



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**XILOFURANOSÍDEOS CONTENDO SELÊNIO E
TELÚRIO ATENUAM A TOXICIDADE INDUZIDA POR
MANGANÊS EM *CAENORHABDITIS ELEGANS*
ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DA VIA DAF-16/FOXO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Suzi Giliane do Nascimento Wollenhaupt

Uruguaiana, RS, Brasil

2013

SUZI GILIANE DO NASCIMENTO WOLLENHAUPT

**XILOFURANOSÍDEOS CONTENDO SELÊNIO E TELÚRIO ATENUAM A
TOXICIDADE INDUZIDA POR MANGANÊS EM *CAENORHABDITIS
ELEGANS* ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DA VIA DAF-16/FOXO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daiana Silva de
Ávila

Uruguaiiana

2013

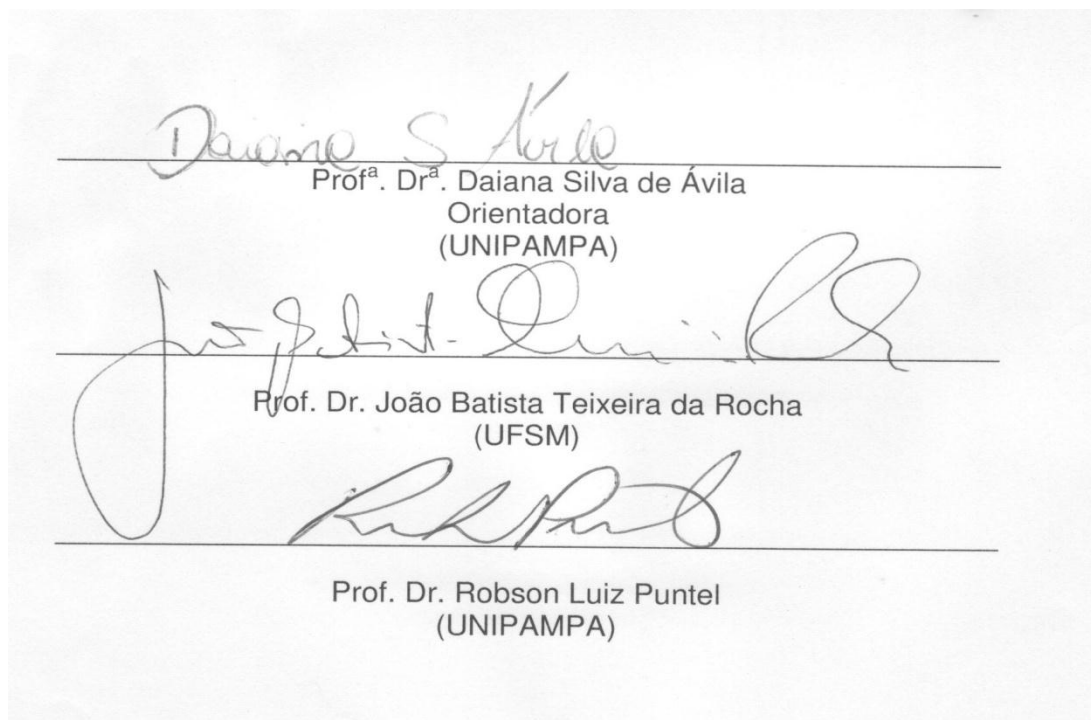
SUZI GILIANE DO NASCIMENTO WOLLENHAUPT

**Xilofuranosídeos contendo selênio e telúrio atenuam a toxicidade
induzida por Mn em *Caenorhabditis elegans* através da modulação da via
DAF-16/FOXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 10 de maio de 2013
Banca examinadora:



Daiana S. Ávila
Prof.^a. Dr.^a. Daiana Silva de Ávila
Orientadora
(UNIPAMPA)

João Batista Teixeira da Rocha
Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha
(UFSM)

Robson Luiz Puntel
Prof. Dr. Robson Luiz Puntel
(UNIPAMPA)

Dedico este trabalho

À minha família, pelo incentivo e carinho.

