por English & Andersen [33] com adaptações, no qual o sangue foi inicialmente coletado em tubos plásticos estéreis contendo heparina sódica e homogeneizado por inversão. Em seguida, 2 mL de Histopaque 1077 foi cuidadosamente vertido em 3 mL de Histopaque 1119 em um tubo cônico estéril de 15 mL, em temperatura ambiente, seguido da adição de 4 mL do sangue coletado. Após centrifugação a 700 $\times g$ (Fanem 206-LB, São Paulo - Brasil) por 30 min à temperatura ambiente, o material sobrenadante foi descartado e a camada de granulócitos, localizada entre os dois gradientes, aspirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, lavada com 10 mL de salina estéril (0,9%) e novamente centrifugada a 300 $\times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o infranadante foi submetido à hemólise hipotônica, pela adição de 5 mL de água destilada gelada, para eliminar quaisquer resquícios de eritrócitos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 300 $\times g$ por 10 min, o sobrenadante descartado e o infranadante ressuspenso em 2 mL de tampão PBS glicose. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer (Sigma-Aldrich, MA, EUA) e a viabilidade celular confirmada pelo método de exclusão por azul de tripan a 0,2%. Para o ensaio de quimiotaxia as

amostras de sangue foram coletadas por punção venosa, subsequentemente foram centrifugadas a 450 xg por 6 minutos a temperatura ambiente. As hemácias obtidas foram lisadas com tampão de lise pH 7,2 (NH₄Cl 0,15M) e, novamente, centrifugadas a 450 xg por 6 minutos a temperatura ambiente. As células obtidas foram então ressuspendidas em 2 ml de solução balanceada de Hanks (pH 7,4) e colocadas sobre gradiente de Percoll (72% e 65%). Após centrifugação (500 xg, 30 minutos a 4°C), os neutrófilos foram coletados entre os gradientes de 72% e 65%, lavados em solução balanceada de Hanks e ressuspendidos em Hanks BSA 2% contendo cálcio. [34].

2.2.3.1 Avaliação da atividade clorinante em neutrófilos humanos

Os neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com os compostos 02, 14 e 34 (10 µM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,4, e taurina (15 mM). Após 30 min da ativação com PMA (acetato de forbol miristato, 100 ng/mL) a 37 °C, a reação foi centrifugada a 300g por 10 min, e cessada pela adição de catalase (100 µg/mL) e diluída 5 vezes em TNB (70 µM). A formação de taurina cloramina foi quantificada espectrofotometricamente a 412 nm, conforme descrito anteriormente [29,30]. Os compostos 2, 14 e 34 (2 a 25 µM), por reduzirem em mais de 50% a formação de taurina cloramina na triagem, tiveram os valores de IC₅₀ determinados pela construção de uma curva concentração-resposta com ajuste dos dados numa equação hiperbólica retangular.

No intuito de verificar a reversibilidade da inibição, tirosina (25 e 100 µM) foi adicionada ao sistema acima contendo o composto 2 (25µM) previamente a ativação dos neutrófilos com PMA. A taurina cloramina foi determinada conforme acima.

2.2.3.2 Ensaio de quimiotaxia *in vitro*

O ensaio de migração *in vitro* foi realizado em câmara de quimiotaxia conforme previamente descrito por Boyden [35] e modificada por Zigmond e Hirsch [36]. Para avaliar o efeito dos compostos sobre a migração de neutrófilos humanos, 50 µL de suspensão celular contendo 1×10^6 neutrófilos por mL (em solução de Hanks contendo BSA 2%) pré-incubadas separadamente com Hanks contendo o composto 2 (10 µM) por 30 min sob atmosfera úmida a 37 °C and CO₂ (5%) foram adicionadas ao compartimento superior da câmara sobre

membrana de policarbonato com diâmetro médio de poro de 5 μm (NeuroProbe). Nos compartimentos inferiores da câmara foram adicionados 25 μl de Hanks (controle negativo) e Hanks contendo fMLP (Do inglês *n-Formil – Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*) (10^{-5} M), como controle positivo. O sistema foi incubado sob atmosfera úmida a 37 °C and CO_2 (5%) e, após 1 h, a membrana foi removida e corada com corante panótico. A distância percorrida pelos neutrófilos no interior dos filtros foi determinada em microscópio óptico conforme previamente descrito por Zigmond e Hirsch [36]. O ensaio foi realizado em triplicata e 5 campos de cada poço foram avaliados.

2.2.4 Atividade clorinante de mieloperoxidase *in vitro*

Os compostos 2, 14 e 34 (2 a 25 μM) foram incubados em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4, contendo MPO (15 nM por heme), NaCl (100 mM), taurina (15 mM), DTPA (0,1 mM). As reações foram iniciadas pela adição de H_2O_2 (50 μM), incubadas por 20 min a 37 °C e cessadas pela adição de catalase (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após diluição do meio reacional por 5 vezes em TNB (70 μM), a formação de taurina cloramina foi quantificada espectrofotometricamente a 412 nm, conforme acima [29,30]. O IC_{50} foi determinado pela construção de uma curva concentração-resposta com ajuste dos dados numa equação hiperbólica retangular.

2.2.5 Cultivo e diferenciação de HL-60

As células promielócíticas humanas (HL-60) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (Duque de Caxias, RJ, Brazil) foram mantidas no meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB, 20%), estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e penicilina (100 U/mL) em atmosfera úmida à 37 °C com 5% de CO_2 . HL-60 foi diferenciada em neutrófilos (*dHL-60*) pela adição de dimetilsulfóxido (1,3%) ao mesmo meio, mas suplementado com SFB (10%). As células foram mantidas por 4 dias em atmosfera úmida a 37 °C com 5% de CO_2 para diferenciação. Após centrifugação a 400 xg por 10 min, as células foram lavadas duas vezes com solução salina estéril a 0,9% e ressuspensas em PBS glicose.

2.2.5.1 Formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela *dHL-60*

As *dHL-60* (1×10^6 células por poço) foram incubadas com taurina (15 mM) e citocromo C (40 μ M) na ausência e presença dos compostos 2, 14 e 34 (2 a 25 μ M), em 300 μ L de PBS glicose à 37 °C. As células foram ativadas com PMA (100 ng/mL), e homogeneizadas. $O_2^{\bullet-}$ foi quantificado pela redução do citocromo C a 550 nm ($\epsilon_{550nm} = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [37].

2.2.5.2 Formação de $O_2^{\bullet-}$ pela *dHL-60* Consumo de O_2 por *dHL-60*

dHL-60 (1×10^6 células por poço) foram incubadas como o composto 2 (10 e 25 μ M) na ausência e presença de PMA em PBS glicose à 37 °C. O consumo de O_2 foi monitorado usando um oxígrafo (Oroboros), sob agitação constante de 250 rpm.

2.2.5.3 Formação de H_2O_2 por *dHL-60*

As *dHL-60* (1×10^6 células por poço) foram incubadas com taurina (15 mM), Amplex Red (50 μ M) e HRP (*horseradish peroxidase*, 10 μ M) na ausência e presença das moléculas 2, 14 e 34 (2 a 25 μ M) em 300 μ L de PBS glicose à 37 °C. As células foram ativadas com PMA (100 ng/mL). A formação do H_2O_2 foi quantificada pela formação da resorufina a 550 nm por 30 min ($\epsilon_{550nm} = 5,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [37].

2.2.5.4 Formação de HOCl por *dHL-60*

As *dHL-60* (1×10^6 células por poço) foram incubadas com taurina (15 mM) na ausência e presença do composto 2 (2 a 25 μ M) em 300 μ L de PBS glicose à 37 °C. As células foram ativadas com PMA (100 ng/mL). As células foram então centrifugadas a 400 $\times g$ por 10 min e reação foi cessada pela adição de catalase (100 μ g/mL) e diluída 5 vezes em TNB (70 μ M). A formação de taurina cloramina foi quantificada espectrofotometricamente a 412 nm, conforme acima [29,30].

2.2.5.5 Viabilidade Celular

As *dHL-60* (2×10^6 células por poço) foram incubadas na presença e ausência de diferentes concentrações dos compostos 2, 14 e 34 (2 a 25 μ M) ou estaurosporina (STP) (1 μ M, controle positivo de morte [38]) em placas de 12 poços contendo 1 mL de PBS glicose. Após 48 h a 37 °C, as células foram

centrifugadas a 400 xg por 10 min, e ressuspensas em tampão PBS glicose contendo 10 µL iodeto de propídio (PI) por 15 min. O citômetro de fluxo da BD Biosciences (FacsVersi) (San Jose, CA, USA) foi utilizado para obter as medidas das células marcadas com iodeto de propídio sob excitação de 488 nm e emissão de 620 nm. Esse corante se internaliza apenas em células com membrana danificada, intercalando-se no DNA e RNA e corando-as de vermelho [39].

Após triagem celular, o composto 2 (2 a 25 µM) foi incubado com neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6$ células/mL) em PBS glicose, pH 7,4 por 1 h a 37 °C. Após centrifugação a 112 xg por 5 min, a atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada espectrofotometricamente no sobrenadante celular, conforme recomendações do fabricante (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Triton X-100 (0,1%) foi utilizado como controle de morte celular.

2.3. Ensaios *in vivo*

2.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 (25-30g), oito semanas de idade, adquiridos da Anilab (Paulinia, São Paulo) e acondicionados no biotério do Instituto Multidisciplinar de Saúde da Universidade Federal da Bahia por 21 dias para ambientação, os quais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 h e condições livres de patógeno, controle de temperatura ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) e livre acesso à água e ração padrão comercial (Pragsoluções, São Paulo). Todos os animais utilizados foram aclimatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. A intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos. Os experimentos foram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovada pela Comissão Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia, sob parecer de número 078/2019.

2.3.2 Inflamação peritoneal induzida pela carragenina

Os camundongos C57BL/6 (n=6 por grupo) receberam o composto 2 (25, 50 e 75 mg/kg), salina (0,9%) ou veículo (DMSO, 25 µL) via intraperitoneal (i.p.)

30 min antes da administração i.p. da carragenina tipo I (500 µg/200 µL por 20 g peso camundongo). Os animais foram sacrificados após 4 h da injeção de carragenina por deslocamento cervical e o lavado peritoneal foi realizado com 3 mL de PBS adicionado de EDTA (1%) [40]. As amostras foram mantidas em gelo, a fim de evitar lise celular, e utilizadas para os ensaios posteriores.

2.3.2.1 Contagem de leucócitos totais e neutrófilos no lavado peritoneal

A contagem total de leucócitos foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, enquanto a contagem diferencial foi realizada pelo preparo de esfregaços citocentrifugados à 4500g por 7 min a 25 °C (Presvac CT-12, Brasil) antes das contagem em microscópio óptico sob aumento de 1000x [40]. Um total de 100 células por lâmina foi contado por dois analisadores independentes, baseados nos critérios morfológicos padrões. O lavado peritoneal remanescente foi então centrifugado a 1500g por 10 min a 4 °C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha), e o sobrenadante acondicionado em ultrafreezer a -80 °C para as dosagens bioquímicas.

2.3.2.2 Dosagem de albumina no lavado peritoneal

A concentração de albumina do sobrenadante do lavado peritoneal foi determinada através do kit de dosagem de albumina da Labtest, conforme recomendações do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

2.3.2.3 Dosagem de nitrito no lavado peritoneal

O nitrito do LBA foi quantificado pelo método de Griess [41]. O sobrenadante do lavado (50 µL) foi incubado com 50 µL de solução de naftiletlenodiamina (0,1%) e 50 µL de solução de sulfanilamida (1%) por 10 min a 25 °C. A absorbância foi então determinada a 540 nm e interpolada numa curva padrão de nitrito (1,65 a 100 µM).

2.3.2.4 Avaliação da atividade peroxidásica da MPO

O ensaio da atividade peroxidásica com o 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) foi realizado como descrito anteriormente [42,43]. Resumidamente, 10 µL do sobrenadante do lavado peritoneal foi misturado com 110 µL da solução trabalho contendo TMB (2,9 mM dissolvido em dimetilsulfóxido 14%, preparado

em tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 5,4) e 80 μL de H_2O_2 (0,75 mM) foi adicionado para iniciar a reação. A oxidação do TMB foi acompanhada a cada 30 s em 450 nm (Thermoplate, Tp-reader, EUA) por 5 min a 25 °C ($\epsilon_{450 \text{ nm}} = 5,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade peroxidásica da MPO foi confirmada pela adição do ácido 4-aminobenzóico hidrazida (ABAH) (50 μM), inibidor da enzima [29,44], ao meio reacional contendo o sobrenadante do lavado dos camundongos administrados com carragenina, 5 min antes da adição da solução de TMB. Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg proteína), onde uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μmol de TMB oxidado por min a 25 °C.

2.3.2.5 Quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica do sobrenadante do lavado peritoneal dos animais foi estimada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances* - TBARS) [45]. O sobrenadante do lavado peritoneal (100 μL), adicionado de 100 μL de ácido tricloroacético (10%) e 800 μL de ácido tiobarbitúrico (0,53%, dissolvido em ácido acético a 20%) foram incubados por 1 h a 95 °C, seguido do resfriamento em gelo por 10 min a fim de cessar a reação. As amostras foram novamente centrifugadas a 1600g por 10 min a 4 °C, e a absorbância do sobrenadante foi obtida a 535 nm (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). A concentração de TBARS no lavado peritoneal foi calculada com base na curva de malondialdeído (0 a 50 μM), e normalizada pela concentração de proteínas, sendo expressa em mol de equivalentes de MDA/g de proteína.