O orgulho que percebo em vocês a cada conquista renova minhas forças para
continuar.

“Conseguí meu equilíbrio cortejando a insanidade”

Renato Russo

AGRADECIMENTO

Agradeço à minha família, principalmente à minha super mãe, minha madrinha e minha avó (mesmo não estando mais aqui, sei que torce por mim) por todo o incentivo apoio e amor que sempre tiveram comigo. Vocês foram minhas maiores incentivadoras e nunca mediram esforços para me ajudar no que foi preciso. Eu amo vocês!

À Prof^a.Dr^a. Daiana Silva de Avila pela orientação, oportunidade, confiança, compreensão e paciência. Muito obrigada por tudo!

Agradeço com imenso carinho à UNIPAMPA por esta oportunidade.

Ao grupo GBToxCE pela colaboração na realização dos experimentos, muito obrigada a todos vocês.

Ana Thalita, Willian e Dani muito obrigada, pela imensa colaboração na parte experimental deste trabalho.

À Prof^a.Dr^a. Francielli Cibin pelo incentivo, pelo carinho, amizade e disponibilização do laboratório. Muito obrigada.

Muito obrigada Laura, Melina e Ariely pelo auxílio na parte experimental.

Ao Prof. Dr. Félix Antunes muito obrigado pela disponibilização do laboratório.

Priscila, Bruna e Tássia muito obrigado pela paciência e auxílio.

Muito obrigado ao Prof. Dr. Robson Puntel pela disponibilização do laboratório.

Matheus muito obrigado pelo auxílio e paciência.

Aos colegas de trabalho da UNIPAMPA e companheiros de estudo Anderson, Cristiano, Jefferson e Simone por estarem sempre junto comigo, por me incentivarem, por me darem força, por não me deixarem desistir. E pelas imensas discussões sobre bioquímica, meus sinceros agradecimentos.

Ao Leo, pelo carinho e compreensão, por dividir comigo minhas angústias, alegrias por todo apoio e carinho. Obrigada por tudo. Te amo!

Cris e Mano por me apoiarem mesmo de longe, por torcerem por mim e não medirem esforços para me ajudar. Amo vocês!

Obrigada a todos que de alguma maneira auxiliaram na realização deste trabalho.

À Deus por ter me dado força e condições para minhas conquistas.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Fundação Universidade Federal do Pampa

Xilofuranosídeos contendo selênio e telúrio atenuam a toxicidade induzida por Mn em *Caenorhabditis elegans* através da modulação da via DAF-16/FOXO

AUTOR: Suzi Giliane do Nascimento Wollenhaupt

ORIENTADORA: Daiana Silva de Ávila

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 10 de Maio, 2013

Compostos orgânicos de selênio (Se) e telúrio (Te) apresentam propriedades antioxidantes em muitos modelos de estresse oxidativo. No entanto, devido à complexidade dos modelos de mamíferos, tem sido difícil de determinar as vias moleculares e proteínas específicas que são moduladas em resposta aos tratamentos com esses compostos. Neste contexto, o presente trabalho investigou os efeitos e possíveis mecanismos de ação de uma nova classe de compostos orgânicos de Se e Te chamados Xilofuranosídeos, utilizando como modelo experimental alternativo o nematóide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Tal modelo permite fácil manipulação genética, marcação de diversas proteínas com proteína verde fluorescente e análise de toxicidade *in vivo* e ao vivo. Neste estudo, desafiamos os nematóides ao manganês (Mn), um agente pró-oxidante conhecido, uma vez que evidências apontam que o estresse oxidativo é consequência da sua toxicidade. Utilizando este agente pró-oxidante, investigamos a eficácia do Se e Te-xilofuranosídeos em reverter e/ou proteger os vermes da toxicidade induzida por Mn. Adicionalmente, investigamos um suposto mecanismo de ação. Primeiramente encontramos a dose letal 50% dos compostos, as quais foram de 0,73mM e 0,8mM para os compostos contendo Se e Te, respectivamente. Em concentrações subletais, encontramos que ambos Se e Te-xilofuranosídeo reverteram à mortalidade induzida por Mn, diminuíram a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumentaram a expressão da superóxido dismutase (SOD-3::GFP), indicando que o aumento na sobrevivência está associado com a diminuição do estresse oxidativo. Além disso, observamos que os Se e Te-xilofuranosídeos induzem a translocação nuclear do fator de transcrição DAF-16/FOXO, que no