2.3.2.6 Determinação de citocinas

A concentração de IL-1 β e TNF- α no sobrenadante do lavado peritoneal foi quantificada usando os kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) (DY401-05 e DY410-05, respectivamente) de acordo com as instruções do fabricante (Sistema de R&D), exceto pela incubação das amostras com as microplacas pré-revestidas por 16 h a 4–8 °C. A concentração de citocinas foi expressa como pg/mL.

2.3.3 Edema de pata induzido por carragenina

O edema foi induzido pela administração de 20 μ L de solução de carragenina 1% via intraplantar na superfície ventral da pata traseira direita dos animais (n=6 animais por grupo) [46]. Trinta minutos antes da administração da carragenina os animais foram pré-tratados com o composto 2 (50 mg/kg) ou solvente, DMSO (25 μ L). O volume do edema da pata foi medido com paquímetro antes (tempo 0) e 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 h após a injeção da carragenina. Em cada tempo, três medidas foram realizadas e as médias indicaram o grau do edema expresso em milímetros (mm), como a diferença entre o tamanho da pata entre os tempos inicial e final [46,47]. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com Xilazina (50 mg/kg) e Cetamina (16 mg/kg), seguido por deslocamento cervical. As patas posteriores foram removidas e pesadas em balança analítica [48]. O tecido da pata foi então removido e imerso em uma solução fixadora de Methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante 24 h, seguido pela substituição do fixador por álcool etílico (70%), para as análises histológicas e imuno-histoquímicas. A carcaça foi armazenada a -20 °C para posterior incineração.

2.3.3.1 Análise histológica

O coxim da pata fixado e desidratado foi parafinizado e cortado longitudinalmente em secções de 4 μ m de espessura em micrótomo (Leica RM2125RTS, China). Todos os cortes foram realizados no Laboratório Micro, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. As secções foram desparafinizadas em xilol 3 vezes, por 5 min cada, hidratadas em etanol 100, 95 e 75% por 5, 4 e 1 min, respectivamente, e coradas com hematoxilina e eosina (HE). O infiltrado neutrofilico foi avaliado em 20 campos aleatórios (10 campos aleatórios de 2 secções diferentes) dos tecidos corados, e fotografados com uma câmera digital (Kontron Electronic KS-300, Eching, Germany) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus, Japão), sob aumento de 400x [49]. A quantificação em duplo-cego do número de neutrófilos por campo foi realizada com auxílio do programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

2.3.3.2 Análise imunohistoquímica

Os antígenos das secções histológicas do coxim da pata foram ativados pelo tratamento com tampão citrato após desparafinização e hidratação (SHI et

al., 1993). Resumidamente, as secções imersas em tampão citrato (10 mM), pH 6,0, foram aquecidas em microondas (Consul, Erva Doce, Brasil) na potência máxima (900 W) por 1 min. Em seguida, elas foram mantidas por mais 4 min sob potência média (450 W), e resfriadas em banho de gelo por 20 min. As peroxidases endógenas foram inibidas mediante a incubação das secções com azida sódica (0,1%) e H₂O₂ (0,3%) por 10 min a 25 °C em cuba úmida. As lâminas foram lavadas duas vezes, 5 min cada, com PBST (PBS acrescido de Tween® 20 0,1%) e a ligação inespecífica de imunoglobulinas foi bloqueada pela incubação com solução de soro de cabra (20%) em cuba úmida por 30 min. As secções foram novamente incubadas em cuba úmida com os anticorpos policlonais produzidos em coelho, anti-proteína carbonilada (anti-DNP) (Sigma D9656, diluição 1:100), anti-mieloperoxidase (anti-MPO) (Upstate 0796, diluição 1:50), e anti-3-nitrotirosina (Millipore 06-284, diluição 1:200) *overnight* em geladeira. O excesso do anticorpo primário foi removido por dois ciclos de lavagem com PBST, 5 min cada. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de coelho (Dako E0432, diluição 1:300) por 1 h a 25 °C. Após duas lavagens, 5 min cada, com PBST, o produto da reação foi detectado pela incubação por 30 min com o complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor desenvolvida com *Stable DAB* (Invitrogen, reagente completo com 3,3-diaminobenzidina e H₂O₂) em aproximadamente 2,5 min. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris [50,51]. Ao final, 10 campos aleatórios das secções do coxim da pata foram fotografados com auxílio de uma câmera digital (Kontron Electronic KS-300, Eching, Germany) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus, Japão) sob aumento de 400x. As imunomarcações para DNP [52] e nitrotirosina [53] foram expressas como porcentagem de área marcada/μm², em relação a área total da imagem, enquanto os níveis de MPO foram expressos pela contagem de células positivas [50,54]. Os resultados foram analisados com auxílio do programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

2.3.4 Ensaios de toxicidade

2.3.4.1 Toxicidade sobre larvas de *Artemia salina* Leach

No bioensaio de letalidade foi utilizado a metodologia de Meyer et al. (1982) [55] com algumas modificações. Os ovos de *Artemia salina* Leach

(Miramar®) foram dispostos em um aquário com água do mar artificial [56] preparada com sal marinho (Ocean Water. Alcon), nas concentrações de 3,82 mg/mL de acordo com as orientações do fabricante. O sistema foi aerado e mantidos sobre a luz de 60 W [56]. Após 48 h de incubação em temperatura ambiente (28-30 °C), as larvas foram retiradas para o ensaio [56].

As larvas de *A. salina* (10 larvas/mL) foram incubadas com o composto 2 nas concentrações de 0,05 a 2 mM por 24 h (28-30 °C). A água do mar contendo DMSO (2,5%) foi utilizada como controle negativo, enquanto DMSO a 50% foi empregado para 100% de morte. Após incubação, o número de larvas sobreviventes foi contado com auxílio de uma lupa. As larvas que permaneciam imóveis por 10 s de observação foram consideradas como mortas [56].

2.3.4.2 Toxicidade *in vivo*

Na avaliação da toxicidade *in vivo* [57], o composto 2 (50 mg/kg, i.p.) ou DMSO (25 µL) foi administrado em camundongos machos C57BL/6 (25-30g, 6 meses, n=6). Os animais foram observados durante 15 dias, e sinais de estresse e dor foram avaliados, incluindo perda de peso, quantidade de ração consumida, perda de apetite, perda de pelos, alteração na respiração, vocalização, embotamento, agressividade, arqueamento da coluna, aperto dos olhos, achatamento do focinho e bochechas. O estado de saúde dos animais, consumo alimentar e peso corporal foram monitorados continuamente pelas primeiras quatro horas após administração do composto e uma vez ao dia até o décimo quinto dia [57]. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com Xilazina (50 mg/kg) e Cetamina (16 mg/kg), seguido por deslocamento cervical [48].

2.3.4.3 Estudos *in silico*

Os parâmetros de absorção gastrointestinal, permeabilidade na barreira hematoencefálica e inibição de enzimas hepáticas foram preditos pelo programa Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>)[58] .

O programa ProTox-II (https://tox-new.charite.de/protox_II/index.php) foi utilizado na predição dos parâmetros de toxicidade aguda oral, dose média letal (DL₅₀), hepatotoxicidade, imunotoxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade do composto [59]

2.4 Análises estatísticas

O programa GraphPad Prism foi utilizado para construção dos gráficos e análises estatísticas. Os experimentos foram descritos pela média \pm erro padrão das replicatas independentes, descritas na legenda de cada figura, e analisados por *One-way ANOVA* seguido pelo *pos-test* de Newman-Keuls quando apropriado, sendo atribuída significância às diferenças com $p < 0,05$.

3. Resultados

Inicialmente, 38 compostos de selênio foram triados quanto a capacidade de reagir com HOCl *in vitro* ou inibir a formação de HOCl por neutrófilos humanos ativados nas concentrações de 10 e 50 μM , respectivamente. A concentração de HOCl no sistema foi determinada pelo método da taurina cloramina [29]. Dentre os compostos, o 2, 14 e 34 foram os únicos capazes de reduzir a formação da taurina cloramina em mais de 40% em ambos os ensaios (Tabela Suplementar 1). No ensaio de competição com a taurina (15 mM), demonstramos que esses três compostos reagiram com HOCl com constantes de velocidade de segunda ordem na ordem de 10^7 - $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fig.1), similarmente à reação da glutatona e HOCl [7,28,32].

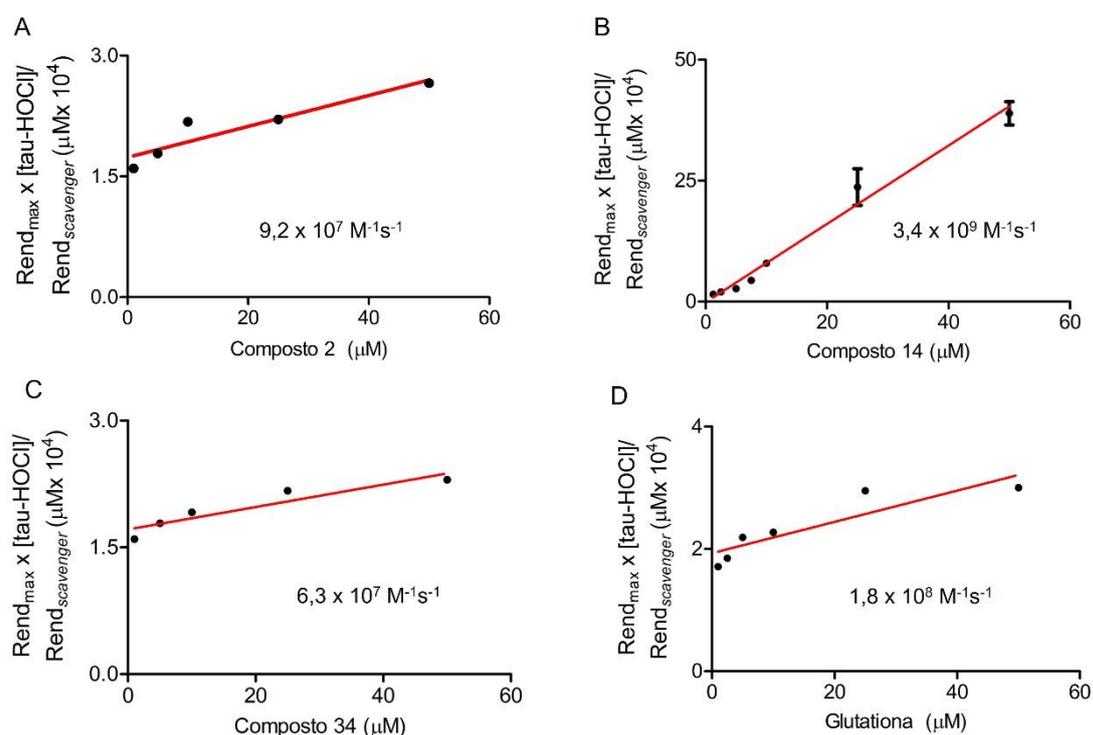


Fig.1. Cinética competitiva da reação entre HOCl com os compostos 2, 14 e 34 e glutathiona. A constante de reação foi calculada pelo ensaio de competição entre taurina (15 mM) e os compostos 2 (A), 14 (B), 34 (C) e Glutathiona (D) pelo HOCl (50 μ M). O produto da reação $\text{Rend}_{\text{max}} \times [\text{tau-HOCl}]/\text{Rend}_{\text{scavenger}}$, onde a concentração do HOCl foi quantificada na ausência (rendimento máximo) e na presença (rendimento da molécula teste), foi plotado contra as diferentes concentrações de cada molécula. A partir do valor do slope (linha vermelha) ($k_{\text{HOCl-molécula testada}}/k_{\text{HOCl-Taurina}}$, sendo a constante de reação do HOCl com taurina $4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) calculou-se a constante de velocidade dos compostos. Os valores mostrados são a média \pm erro padrão de triplicatas de três experimentos independentes.

Quando incubados com neutrófilos humanos em concentrações crescentes, os compostos 2, 14 e 34 inibiram a formação de taurina cloramina com IC_{50} de 4,6, 2,6 e 3,9 μM , respectivamente (Figs. 2A, C e E). A tirosina (25 e 100 μM), potente substrato para a MPO-II [60], reverteu apenas parcialmente a inibição da atividade clorinante de neutrófilos na presença do composto 2 (25 μM) (Fig. 3). Além disso, esses compostos diminuíram a atividade clorinante da MPO purificada, com valores de IC_{50} de 3,8, 4,5 e 4,9 μM para os compostos 2, 14 e 34, respectivamente (Figs. 2B, D e F). Quando taurina cloramina (50 μM) foi incubada com concentração equimolar desses compostos não foi observada reação após 30 min. Em conjunto, esses dados sugerem que os compostos inibem a atividade enzimática da MPO e/ou reagem diretamente com o HOCl formado, mas não com a taurina cloramina. Todavia, seus efeitos como moduladores de vias *upstream* a MPO não podem ser descartados, considerando que tirosina não foi capaz de reverter completamente a inibição da formação de HOCl em neutrófilos.

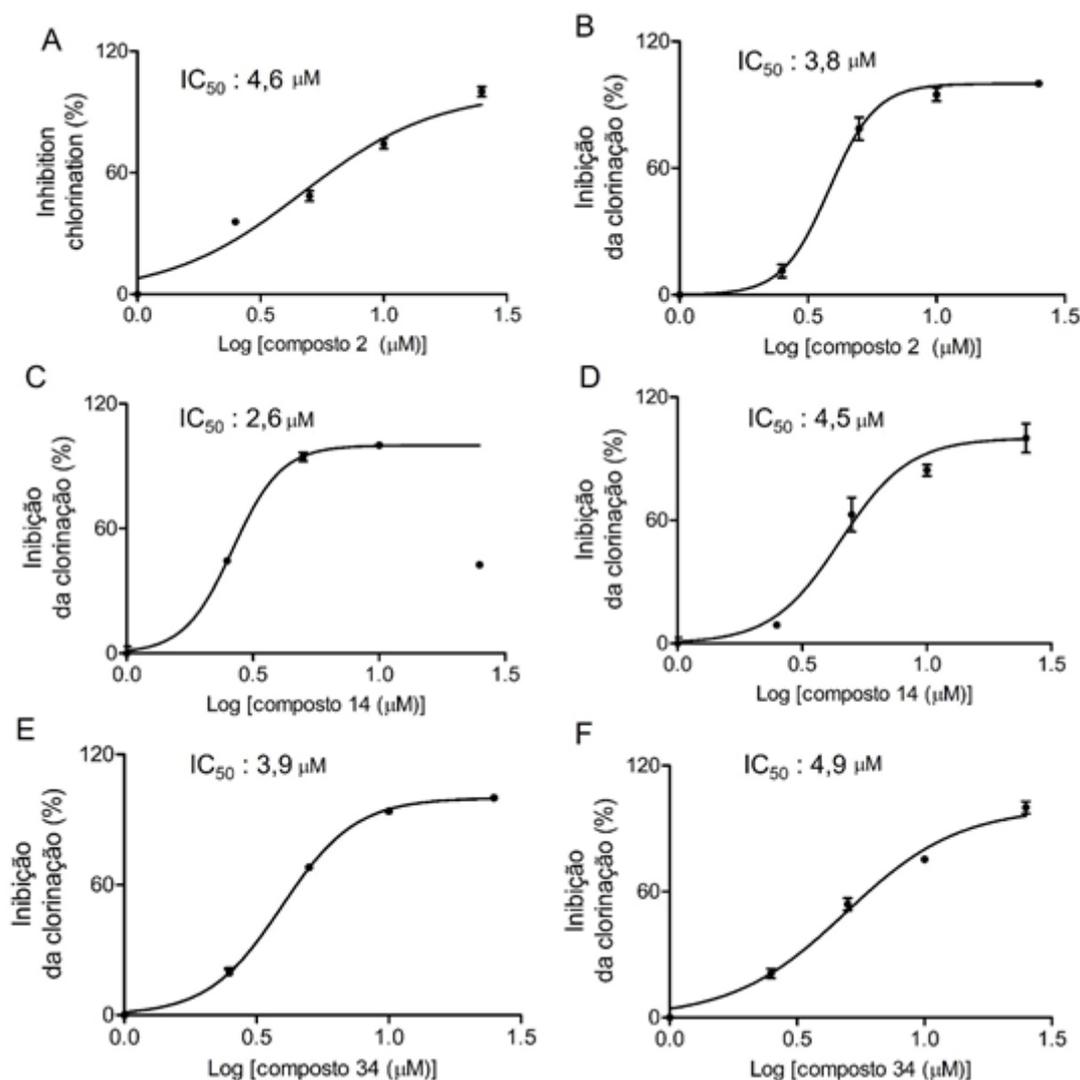


Fig. 2. Inibição da formação de taurina cloramina pelos selenocompostos. Os selenocompostos (2-25 μM) foram incubados em (A), (C), (E) com neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6$ células/mL), taurina (15 mM), em tampão fosfato. Os neutrófilos foram ativados com PMA (acetato de forbol miristato, 100 ng/mL), e em (B) e (D), (F) com MPO (15 nM por heme), NaCl (100 mM), taurina (15 mM) em tampão fosfato, DTPA (0,1 mM). Todas as incubações foram realizadas à 37 °C por 30 minutos. IC₅₀ foi determinado pelo ajuste hiperbólico retangular da curva dose-resposta usando regressão linear. Os valores mostrados são a média \pm erro padrão de triplicatas de três experimentos independentes.

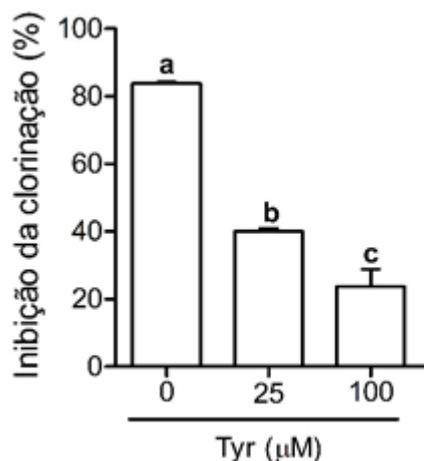


Fig.3. Tirosina reverte parcialmente a inibição da atividade clorinante de neutrófilos pelo composto 2. O composto 2 (25 µM) foi incubado com neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6$ células/mL), taurina (15 mM) em tampão fosfato glicose. Os neutrófilos foram ativados com PMA (acetato de forbol miristato, 100 ng/mL) e incubados por 30 min à 37 °C. A formação de taurina cloramina foi quantificada espectrofotometricamente a 412 nm pelo método da taurina cloramina. Os valores mostrados são a média \pm erro padrão de triplicatas de três experimentos independentes.

Diante dos achados acima, investigamos os efeitos dos compostos 2, 14 e 34 sobre o *burst* oxidativo de dHL-60. Dentre eles, apenas o composto 2 diminuiu a taxa de redução do citocromo C (Fig. 4A). Similarmente, esse composto foi o único que inibiu a taxa de formação de H₂O₂ monitorada pela oxidação do Amplex red pela HRP (Fig. 4B). Após 48 h de incubação, as células permaneceram viáveis em todas as concentrações utilizadas dos compostos 2 e 14 (Figs. 5A e B). Do mesmo modo, no ensaio de toxicidade sobre larvas de *Artemia salina*, apenas o composto 2 não apresentou toxicidade nas concentrações de 0,05 a 2 mM (dado não mostrado). Como controle, os neutrófilos isolados de sangue humano permaneceram viáveis após incubação com o composto 2 por 1 h (Fig. 6). Esses dados corroboram que os efeitos

observados para o composto 2 sobre células de cultura e células primária não decorrem da diminuição de viabilidade.

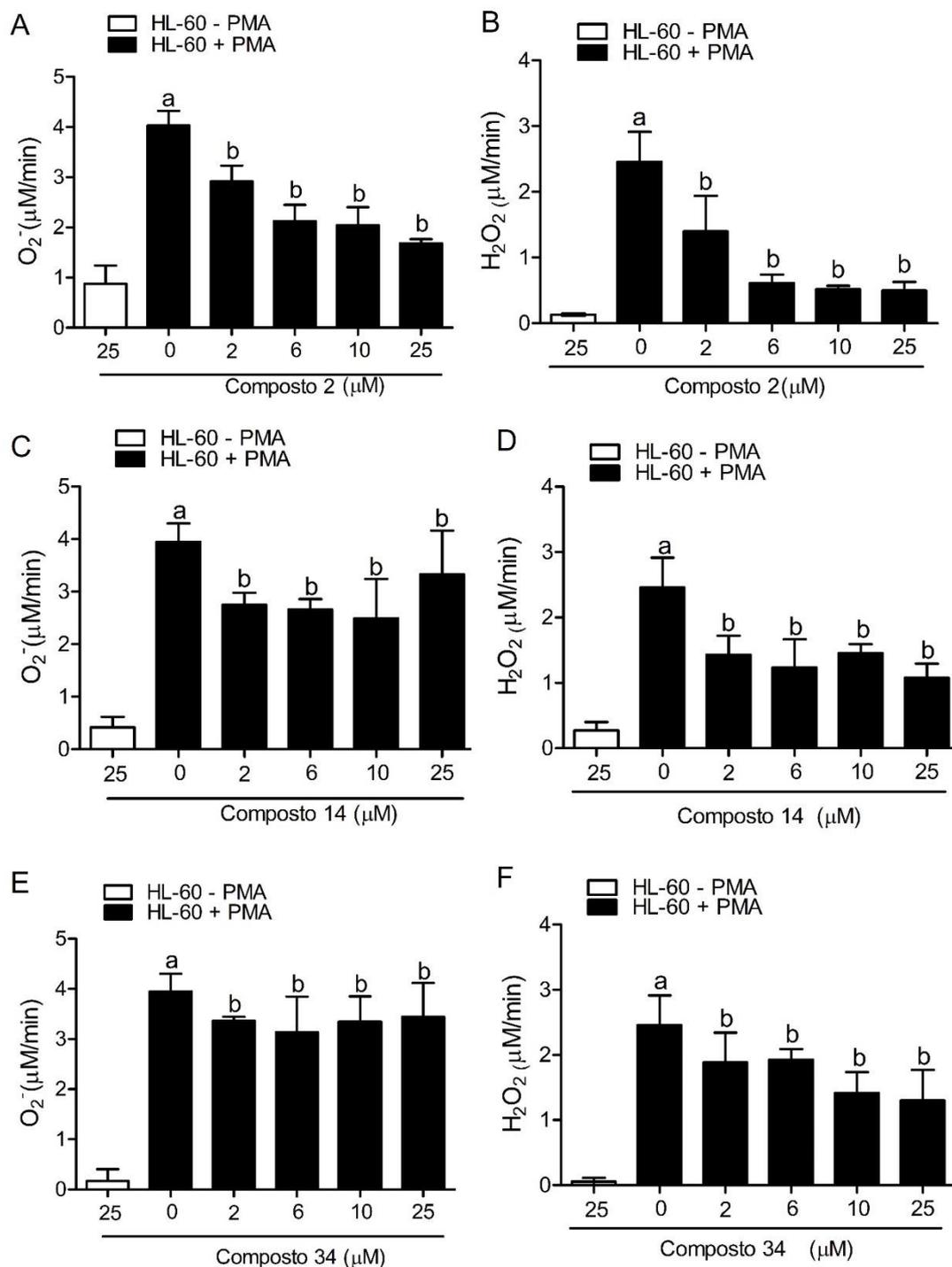


Fig. 4. Efeito dos selenocompostos sobre o *burst* oxidativo em células *dHL-60*. As *dHL-60* ($6,6 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com taurina (15 mM) na ausência e presença dos compostos (2 a 25 μM), em PBS glicose à 37 °C, e

ativadas com PMA (100 ng/mL). Em (A), (C) e (E), $O_2^{\bullet-}$ foi quantificado pela redução do citocromo C (40 μ M). Em (D), (E) e (F) a formação do H_2O_2 foi quantificada pela oxidação do Amplex red na presença de HRP (*horseradish peroxidase*, 10 μ M). Os dados mostrados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, quando comparado com o controle negativo (controle na ausência de PMA) por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. # $p < 0,05$, quando comparado com o controle na presença de PMA e na ausência do composto por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

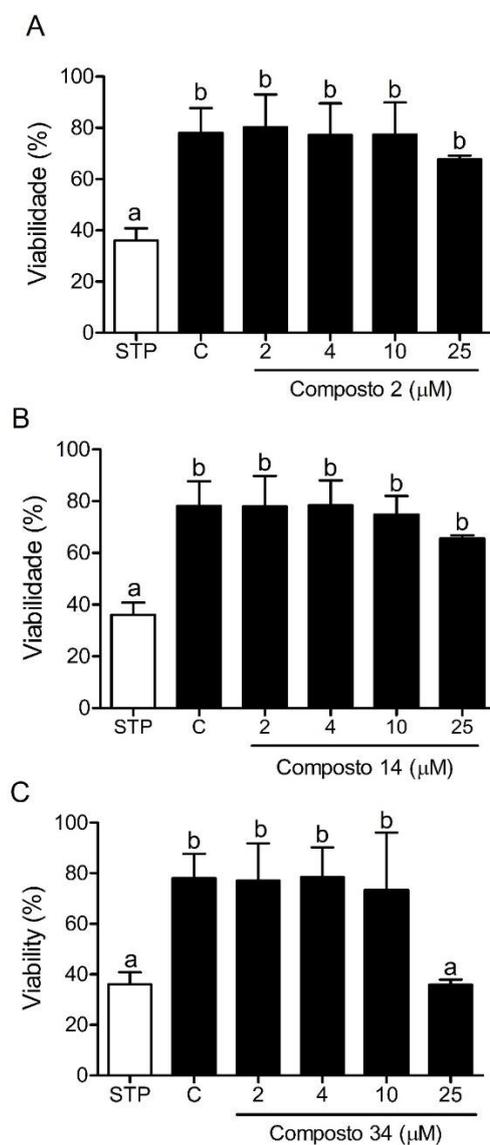


Fig. 5. Viabilidade de *dHL-60* frente aos compostos 2, 14 e 34. A viabilidade celular foi medida usando ensaio de coloração com iodeto de propídio por citometria de fluxo. As *dHL-60* (2×10^6 células/mL) foram incubadas na ausência (Controle, ctrl) e presença de diferentes concentrações dos compostos (2 a 25 μ M) ou estaurosporina (STP) (1 μ M, controle positivo de morte) a 37 °C por 48 h. (A), (B), (C) representa a viabilidade celular dos compostos 02, 14 e 34,

respectivamente. A viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo. Os dados mostrados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, quando comparado com STP por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls

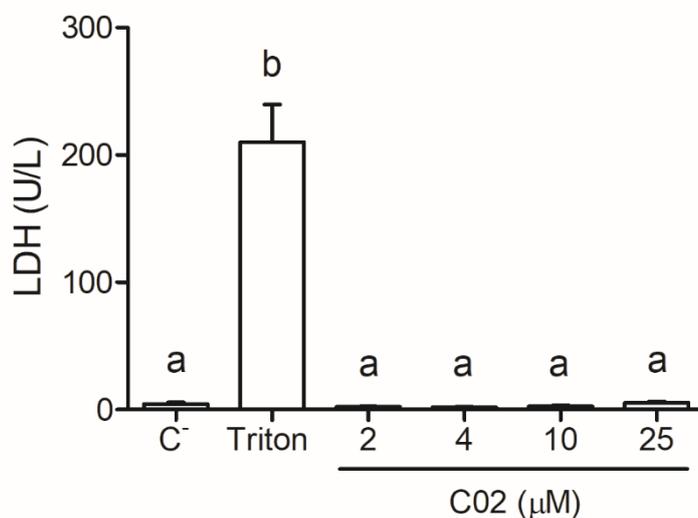


Fig. 6. Viabilidade dos neutrófilos isolados na presença do composto 02. Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com e sem o composto 2 (2-25 μM) em PBS glicose, pH 7,4 por 1 h a 37 °C. A viabilidade celular foi determinada utilizando o kit Lactato desidrogenase (LDH) conforme recomendações do fabricante (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Triton X-100 (0,1 %) foi utilizado como controle de morte celular. Os dados mostrados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, quando comparado com STP por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls

No intuito de confirmar que os efeitos observados em células de cultura são similares aqueles de células primárias avaliamos o efeito do composto 2 (10 e 25 μM) sobre consumo de O_2 por *dHL60* ativadas por PMA (Fig. 7A). Surpreendentemente, a taxa de consumo de O_2 pelas células também diminuiu significativamente nas concentrações testadas. Em seguida, confirmamos que o a inibição na formação de taurina cloramina por *dHL60* na presença do composto 2, embora menos acentuadamente de que em células primárias (Fig. 7B), o que é esperado [61]. Em conjunto, os resultados sugerem que o composto 2 deve

modular negativamente a atividade da NADPH oxidase e, conseqüentemente, reduz os níveis do $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e, por fim, HOCl.

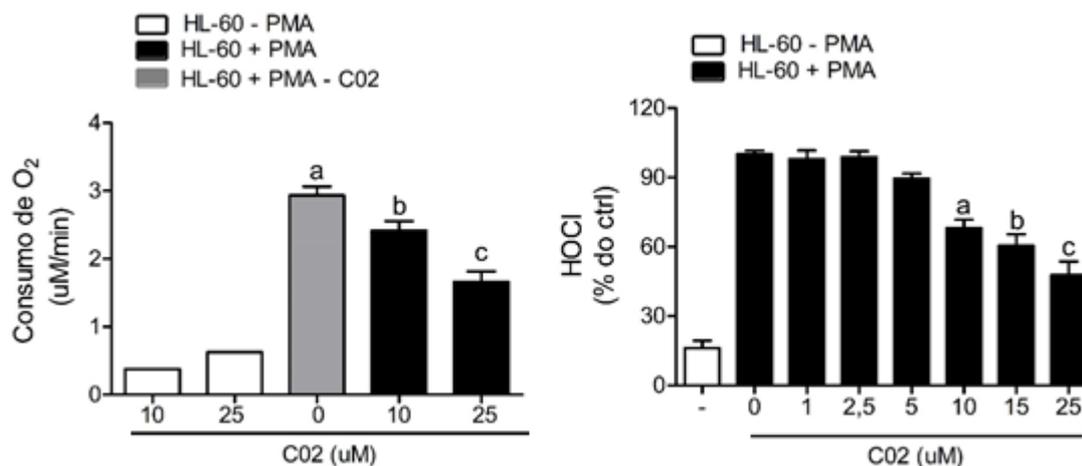


Fig. 7. Efeito do composto 2 sob a formação de HOCl e consumo de O₂. Na formação de HOCl as células dHL-60 ($6,6 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com taurina (15 mM) na ausência (controle = ctrl) e presença dos compostos (1 a 25 μ M), em PBS glicose à 37 °C, e ativadas com PMA (100 ng/mL). A formação de taurina cloramina foi quantificada espectrofotometricamente a 412 nm. Para mensurar o consumo O₂ as células dHL-60 (1×10^6 células/mL) foram incubadas na presença dos compostos (10e 25 μ M), na ausência e presença de PMA em PBS glicose à 37 °C. O consumo de O₂ foi monitorado usando oxígrafo Proboros. Os dados mostrados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, quando comparado com o controle negativo (controle na ausência de PMA) por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. # $p < 0,05$, quando comparado com o controle na presença de PMA e na ausência do composto por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

Considerando os resultados promissores do composto 2, que se trata de um novo disseleneto, selecionamos essa molécula para investigar seus efeitos anti-inflamatórios *in vivo*. Inicialmente, determinamos quais as conseqüências da administração dessa molécula (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) sobre o processo inflamatório subjacente à administração de carragenina (500 μ g/200 μ L por 20 g peso camundongo) no peritônio de camundongos. Conforme esperado [62,63], a peritonite induzida pela carragenina elevou a migração de leucócitos totais e neutrófilos (Figs. 8B e C), a transudação (Fig. 9A), a atividade da MPO (Fig. 9B), as concentrações de produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico e nitrito (Figs. 9C e D). O pré-tratamento dos animais com o composto 2, 30 min antes da administração da carragenina, reduziu significativamente todos os parâmetros

avaliados. Os níveis de albumina (exsudação) e atividade peroxidásica foram reduzidos desde a menor dose testada (25 mg/kg), enquanto o dano oxidativo às proteínas a partir da dose de 50 mg/kg. Além disso, demonstramos que o diseleneto, na concentração de 10 μ M, inibiu a a quimiotaxia de neutrófilos humanos *in vitro* em 74,5% (Fig. 10.), corroborando os efeitos *in vivo*.

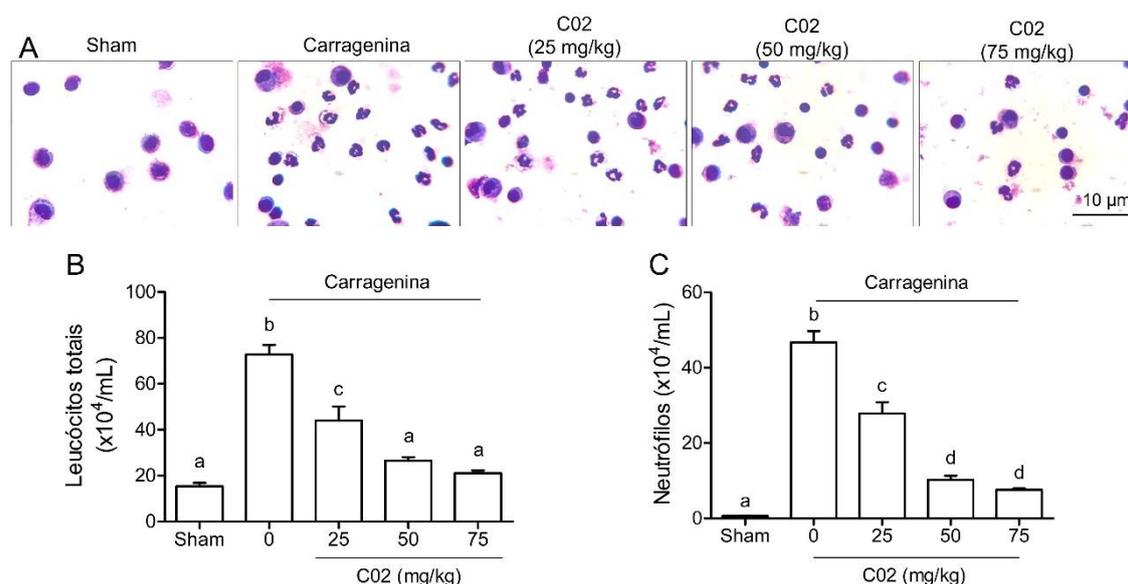


Fig. 8. Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 na peritonite induzida por carragenina. O composto 02 (25, 50 e 75 mg/kg), salina (0,9%, sham) ou veículo (DMSO, 25 μ L) foi administrado nos camundongos i.p 30 min antes da administração i.p. da carragenina (500 μ g/200 μ L por 20 g peso camundongo). Os animais foram sacrificados após 4 horas da injeção de carragenina e o lavado peritoneal foi realizado com 3 mL de PBS adicionado de EDTA. O sobrenadante do lavado foi citocentrifugado e corado com kit Panótico para contagem diferencial dos leucócitos (B) no total de 100 células. Fotomicrografias representativas das células do sobrenadante do lavado dos grupos foram tiradas sob aumento de 400x (A). O número absoluto de neutrófilos (C) no sobrenadante do lavado foi calculado pela multiplicação da quantidade relativa de neutrófilos pelo total de leucócitos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 animais para cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. Letras diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

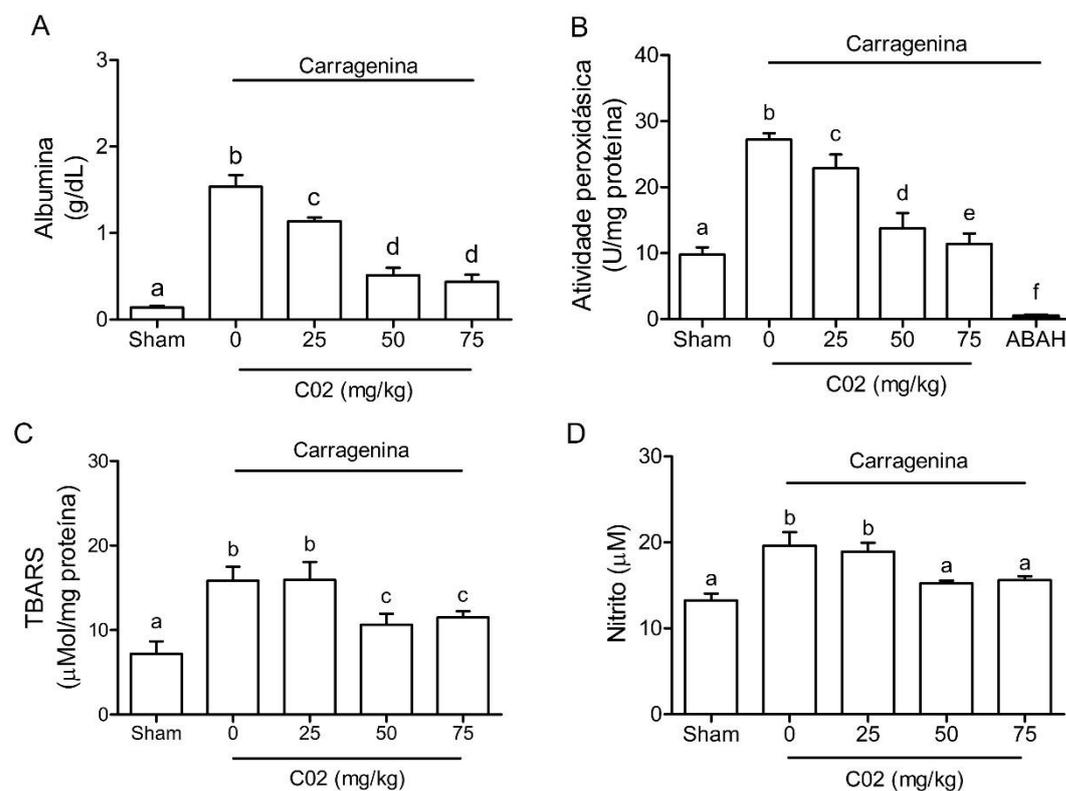


Fig. 9. Inibição da transudação (A), atividade da MPO (B), concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (C) e de nitrito (D) no sobrenadante do lavado peritoneal pelo composto 2. A atividade peroxidásica foi realizada pelo ensaio do TMB e os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg proteína). A concentração de TBARS foi calculada com base na curva feita com o padrão de malondialdeído (MDA) e expressa em mol de equivalentes de MDA/g de proteína. A concentração de albumina do sobrenadante do lavado peritoneal foi determinada através do kit de dosagem de albumina da Labtest e a de nitrito pelo método de Griess. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 animais para cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. Letras diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

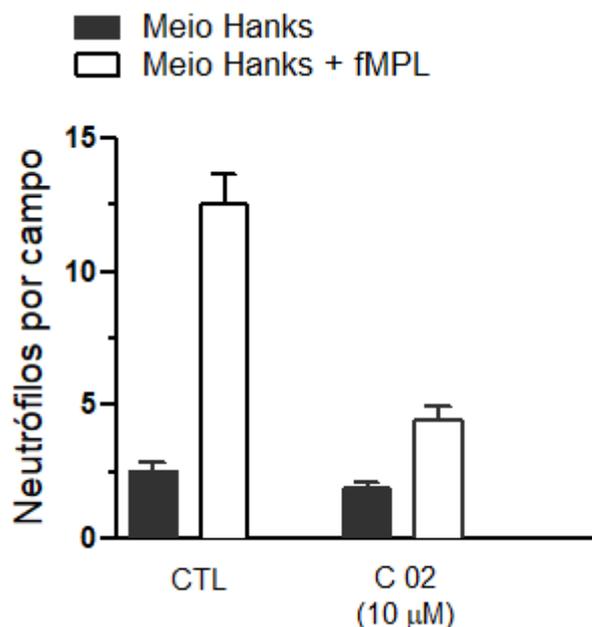


Fig. 10. Quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos de sangue periférico humano (50.000 células por poço) extraídos por gradiente de Percoll, pré-incubados com meio Hanks contendo o composto 2 (10μM) frente a 25μl de meio Hanks e meio Hanks contendo fMPL (10⁻⁵ M). Dados representados em média ± erro padrão da média (EPM). n=1. Análise estatística one way ANOVA e teste t student *P<0,05.