verme é conhecido por regular a resposta ao estresse, envelhecimento e metabolismo e tem também como gene alvo a *sod-3*, corroborando com o aumento na expressão da proteína codificada por este gene. Esses achados sugerem que os Se e Te-xilofuranosídeos atenuam a geração de espécies reativas induzidas por Mn através da regulação da via de sinalização DAF-16/FOXO.

Palavras-chave: Xilofuranosídeos; *C. elegans*; estresse oxidativo; DAF-16; SOD; manganês.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduation Program in Biochemistry
Federal University of Pampa

Seleno- and Telluro-Xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway

AUTHOR: SUZI GILIANE DO NASCIMENTO WOLLENHAUPT

ADVISOR: DAIANA SILVA DE ÁVILA

Date and Place of Defense: Uruguaiana, May 10th, 2013

Organoselenium and organotellurium compounds have been reported as antioxidant in several models of oxidative stress. Nevertheless, because of the complexity of mammalian models, it has been difficult to determine the molecular pathways and specific proteins that are modulated in response to treatments with these compounds. In this context, the present study investigated the effects and action mechanisms of a novel class of organic compounds of selenium (Se) and tellurium (Te) called Xylofuranosides, utilizing as an alternative experimental model the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), that affords easy genetic manipulations, green fluorescent protein tagging and *in vivo* live analysis of toxicity. In this study, we challenged worms to manganese (Mn), a known pro oxidizing agent, as there is abundant evidence pointing out to oxidative stress in mediating its toxicity. We investigated the efficacy of Se- and Te- xylofuranosides in reversing and/or protecting the worms from Mn-induced toxicity. In addition, we investigated their putative mechanism of action. First, we found the lethal dose 50% (LD₅₀) for the compounds, which were 0.73mM and 0.8mM for Se and Te compound, respectively. This was followed by studies on the ability of the xylofuranosides to afford protection against Mn-induced toxicity. Both Se and Te-xylofuranosides reversed the Mn-lethality, decreased reactive oxygen species (ROS) production and increased the expression of superoxide dismutase (SOD-3), indicating that the increased survival was associated with decreased oxidative stress. Furthermore, we observed that the xylofuranosides induced nuclear translocation of the transcriptional factor DAF-16/FOXO, which in the worm is known to regulate stress responsiveness, aging, metabolism and the expression of SOD-3, as verified in this study. These findings

suggest that xylofuranosides attenuate Mn-induced ROS generation by regulating the DAF-16/FOXO signaling pathway.

Key-words: Xylofuranoside, *C. elegans*, oxidative stress, DAF-16, SOD, manganese.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo	
Figure 1 – Chemical structure of the xylofuranosides compounds: A) Compound 1 and B) Compound 2.....	57
Figure 2 – Dose-response curves for acute treatment with xylofuranosides.....	57
Figure 3 – Survival rate followed Mn exposure (75mM) and pre treatment with xylofuranosides A) Compound 1; B) Compound 2; and post-treatment with xylofuranosides C) Compound 1; D) Compound 2.....	58 59
Figure 4 – Life span of worms treated with xylofuranosides A) Compound 1; B) Compound 2.....	60
Figure 5 – Brood size of worms treated with xylofuranosides A) Compound 1; B) Compound 2.....	61
Figure 6 – Xylofuranoside pre-treatment protects the Mn-induced ROS production. ROS was measured directly by DCF-DA.....	62
Figure 7 – Fluorescence intensity SOD::GFP A) Compound 1, B) Compound 2, C) Control nematode and D) Treated animals with xylofuranosides.....	63
Figure 8 – Xylofuranosides cause nuclear translocation of transcriptional factor DAF-16 in <i>C. elegans</i> . A) Percentage of worms expressing DAF-16 in the nucleus and/or in the cytosol, B) Control, C) Treatment with xylofuranosides.....	64
Figure 9 – Compound 2 treatment does not alter Mn levels in N2 (wildtype) worms.....	64
Revisão bibliográfica	
Figura I. Oxidação dopaminérgica induzida por Mn.....	27
Figura II. Ciclo de vida do <i>C. elegans</i>	29
Figura III. Via de sinalização semelhante à insulina/IGF-1.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(ONOO⁻) - Peroxinitrito

(PhSe)₂ - Disseleneto de difenila

ATP- Adenosina trifosfato

Cd - Cádmi

DA - Dopamina

DAergic - Dopaminérgica

DAF-16 - Fator de transcrição ortólogo ao FOXO

DL₅₀- Quantidade de uma determinada substância que é necessária para provocar a morte a pelo menos 50% da população

DP - Doença de Parkinson

ERN - Espécies reativas nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERs - Espécies reativas

FoxO (Forkhead Box)- Cabeça de garfo

GFP - Proteína verde fluorescente

GPx - Glutathione-peroxidase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina

Mn - Manganês

Mn-SOD - Mn-superóxido dismutase

NO - Óxido nítrico

O₂ - Oxigênio molecular

O₂⁻ - Ânion superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

RLs - Radicais livres

S - Enxofre

Se - Selênio

Sec - Selenocisteína

SNP - Nitroprussiato de sódio

SOD - Superóxido dismutase

Te - Telúrio

δ-ALA-D - δ-Aminolevulinato desidratase

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. O SELÊNIO	18
2.2. COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO E SUAS PROPRIEDADES	19
2.3. O TELÚRIO.....	21
2.4. COMPOSTOS ORGÂNICOS DE TELÚRIO E SUAS PROPRIEDADES	22
2.5. XILOFURANOSÍDEOS	24
2.6. ESTRESSE OXIDATIVO	25
2.7. O MANGANÊS.....	26
2.8. <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	27
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. OBJETIVO GERAL.....	31
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5. ARTIGO CIENTÍFICO	32
Abstract	34
1. Introduction.....	36
2. Materials and Methods	38
2.1 <i>CHEMICALS</i>	38
2.2 <i>C. ELEGANS STRAINS AND HANDLING OF THE WORMS</i>	38
2.3 <i>DOSE-RESPONSE CURVES AND ACUTE MN EXPOSURE TREATMENTS</i>	39
2.4 <i>LIFESPAN EXPERIMENTS</i>	40
2.5 <i>BROOD SIZE</i>	40
2.6 <i>FLUORESCENCE QUANTIFICATION</i>	40
2.7 <i>ROS MEASUREMENT</i>	41
2.8 <i>EPIFLUORESCENCE MICROSCOPY</i>	41