Em paralelo, a administração da carragenina elevou consideravelmente as concentrações de TNF-α e IL-1β no sobrenadante do lavado peritoneal em comparação com o grupo sham (Fig. 11 A e B). Quando os camundongos foram pré-tratados com o disseleneto a 50 mg/kg, os níveis dessas citocinas reduziram significativamente.

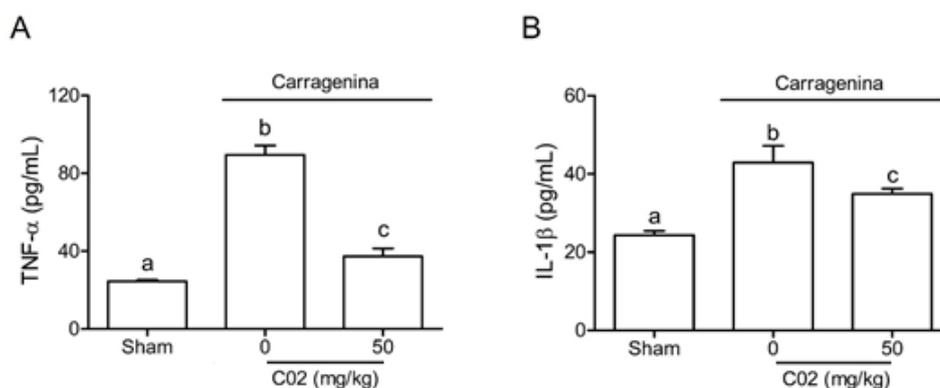


Fig. 11. Diminuição dos níveis das citocinas inflamatórias TNF-α e IL-1β no sobrenadante do lavado peritoneal pelo composto 02. A concentração das citocinas foi quantificada usando os kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo expressa como pg/mL. Os dados

foram expressos como média \pm erro padrão de 6 animais para cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. Letras diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

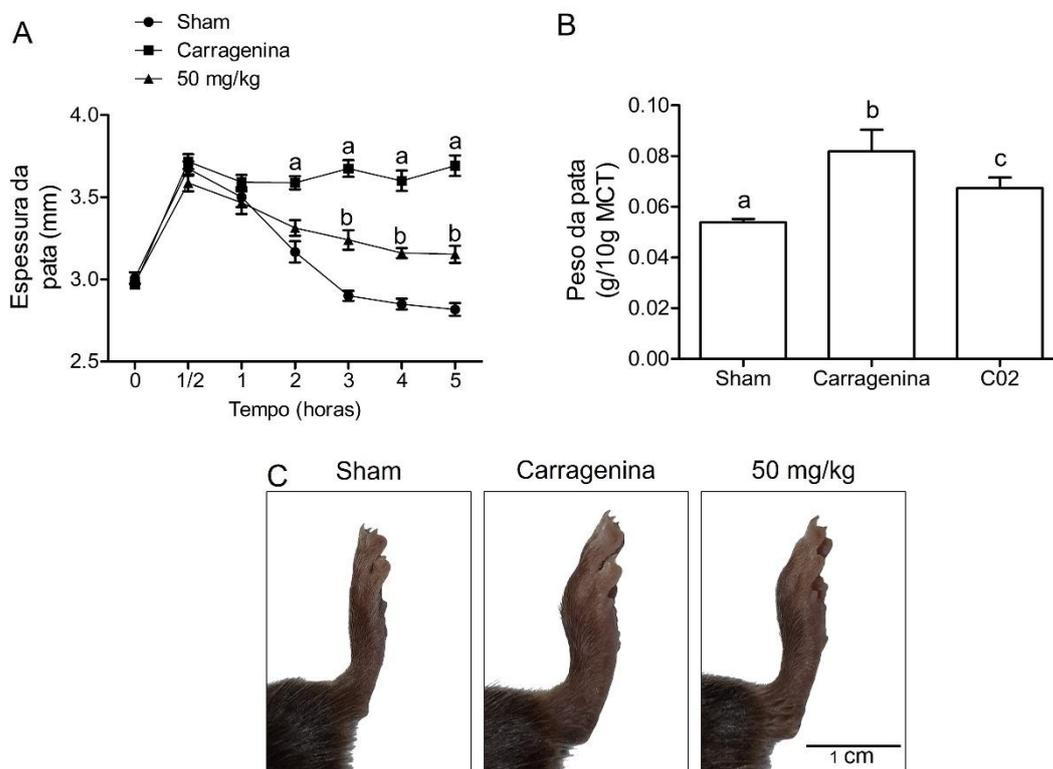


Fig. 12. Efeito do composto 02 no edema da pata induzida por carragenina. Trinta minutos antes da administração da carragenina os animais foram pré-tratados com o C02 (50 mg/kg) ou DMSO (25 μ L, sham). O volume do edema da pata foi medido antes (0 min), 30 min e 1, 2, 3, 4 e 5 h (A) após a injeção da carragenina, após 5 h de experimento os animais foram eutanasiados e as patas pesadas (B). Imagens representativas da pata de cada grupo foram tiradas 5 horas após administração da carragenina (C). MCT: massa corporal total. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 animais para cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. Letras diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

Em seguida, quantificamos a infiltração de neutrófilos no tecido da pata através de histologia e imunohistoquímica. O número de neutrófilos por campo (Figs. 12A, B e D) nos camundongos tratados com o composto diminuíram em cerca de 39% quando comparados com o grupo carragenina, e consequentemente a espessura do edema (Figs. 12A e C). A imunomarcagem da MPO no tecido da pata dos animais tratados com o disseleneto reduziu em 34% em relação ao grupo carragenina ($p < 0,0001$) (Figs. 13A e D).

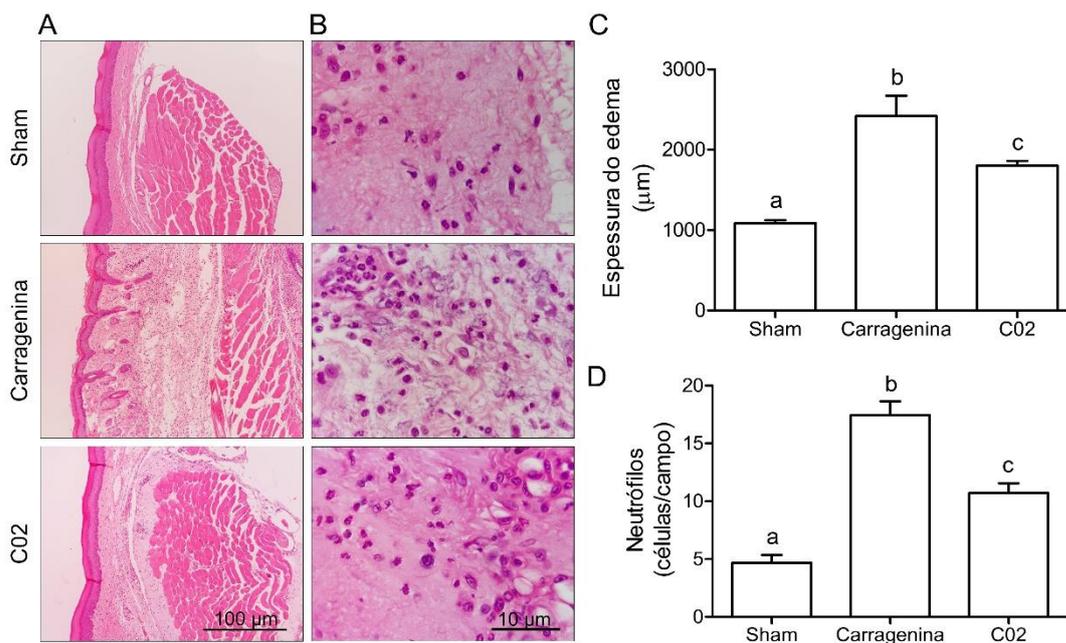


Fig. 13. Espessura do edema (A e C) e quantificação de neutrófilos (B e D) no tecido da pata. Após 5 h da administração da carragenina, os camundongos foram eutanaziados e o coxim da pata coletado para análise histológica. Fotomicrografias representativas da espessura do edema da pata (A) e contagem de neutrófilos (B) nas lâminas do tecido da pata coradas com HE (B), sob aumento de 1000x.. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. Letras diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

O dano oxidativo ao tecido da pata resultante da infiltração celular foi determinado pela quantificação das proteínas nitradas e carboniladas no tecido da pata também por imunohistoquímica. O tecido da pata dos camundongos que receberam apenas carragenina apresentou um aumento imunomarcção proteínas nitradas em resíduos de tirosina (13,5% *versus* 4,37%, $p < 0,0001$) (Figs. 14B e DE) e carboniladas (33,5% *versus* 18,5%, $p < 0,0001$) (Figs. 14C e F) em comparação ao grupo sham. Quando administrado previamente, o composto 02 reduziu a carbonilação e nitração de proteínas (Fig. 14E-F).

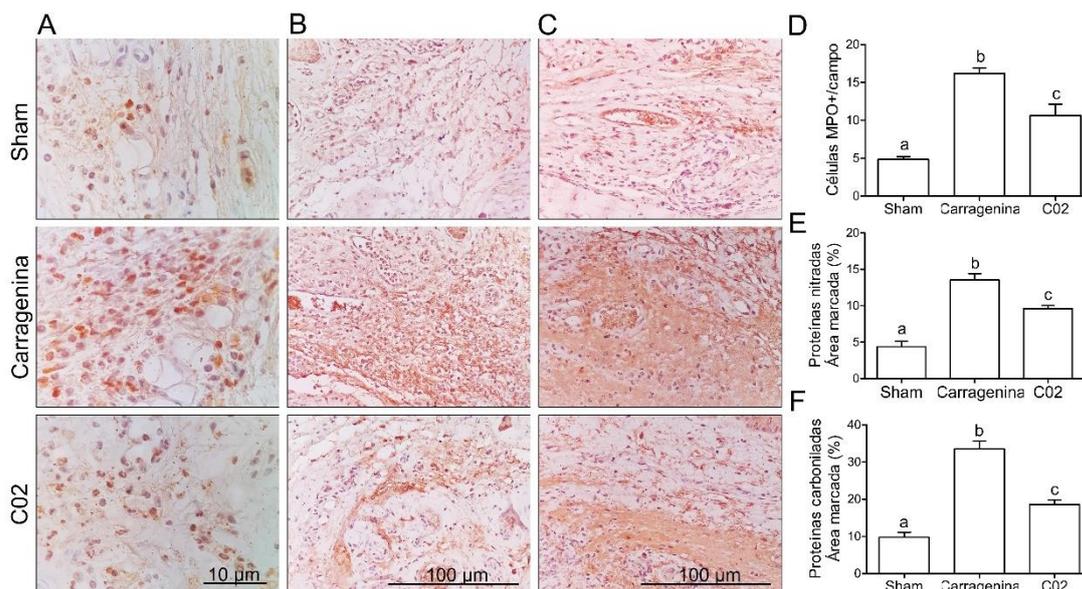


Fig. 14. Determinação de células imunomarcadas para MPO (A e D), proteínas nitradas (B e E) e carboniladas (C e F) no tecido da pata. Após 5 horas da administração da carragenina, os camundongos foram eutanaziados e o coxim da pata coletado para análise de imunohistoquímica. Fotomicrografias representativas indicando a área marcada para MPO (A), proteínas nitradas (B) e carboniladas (C) sob aumento de 1000x e porcentagem de área marcada/ μm^2 com anticorpo anti-MPO (células MPO+) (D), anti-3-nitrotirosina (E) e anti-proteína carbonilada (F). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. Letras diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

Por fim, a toxicidade do composto 2 foi avaliada *in vivo* pelo modelo de dose única, e durante 15 dias após administração do composto foram avaliados perda de peso, de apetite, de pelos, consumo de ração, alteração na respiração, vocalização, embotamento, agressividade, arqueamento da coluna, aperto dos olhos e achatamento do focinho e bochechas. Os animais foram observados continuamente pelas primeiras quatro horas após administração do composto, e não foi notada nenhuma mudança no comportamento de ambos os grupos, o que se manteve até o quinto dia. Apenas no primeiro dia, o grupo tratado com o composto ingeriu uma quantidade de alimento significativamente menor que o grupo sham, mas ainda assim, não houve mudança no peso corporal ao longo dos 15 dias (Fig. 15). Corroborando esses achados, a predição *in silico* sugeriu que esse composto tem alta permeabilidade nas membranas e barreiras biológicas, todavia, provavelmente não é citotóxico, hepatotóxico, carcinogênico, mutagênico, com um DL_{50} de ~ 1516 mg/kg (Tabela 1).

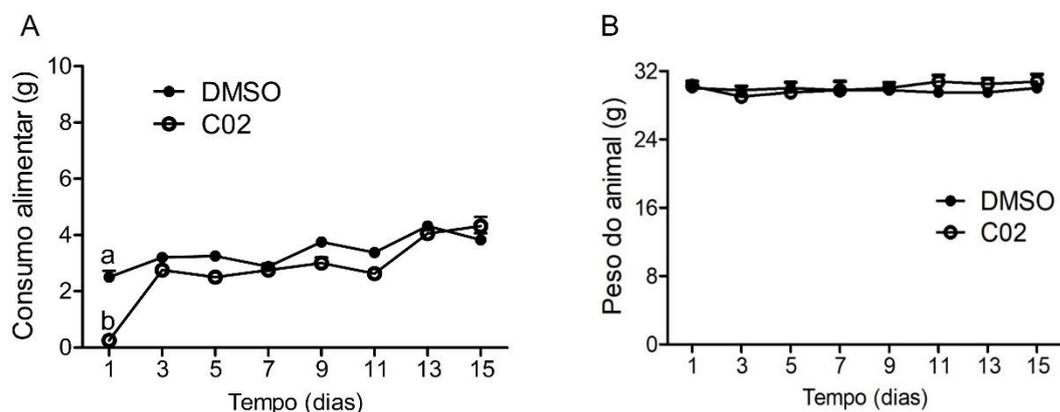


Fig. 15. Alterações do consumo alimentar e pelo corporal dos animais submetidos ao teste de toxicidade aguda. O composto 2 (50 mg/kg) foi administrado via i.p nos animais. No grupo sham foi administrado DMSO (25 μ L), veículo ao qual o composto foi diluído, pela mesma via. Os animais foram observados e a ração pesada durante 15 dias. Em A), o consumo alimentar foi expresso como média do consumo por animal. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de 6 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. Letras diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

Tabela 1. Predição farmacocinética e toxicológica do composto 2.

Parâmetros	Resultado
Parâmetros farmacocinéticos	
Peso molecular	542,39 g/mol
Absorção gastrointestinal	Alta
Barreira hematoencefálica	Sim
Parâmetros toxicológicos	
Citotóxico	Inativo
Hepatotóxico	Inativo
Carcinogênico	Inativo
Mutagênico	Inativo
Imunotóxico	Inativo

Esses critérios indicam valores de DL₅₀ de ~1516 mg/kg, conforme determinado pelo programa ProtoxII.

4. Discussão

Os compostos orgânicos de selênio têm recebido atenção da comunidade científica devido seu amplo potencial farmacológico [5,10,64–67]. Ebselen e outros selenocompostos possuem atividades anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* [13,64,65,68], antidepressivas [86], ansiolíticas [87,88], e neutroprotetoras [88]. Os mecanismos pelos quais essas moléculas agem são os mais variados, incluindo imunomodulação [69], antioxidantes [5,8,65,70,71], inibidores da NADPH oxidase [72,73], da ativação do NF-κB [74,75], da atividade da MPO [7,76,77], e moduladores do Nrf2 [78], o que explicaria, ao menos em parte, a versatilidade de suas propriedades biológicas. Neste estudo, descrevemos a atividade anti-inflamatória de um novo diseleneto em modelo animal de inflamação peritoneal e de pata por reduzir o *burst* oxidativo e quimiotaxia de neutrófilos e, conseqüentemente, o dano oxidativo ao tecido.

O HOCl é o principal produto formado no burst oxidativo devido às altas concentrações de íons Cl⁻ nos fluidos corpóreos [79], sua produção excessiva e/ou menor remoção/reparo do dano pelo aparato antioxidante podem ser responsáveis por diversas patologias agudas e crônicas [20–25], ao oxidar biomoléculas irreversivelmente [17,18,80].

Por isso, primeiramente foi feita uma triagem com 38 compostos onde a capacidade dos compostos em reagir com o HOCl era avaliada, nesta triagem, os compostos 2, 14 e 34 foram os que mostraram mais promissores. Esses compostos reagiram com HOCl, mas não com a taurina cloramina, com constante de velocidade de 10^7 - 10^9 M⁻¹s⁻¹, similar à GSH ($1,2 \times 10^8$ M⁻¹s⁻¹) (Fig.1), mas muito mais rápido que reconhecidos antioxidantes, incluindo trolox C ($1,3 \times 10^3$ M⁻¹ s⁻¹ [81]), β-caroteno ($2,3 \times 10^4$ M⁻¹ s⁻¹[81]), taurina ($4,8 \times 10^5$ M⁻¹s⁻¹ [31,81]) e ascorbato (6×10^6 M⁻¹s⁻¹) [31,81]. A reatividade do selênio pode ser explicada pela melhor nucleofilicidade e mais fácil oxidação do que o enxofre [2,27]. Na verdade, os trabalhos comprovam altas constantes de velocidade do HOCl com uma ampla gama de compostos de selênio, como selenocisteína e selenometionina [7,8]. Além disso, quando comparados aos compostos equivalentes contendo enxofre, os produtos de oxidação dos selenocompostos são rapidamente reduzidos, permitindo que algumas dessas espécies atuem cataliticamente em sistemas biológicos [8,82].

Quando investigamos as conseqüências da incubação dessas moléculas diretamente sobre a atividade da MPO *in vitro*, as três novas moléculas inibiram

a atividade clorinante da enzima com valores de IC₅₀ na faixa de 2,9 a 3,8 μM (Figs. 2B, D e F). Similarmente, essas três moléculas inibiram a atividade clorinante da MPO em neutrófilos humanos ativados com PMA (Fig 2A, C e E). A inibição reportada pode ser explicada pelo acúmulo da MPO-II, um intermediário incapaz de oxidar haletos à ácidos de halogênio [60,80,83], pela inativação irreversível do grupo heme da enzima [83], pela inibição de vias *upstream* à MPO [29,83], ou mesmo por levar à morte celular [83].

Quando os neutrófilos são ativados, O₂^{•-} é formado pela redução do O₂ pela NADPH oxidase que, por sua vez, dismuta-se para H₂O₂, substrato da MPO [23,84]. Portanto, a concentração de HOCl é diretamente dependente de ambas espécies [84]. O composto 2 foi o único que inibiu o *burst* oxidativo de dHL-60 (Figs. 4), incluindo o consumo do O₂ (Fig. 7A), sem evidência de citotoxicidade (Fig. 5 e 6), como também essa molécula não foi diminuiu a vitalidade das larvas de *Artemia salina*. Adicionalmente, a adição de tirosina, substrato para MPO-I e MPO-II [60,84], reverteu parcialmente a inibição da atividade clorinante da MPO em neutrófilos incubados com o composto 2 (Fig. 3). Os achados acima sugerem que o efeito do composto 2 deve envolver a modulação de vias *upstream* à MPO, embora a inibição da enzima através do acúmulo de MPO-II e/ou reação direta com HOCl não devam ser totalmente descartadas. Na verdade, a literatura aponta outros selenocompostos como inibidores do *burst* oxidativo de neutrófilos [9,68], provavelmente devido ao bloqueio da interação entre os domínios bis-SH₃ da p47phox ao PRD da p22phox da NOX2 [72,73].

Diante dos achados acima, foi importante examinar se o composto 2, um disseleneto bastante promissor *in vitro*, inibiu a atividade da MPO e os danos mediados pela enzima *in vivo*. Para isso, testamos inicialmente os efeitos desse disseleneto nos modelos de inflamação na cavidade peritoneal e edema de pata induzidos por carragenina, ambos amplamente utilizados para investigar os mecanismos envolvidos na inflamação aguda [85,86] bem como a atividade anti-inflamatória de compostos naturais e sintéticos [86].

A carragenina induz na cavidade peritoneal uma resposta inflamatória intensa caracterizada por exsudação do plasma e migração leucocitária, principalmente neutrófilos [62]. Essa migração é o resultado da liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, histamina, bradicinina, neuropeptídeos, óxido nítrico, TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-17 [63]. O TNF-α estimula

a quimiotaxia de células inflamatórias, ativação celular, formação de ROS e expressão de outras citocinas [87,88], e a IL-1 β sustenta a resposta inflamatória quando aumenta o recrutamento e ativação de fagócitos [63]. Em nosso modelo, a administração de carragenina aumentou a migração de leucócitos totais e neutrófilos (Figs. 8 B e C), transudação (Fig. 9A) e citocinas TNF- α e IL-1 β (Figs. 11A e B). A pré-administração do composto 2 (25, 50 e 75 mg/kg) atenuou todos os parâmetros utilizados para acompanhar a inflamação, como também a quimiotaxia *in vitro* (Fig. 10). Como a inibição da atividade da MPO no lavado peritoneal (Fig. 9B) se correlacionou com a redução na contagem de neutrófilos, sugeriu-se que modulação da migração neutrófilica tenha um papel mais importante no processo do que a inibição da MPO, conforme descrito recentemente para o nitróxido tempol [29,50,89]. Além disso, estudos anteriores com ebselen e outros selenocompostos sugeriram que a menor infiltração leucocitária na cavidade peritoneal é uma consequência na redução dos níveis de citocinas inflamatórias por essas moléculas [5,90,91].

Quando administrada na região subplantar da pata do camundongo, a carragenina produziu um aumento progressivo do volume da pata injetada do animal (Figs. 13 A e C) bem como a infiltração de neutrófilos (Figs. 13 B e D), conforme esperado para o quadro agudo do processo inflamatório [92]. Como consequência, os níveis de proteínas oxidadas também aumentaram (Figs. 14. D, E e F). O composto 2 (50 mg/kg) reduziu o edema de pata (Fig. 12 e 13), a infiltração de neutrófilos (Fig. 13 B e D), a imunomarcagem para MPO e proteínas oxidadas no tecido (Figs. 14D e F). Novamente, observamos uma redução expressiva na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, tanto que outros autores atribuíram os efeitos anti-inflamatórios de selenocompostos no modelo de edema de pata à inibição da quimiotaxia [66,90,91]. De fato, demonstramos que o composto 2 reduziu a migração de neutrófilos *in vitro* (Fig. 10), o que deve envolver o bloqueio da atividade da NADPH oxidase e a reorganização do citoesqueleto, conforme trabalhos anteriores [93–95].

Importante destacar que a predição farmacocinética indicou que esse composto tem alta permeabilidade nas membranas, inclusive na barreira hematoencefálica (Tabela 1). Além disso, no ensaio de toxicidade de dose única, o composto 2 (50 mg/kg) não causou alterações significativas no consumo de ração, água e peso corporal nem qualquer sinal de estresse nos camundongos

ao longo de 15 dias. Corroborando esse achado, a predição toxicológica *in silico* sugeriu que a molécula não detém potencial citotóxico, hepatotóxico, imunotóxico e carcinogênio com um DL₅₀ estimado em ~1516 mg/kg. De maneira similar, estudos anteriores demonstraram que alguns compostos de selênio com propriedades farmacológicas bem estabelecidas, incluindo ebselen [96], disseleneto a base de amina [12], disseleneto de fenila [97] foram bem tolerados *in vivo*. Além disso, SEI-Plex[®], uma levedura selenizada, DL₅₀ ≥ 2000 mg/kg em camundongos, causando nenhuma mortalidade em camundongos submetidos ao ensaio de toxicidade aguda [98]

Em conjunto, nossos dados demonstraram que o composto 2 é um candidato promissor no desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento de doenças inflamatórias. A atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* deste novo disseleneto foi comprovada pela reação direta do composto com o HOCl e inibição do *burst* oxidativo *in vitro*, pela redução da migração neutrófilica e do processo inflamatório subsequente na peritonite e na inflamação da pata induzida pela carragenina, e sem indícios de toxicidade. Nossos dados suportam que a redução da atividade da NADPH oxidase, recrutamento de neutrófilos, dano oxidativo e lesão tecidual devem ser os responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias do disseleneto.

5. Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida (BOL0286/2017) e ao financiamento do estudo pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (AUXPPG TO005/2019), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) CEPID Redoxoma (2013/07937-8), e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Código de financiamento – 001). Os autores também agradecem aos MSc Luís Felipe Gomes e MSc Leonardo Silva Rocha pelo suporte nos experimentos com neutrófilos humanos, e ao MSc Marcos Archilha pela síntese dos compostos orgânicos de selênio. Os autores agradecem ao Laboratório Micro, Vitória da Conquista, pelos cortes histológicos.

7. Contribuição dos autores

Tássia Liz Lessa: Concepção, Metodologia, Investigação, Validação, Redação, Análise formal. Thiago Macêdo Lopes Correia: Metodologia, Investigação, Análise formal. Talita Costa dos Santos: Metodologia, Investigação, Análise formal. Railmara Pereira da Silva e Beatriz Pereira da Silva, Albert Suza Peixoto: Metodologia, Investigação, Análise formal. William Festuccia, Regiane Yatsuda, Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão e Alcindo Aparecido dos Santos: Recursos. Flávia Carla Meotti: Recursos e Obtenção de financiamento. Raphael Ferreira Queiroz: Concepção, Metodologia, Investigação, Validação, Redação, Análise formal, Obtenção de financiamento, Supervisão, Curadoria dos dados.

REFERÊNCIAS

- [1] R.C. McKenzie, T. S. Rafferty, G.J. Beckett, Selenium: An essential element for immune function, *Immunol. Today*. 19 (1998) 342–345. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01294-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01294-8).
- [2] H.J. Reich, R.J. Hondal, Why Nature Chose Selenium, *ACS Chem. Biol.* 11 (2016) 821–841. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00031>.
- [3] V.A. Shchedrina, Y. Zhang, V.M. Labunskyy, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Structure – Function Relations , Physiological Roles , *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2010) 839–849.
- [4] J. V. Comasseto, Selenium and tellurium chemistry: Historical background, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 2027–2031. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010001100003>.
- [5] C. Luchese, M. Prigol, M.M.M.F. Duarte, C.W. Nogueira, Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: Reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels, *Inflamm. Res.* 61 (2012) 1117–1124. <https://doi.org/10.1007/s00011-012-0504-0>.
- [6] C. Storkey, D.I. Pattison, M.T. Ignasiak, C.H. Schiesser, M.J. Davies, Kinetics of reaction of peroxyxynitrite with selenium- and sulfur-containing compounds: Absolute rate constants and assessment of biological significance, *Free Radic. Biol. Med.* 89 (2015) 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.424>.
- [7] L. Carroll, D.I. Pattison, S. Fu, C.H. Schiesser, M.J. Davies, C.L. Hawkins, Reactivity of selenium-containing compounds with myeloperoxidase-derived chlorinating oxidants: Second-order rate constants and implications for biological damage, *Free Radic. Biol. Med.* 84 (2015) 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.029>.
- [8] L. Carroll, D.I. Pattison, S. Fu, C.H. Schiesser, M.J. Davies, C.L. Hawkins, Catalytic oxidant scavenging by selenium-containing compounds: Reduction of selenoxides and N-chloramines by thiols and redox enzymes, *Redox Biol.* 12 (2017) 872–882. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.023>.
- [9] M. Pinatto-Botelho, R. da Silva, M. Archilha, L. Giroldo, A. Kuznetsov, F.

- Meotti, A. dos Santos, Diethyl Selenodiglycolate: An Eco-Friendly Synthetic Antioxidant with Potential Application to Inflammatory Disorders, *J. Braz. Chem. Soc.* 00 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200009>.
- [10] A.S. Reis, A.G. Vogt, M.P. Pinz, G.T. Voss, C.A.R. da Fonseca, J.J. Paltian, T.J. Peglow, R.A. Vaucher, J.V.Z. Echenique, M.P. Soares, R.F. Schumacher, G. Perin, C. Luchese, E.A. Wilhelm, Modulation of COX-2, INF- γ , glutamatergic and opioid systems contributes to antinociceptive, anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of bis(3-amino-2-pyridine) diselenide, *Chem. Biol. Interact.* 311 (2019) 108790. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108790>.
- [11] M. Pinz, A.S. Reis, V. Duarte, M.J. Da Rocha, B.S. Goldani, D. Alves, L. Savegnago, C. Luchese, E.A. Wilhelm, 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions, *Eur. J. Pharmacol.* 780 (2016) 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.039>.
- [12] M. Ibrahim, N. Muhammad, M. Ibrahim, M.I. Khan, M.I.A. Shah, M. Said, W. Khan, J.P. Kamdem, J.B.T. Rocha, Acute oral toxicity and antioxidant studies of an amine-based diselenide, *BMC Complement. Altern. Med.* 19 (2019) 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2489-5>.
- [13] C.W. Nogueira, E.B. Quinhones, E.A.C. Jung, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide, *Inflamm. Res.* 52 (2003) 56–63. <https://doi.org/10.1007/s000110300001>.
- [14] V.C. Borges, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats, *Toxicology.* 215 (2005) 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.07.002>.
- [15] A. V. Peskin, C.C. Winterbourn, Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 572–579. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00506-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00506-2).
- [16] C.C. WINTERBOURN, A.J. KETTLE, Biomarkers of Myeloperoxidase-Derived Hypochlorous Acid, Elsevier B.V., 2001. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-50957-4.50027-2>.

- [17] A.A. Woods, S.M. Linton, M.J. Davies, Detection of HOCl-mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques, *Biochem. J.* 370 (2003) 729–735. <https://doi.org/10.1042/BJ20021710>.
- [18] H. Cai, C.Y. Chuang, S. Vanichkitrungruang, C.L. Hawkins, M.J. Davies, Hypochlorous acid-modified extracellular matrix contributes to the behavioral switching of human coronary artery smooth muscle cells, *Free Radic. Biol. Med.* 134 (2019) 516–526. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.044>.
- [19] O.M. Panasenko, K. Briviba, L.O. Klotz, H. Sies, Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite, *Arch. Biochem. Biophys.* 343 (1997) 254–259. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0171>.
- [20] M.J. Davies, The oxidative environment and protein damage, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1703 (2005) 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007>.
- [21] M.J. Davies, Protein oxidation and peroxidation, *Biochem. J.* 473 (2016) 805–825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>.
- [22] D. Cheng, J. Talib, C.P. Stanley, I. Rashid, E. Michaëlsson, E.L. Lindstedt, K.D. Croft, A.J. Kettle, G.J. Maghzal, R. Stocker, Inhibition of MPO (myeloperoxidase) attenuates endothelial dysfunction in mouse models of vascular inflammation and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39 (2019) 1448–1457. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312725>.
- [23] C. Nussbaum, A. Klinke, M. Adam, S. Baldus, M. Sperandio, Myeloperoxidase: A leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease, *Antioxidants Redox Signal.* 18 (2013) 692–713. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4783>.
- [24] S. Rosales-Corral, D.X. Tan, L. Manchester, R.J. Reiter, Diabetes and alzheimer disease, two overlapping pathologies with the same background: Oxidative stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/985845>.
- [25] N. Teng, G.J. Maghzal, J. Talib, I. Rashid, A.K. Lau, R. Stocker, The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication

- in plaque rupture, *Redox Rep.* 22 (2017) 51–73. <https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1256119>.
- [26] S.B. Murer, I. Aeberli, C.P. Braegger, M. Gittermann, M. Hersberger, S.W. Leonard, A.W. Taylor, M.G. Traber, M.B. Zimmermann, Antioxidant supplements reduced oxidative stress and stabilized liver function tests but did not reduce inflammation in a randomized controlled trial in obese children and adolescents, *J. Nutr.* 144 (2014) 193–201. <https://doi.org/10.3945/jn.113.185561>.
- [27] N.C. Payne, A. Geissler, A. Button, A.R. Sasuclark, A.L. Schroll, E.L. Ruggles, V.N. Gladyshev, R.J. Hondal, Comparison of the redox chemistry of sulfur- and selenium-containing analogs of uracil, *Free Radic. Biol. Med.* 104 (2017) 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.028>.
- [28] C. Storkey, M.J. Davies, D.I. Pattison, Reevaluation of the rate constants for the reaction of hypochlorous acid (HOCl) with cysteine, methionine, and peptide derivatives using a new competition kinetic approach, *Free Radic. Biol. Med.* 73 (2014) 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.024>.
- [29] R.F. Queiroz, S.M. Vaz, O. Augusto, Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by tempol: Revisiting the kinetics and mechanisms, *Biochem. J.* 439 (2011) 423–431. <https://doi.org/10.1042/BJ20110555>.
- [30] A.J. Kettle, C.C. Winterbourn, Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 502–512. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33056-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33056-5).
- [31] L.K. Folkes, L.P. Candeias, P. Wardman, Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions, *Arch. Biochem. Biophys.* 323 (1995) 120–126. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.0017>.
- [32] C. Storkey, D.I. Pattison, J.M. White, C.H. Schiesser, M.J. Davies, Preventing protein oxidation with sugars: Scavenging of hypohalous acids by 5-selenopyranose and 4-selenofuranose derivatives, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 2589–2599. <https://doi.org/10.1021/tx3003593>.
- [33] D. English, B.R. Andersen, Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque, *J. Immunol. Methods.* 5 (1974) 249–252. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(74\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(74)90109-4).

- [34] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability., *Curr. Protoc. Immunol.* Appendix 3 (2001) 2–3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>.
- [35] S. BOYDEN, The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes., *J. Exp. Med.* 115 (1962) 453–466. <https://doi.org/10.1084/jem.115.3.453>.
- [36] S.H.H.J.G. ZIGMOND, Leucocyte locomotion and chemotaxis., *Antibiot. Chemother.* 19 (1974) 179–190. <https://doi.org/10.1084/jem.137.2.387>.
- [37] E. Pick, D. Mizel, Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader, *J. Immunol. Methods.* 46 (1981) 211–226. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90138-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90138-1).
- [38] C.A. Belmokhtar, J. Hillion, E. Ségal-Bendirdjian, Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, *Oncogene.* 20 (2001) 3354–3362. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204436>.
- [39] C. Riccardi, I. Nicoletti, Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>.
- [40] B.S. Nunes, N.S. Rensonnet, D. Dal-Secco, S.M. Vieira, B.S. Cavada, E.H. Teixeira, T.R. Moura, C.S. Teixeira, J.T. Clemente-Napimoga, F.Q. Cunha, M.H. Napimoga, Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects, *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 379 (2009) 609–616. <https://doi.org/10.1007/s00210-009-0397-9>.
- [41] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X).
- [42] K. Suzuki, H. Ota, S. Sasagawa, T. Sakatani, T. Fujikura, Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes, *Anal. Biochem.* 132 (1983) 345–352. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90019-2).
- [43] B. Pulli, M. Ali, R. Forghani, S. Schob, K.L.C. Hsieh, G. Wojtkiewicz, J.J.

- Linnoila, J.W. Chen, Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples, *PLoS One*. 8 (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067976>.
- [44] A.J. Kettle, C.A. Gedye, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn, Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides, *Biochem. J.* 308 (1995) 559–563. <https://doi.org/10.1042/bj3080559>.
- [45] H.H. Draper, E.J. Squires, H. Mahmoodi, J. Wu, S. Agarwal, M. Hadley, A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials, *Free Radic. Biol. Med.* 15 (1993) 353–363. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90035-S](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90035-S).
- [46] I. Posadas, M. Bucci, F. Roviezzo, A. Rossi, L. Parente, L. Sautebin, G. Cirino, Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression, *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 331–338. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705650>.
- [47] C.J. Morris, Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse., *Methods Mol. Biol.* 225 (2003) 115–121. <https://doi.org/10.1385/1-59259-374-7:115>.
- [48] M.P. Cruz, C.M.F. Andrade, K.O. Silva, E.P. De Souza, R. Yatsuda, L.M. Marques, J.P. David, J.M. David, M.H. Napimoga, J.T. Clemente-Napimoga, Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and flavones isolated from *mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae), *PLoS One*. 11 (2016) 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150839>.
- [49] R.S. De Moura, T.S. Ferreira, A.A. Lopes, K.M.P. Pires, R.T. Nesi, A.C. Resende, P.J.C. Souza, A.J.R. Da Silva, R.M. Borges, L.C. Porto, S.S. Valenca, Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇÁÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse, *Phytomedicine*. 19 (2012) 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.11.004>.
- [50] D.A. da Silva, T.M.L. Correia, R. Pereira, R.A.A. da Silva, O. Augusto, R.F. Queiroz, Tempol reduces inflammation and oxidative damage in cigarette smoke-exposed mice by decreasing neutrophil infiltration and activating the Nrf2 pathway, *Chem. Biol. Interact.* 329 (2020) 109210. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109210>.

- [51] J.W. Kim, S.K. Ku, K.Y. Kim, S.G. Kim, M.H. Han, G.Y. Kim, H.J. Hwang, B.W. Kim, C.M. Kim, Y.H. Choi, Schisandrae fructus supplementation ameliorates sciatic neurectomy-induced muscle atrophy in mice, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/872428>.
- [52] T. Sato, K. Seyama, Y. Sato, H. Mori, S. Souma, T. Akiyoshi, Y. Kodama, T. Mori, S. Goto, K. Takahashi, Y. Fukuchi, N. Maruyama, A. Ishigami, Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174 (2006) 530–537. <https://doi.org/10.1164/rccm.200511-1816OC>.
- [53] A.A. Oyagbemi, T.O. Omobowale, G.O. Ochigbo, E.R. Asenuga, O.E. Olat Davies, T.O. Ajibade, A.B. Saba, A.A. Adedapo, Polyphenol-Rich Fraction of *Parquetina nigrescens* Mitigates Dichlorvos-Induced Cardiorenal Dysfunction Through Reduction in Cardiac Nitrotyrosine and Renal p38 Expressions in Wistar Rats, *J. Diet. Suppl.* 15 (2018) 269–284. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1336148>.
- [54] T. Sakai, S. Inoue, M. Takei, G. Ogawa, Y. Hamazaki, H. Ota, Y. Koboyashi, Activated inflammatory cells participate in thrombus size through tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in acute coronary syndrome: Immunohistochemical analysis, *Thromb. Res.* 127 (2011) 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.02.001>.
- [55] B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Med.* 45 (1982) 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.
- [56] C. Lhullier, P.A. Horta, M. Falkenberg, Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (2006) 158–163. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2006000200005>.
- [57] S.S. Roh, S.K. Ku, Mouse single oral dose toxicity study of DHU001, a polyherbal formula, *Toxicol. Res.* 26 (2010) 53–59. <https://doi.org/10.5487/TR.2010.26.1.053>.
- [58] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 4–

17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- [59] P. Banerjee, A.O. Eckert, A.K. Schrey, R. Preissner, ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W257–W263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>.
- [60] I.I. Vlasova, A. V. Sokolov, J. Arnhold, The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase, *J. Inorg. Biochem.* 106 (2012) 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.018>.
- [61] I. De Araújo Matos, N.B. Da Costa Júnior, F.C. Meotti, Integration of an Inhibitor-like Rule and Structure-based Virtual Screening for the Discovery of Novel Myeloperoxidase Inhibitors, *J. Chem. Inf. Model.* 60 (2020) 6408–6418. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00813>.
- [62] J. Damas, V. Bourdon, G. Remacle-Volon, A. Adam, Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats, *Br. J. Pharmacol.* 101 (1990) 418–422. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb12724.x>.
- [63] L.A. Abdulkhaleq, M.A. Assi, R. Abdullah, M. Zamri-Saad, Y.H. Taufiq-Yap, M.N.M. Hezme, The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review, *Vet. World.* 11 (2018) 627–635. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>.
- [64] C.F. Yang, H.M. Shen, C.N. Ong, Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 273–279. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00299-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00299-8).
- [65] T. Araki, H. Kitaoka, The mechanism of reaction of ebselen with superoxide in aprotic solvents as examined by cyclic voltammetry and ESR, *Chem. Pharm. Bull.* 49 (2001) 541–545. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.541>.
- [66] S.A. El-Ghazaly, Mona A;Fadel, Noha A; Rashed, Engy R; EL-Batal, Ahmed; Kenawy, Anti-inflammatory effect of selenium nanoparticles on the inflammation induced in irradiated rats El-Ghazaly, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 95 (2017) 101–110.
- [67] A.M. Casaril, M.T. Ignasiak, C.Y. Chuang, B. Vieira, N.B. Padilha, L. Carroll, E.J. Lenardão, L. Savegnago, M.J. Davies, Selenium-containing indolyl compounds: Kinetics of reaction with inflammation-associated oxidants and protective effect against oxidation of extracellular matrix

- proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 113 (2017) 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.344>.
- [68] I.A. Cotgreave, S.K. Duddy, G.E.N. Kass, D. Thompson, P. Moldéus, Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen, *Biochem. Pharmacol.* 38 (1989) 649–656. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90211-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90211-6).
- [69] D. Pan, J. Liu, X. Zeng, L. Liu, H. Li, Y. Guo, Immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Food Agric. Immunol.* 26 (2015) 248–259. <https://doi.org/10.1080/09540105.2014.894000>.
- [70] J. Kanski, J. Drake, M. Aksenova, L. Engman, D.A. Butterfield, Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures, *Brain Res.* 911 (2001) 12–21. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02541-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02541-0).
- [71] P. Kuchibhotla, B.D. Rao, A methodology for fast scheduling of partitioned systolic algorithms, *J. VLSI Signal Process.* 10 (1995) 111–126. <https://doi.org/10.1007/BF02407030>.
- [72] S. Smith, J. Min, T. Ganesh, B. Diebold, T. Kawahara, Y. Zhu, J. McCoy, A. Sun, J. Snyder, H. Fu, Y. Du, I. Lewis, J.D. Lambeth, Ebselen and congeners inhibit NADPH-oxidase 2 (Nox2)- dependent superoxide generation by interrupting the binding of regulatory subunits, *Chem. Biol.* 22 (2012) 752–763. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [73] S. Altenhöfer, K.A. Radermacher, P.W.M. Kleikers, K. Wingler, H.H.H.W. Schmidt, Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement, *Antioxidants Redox Signal.* 23 (2015) 406–427. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5814>.
- [74] S.K. Nettleford, K.S. Prabhu, Selenium and selenoproteins in gut inflammation—A review, *Antioxidants.* 7 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox7030036>.
- [75] Y. Liu, X. Jiao, X. Teng, X. Gu, X. Teng, Antagonistic effect of selenium on lead-induced inflammatory injury through inhibiting the nuclear factor- κ B signaling pathway and stimulating selenoproteins in chicken hearts, *RSC Adv.* 7 (2017) 24878–24884. <https://doi.org/10.1039/c7ra00034k>.
- [76] O. Skaff, D.I. Pattison, P.E. Morgan, R. Bachana, V.K. Jain, K.I.

- Priyadarsini, M.J. Davies, Selenium-containing amino acids are targets for myeloperoxidase-derived hypothiocyanous acid: Determination of absolute rate constants and implications for biological damage, *Biochem. J.* 441 (2012) 305–316. <https://doi.org/10.1042/BJ20101762>.
- [77] K. Flouda, B. Gammelgaard, M.J. Davies, C.L. Hawkins, Modulation of hypochlorous acid (HOCl) induced damage to vascular smooth muscle cells by thiocyanate and selenium analogues, *Redox Biol.* 41 (2021) 101873. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101873>.
- [78] R. Brigelius-Flohé, A.P. Kipp, Selenium in the redox regulation of the Nrf2 and the Wnt pathway, 1st ed., Elsevier Inc., 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405882-8.00004-0>.
- [79] W.M. Nauseef, Myeloperoxidase in human neutrophil host defence, *Cell. Microbiol.* 16 (2014) 1146–1155. <https://doi.org/10.1111/cmi.12312>.
- [80] M.J. Davies, Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention Overview of the Action of Myeloperoxidase and Other Heme Peroxidases, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 48 (2011) 8–19. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.11>.
- [81] D. Pattison, M. Davies, Reactions of Myeloperoxidase-Derived Oxidants with Biological Substrates: Gaining Chemical Insight into Human Inflammatory Diseases, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 3271–3290. <https://doi.org/10.2174/092986706778773095>.
- [82] A. Suryo Rahmanto, M.J. Davies, Catalytic activity of selenomethionine in removing amino acid, peptide, and protein hydroperoxides, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 2288–2299. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.027>.
- [83] M.J. Davies, Myeloperoxidase: Mechanisms, reactions and inhibition as a therapeutic strategy in inflammatory diseases, *Pharmacol. Ther.* 218 (2021) 107685. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107685>.
- [84] S.J. Klebanoff, Myeloperoxidase: friend and foe, *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005) 598–625. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>.
- [85] K.R. Patil, U.B. Mahajan, B.S. Unger, S.N. Goyal, S. Belemkar, S.J. Surana, S. Ojha, C.R. Patil, Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: Implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019).

- <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>.
- [86] S. de Almeida Junior, In vivo methods for the evaluation of anti-inflammatory and antinoceptive potential, *Brazilian J. Pain.* 2 (2019) 386–389. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20190070>.
- [87] Z.G. Liu, Molecular mechanism of TNF signaling and beyond, *Cell Res.* 15 (2005) 24–27. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290259>.
- [88] B.F. Mackay, H. Loetscher, D. Stueber, G. Gehr, W. Lesslauer, Tumor Necrosis Factor (TNF- α)-induced Cell Adhesion to Human Endothelial Cells Is under Dominant Control of One TNF Receptor Type, *TNF-R55*, 177 (1993).
- [89] R.F. Queiroz, A.K. Jordão, A.C. Cunha, V.F. Ferreira, M.R.P.L. Brigagão, A. Malvezzi, A.T.D. Amaral, O. Augusto, Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 1942–1953. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.001>.
- [90] F. Petronilho, D. Florentino, F. Silvestre, L.G. Danielski, D.Z. Nascimento, A. Vieira, L.A. Kanis, J.J. Fortunato, M. Badawy, T. Barichello, J. Quevedo, Ebselen Attenuates Lung Injury in Experimental Model of Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats, *Inflammation.* 38 (2015) 1394–1400. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0113-5>.
- [91] A.T. Vieira, K.D. Silveira, M.C.C. Arruda, C.T. Fagundes, J.L. Gonçalves, T.A. Silva, M.J. Neves, M.A.B.C. Menezes, J.R. Nicoli, M.M. Teixeira, F.S. Martins, Treatment with Selemax®, a selenium-enriched yeast, ameliorates experimental arthritis in rats and mice, *Br. J. Nutr.* 108 (2012) 1829–1838. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000013>.
- [92] M.A. Aller, J.L. Arias, J.I. Arias, F. Sánchez-Patán, J. Arias, The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue, *Med. Hypotheses.* 68 (2007) 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.07.004>.
- [93] S. Meredith, Disorders of Neutrophil Function, 412 (2014) 1–10.
- [94] B.M. Babior, NADPH oxidase, *Curr. Opin. Immunol.* 16 (2004) 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001>.
- [95] H. Hattori, K.K. Subramanian, J. Sakai, Y. Jia, Y. Li, T.F. Porter, F. Loison, B. Sarraj, A. Kasorn, H. Jo, C. Blanchard, D. Zirkle, D. McDonald, S.Y. Pai,

- C.N. Serhan, H.R. Luo, Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 3546–3551. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914351107>.
- [96] C. Santi, C. Scimmi, L. Sancineto, Ebselen and analogues: Pharmacological properties and synthetic strategies for their preparation, *Molecules*. 26 (2021) 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules26144230>.
- [97] A.F. de Bem, R. de Lima Portella, J. Perottoni, E. Becker, D. Bohrer, M.W. Paixão, C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods, *Chem. Biol. Interact.* 162 (2006) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.04.005>.
- [98] J.C. Griffiths, R.A. Matulka, R. Power, Acute and subchronic toxicity studies on Sel-Plex®, a standardized, registered high-selenium yeast, *Int. J. Toxicol.* 25 (2006) 465–476. <https://doi.org/10.1080/10915810600959626>.

CONCLUSÕES

Nesse estudo, comprovamos a atividade anti-inflamatória de um novo disseleneto. Este novo composto demonstrou reagir diretamente com o HOCl e inibir o *burst oxidativo in vitro*, além de reduzir o processo inflamatório na peritonite e inflamação da pata induzida pela carragenina sem demonstrar indícios de toxicidade. Esses achados estimulam a continuidade dos estudos com o objetivo de identificar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos do novo disseleneto. Apesar de preliminares, nossos resultados podem contribuir no desenvolvimento de novas estratégias para processos redox e inflamatórios.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1. Inibição da formação de taurina cloramina pelo HOCl *in vitro* e por neutrófilos humanos ativados.

Compostos	Inibição da formação de taurina-cloramina pelo HOCl <i>in vitro</i> (%)	Inibição da formação de taurina-cloramina por neutrófilos (%)
01	9,6±0,1	51,5±0,4
02	44,5±0	73,0±0
03	42,2±0	47,3±0
04	40,2±0	n.o.
05	n.o.	14,0±0
06	3,9±0	35,1±0
07	n.o.	10,5±0,2
08	41,4±0	1,9±0
09	n.o.	58,2±0,1
10	n.o.	n.o.
11	35,5±0,3	n.o.
12	2,7±0,2	n.o.
13	61,2±0	58,5±0,2
14	97,6±0	78,2±0
15	66,4±0,6	21,7±0,3
16	33,3±1,4	36,1±0
17	34,1±0	61,8±0,2
18	68,2±0,3	27,6±0,3
19	32,0±0	15,8±0
20	32,8±0	n.o.
21	26,0±0,6	29,3±0,1
22	35,9±0,7	5,9±0,4
23	16,8±0,4	n.o.

24	n.o.	n.o.
25	60,6±0,7	19,7±0,1
26	n.o.	28,1±0,4
27	n.o.	n.o.
28	n.o.	n.o.
29	n.o.	1,9±0
30	n.o.	n.o.
31	n.o.	n.o.
32	n.o.	21,3±0,2
33	n.o.	n.o.
34	45,2±0,0	70,3±0,1
35	n.o.	n.o.
36	11,7±0,1	n.o.
37	n.o.	n.o.
38	n.o.	n.o.

*Os valores são representativos de três experimentos independentes, e os resultados apresentados como média ± erro padrão. No sistema HOCl *in vitro* (60 µM), os compostos foram testados na concentração de 60 µM, enquanto no sistema com neutrófilos (3,3 x 10⁶ células/mL) na concentração de 10 µM. n.o.= inibição da cloração não observada na concentração testada.