2.9	<i>MN ANALYSIS BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY</i>	41
2.10	<i>STATISTICS</i>	42
3.	<u>Results</u>	42
3.1	<i>DOSE-RESPONSE CURVES FOR XYLOFURANOSIDES</i>	42
3.2	<i>EFFECTS OF SUBLETHAL DOSES OF COMPOUNDS 1 AND 2 ON MN-INDUCED TOXICITY</i>	42
3.3	<i>LIFE SPAN AND BROOD SIZE FOLLOWED XYLOFURANOSIDE EXPOSURE</i>	43
3.4	<i>ROS LEVELS</i>	43
3.5	<i>FLUORESCENCE QUANTIFICATION</i>	44
3.6	<i>EFFECTS OF COMPOUND 2 ON MN LEVELS</i>	44
4.	<u>Discussion</u>	44
5.	<u>Conclusion</u>	48
	Acknowledgements	48
	Conflict of Interest	48
	References	49
6.	<u>CONCLUSÕES</u>	65
7.	<u>PERSPECTIVAS</u>	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	ANEXO A- Carta de submissão do artigo à revista Biochemical Pharmacology	76

1. INTRODUÇÃO

O selênio (Se) elemento traço essencial é de fundamental importância para a saúde humana. Constituinte de um pequeno grupo de selenoproteínas contendo selenocisteína, o Se desencadeia importantes funções estruturais e enzimáticas (Papp *et al.*, 2007). Em contraste ao Se, o telúrio (Te) parece não ter nenhuma função biológica essencial em sistemas de mamíferos, embora telurocisteína e telurometionina tenham sido detectados em algumas proteínas bacterianas (Boles *et al.*, 1995; Budisa *et al.*, 1995).

Compostos orgânicos contendo Se e Te são promissores agentes farmacológicos que possuem importantes atividades biológicas já descritas (Nogueira *et al.*, 2004; Meotti *et al.*, 2003). A reatividade de compostos orgânicos de Se e Te, caracterizada pela alta nucleofilicidade e potencial antioxidante (Nogueira *et al.*, 2004; Ba *et al.*, 2010; Zeni *et al.*, 2006) é a base para as suas atividades farmacológicas observadas em modelos animais, especialmente em roedores. Esta classe de compostos têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias, anti-úlceras, anticâncer, hepato e neuroprotetoras (Avila *et al.*, 2010; Imai *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2004; Jesse *et al.*, 2009; Ineu *et al.*, 2008). Essas ações farmacológicas são atribuídas principalmente às habilidades de sequestrar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) (Nogueira *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2003; Engman *et al.*, 2000; Briviba *et al.*, 1998). Também tem sido demonstrado que a toxicidade celular em linhagens celulares cancerosas, causada por altas doses dos compostos, é causada pela ativação de cascatas de apoptose. (Engman *et al.*, 2000; Posser *et al.*, 2011; Scambia *et al.*, 1989). Por isso, os pesquisadores têm procurado cada vez mais desenvolver organocalcogênios sintéticos com atividade antioxidante (Braga *et al.*, 2010a; Braga *et al.*, 2010b; Affeldt, 2012).

Os compostos heterocíclicos selecionados foram sintetizados a partir do carboidrato D-xilose, e são chamados xilofuranosídeos. Sabe-se que heterocíclicos contendo algum tipo de açúcar em suas estruturas, como nucleosídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas (Taylor, 1998), têm despertado grande interesse no estudo de suas propriedades bioquímicas e farmacológicas.

Dentre a grande variedade de heterocíclicos, os derivados de carboidratos despontam como classe de compostos com grande potencial de estudos, devido à sua semelhança química com moléculas de ocorrência natural.

Entretanto, devido à complexidade dos modelos utilizando mamíferos, tem sido difícil determinar as vias e mecanismos específicos que são modulados por estes compostos. Por este motivo, este estudo visa à utilização de um modelo animal mais simples: o nematóide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Este verme de solo tem sido utilizado como uma ferramenta útil em toxicologia experimental devido ao alto grau de homologia entre os genomas destes com o de humanos, sua fácil manutenção e manipulação, a geração facilitada de cepas com mutações tipo deleção em genes de interesse e a existência de diversas cepas transgênicas expressando a proteína verde fluorescente (do inglês GFP) fundida a genes promotores que codificam proteínas de interesse (Chalfie *et al.*, 1994). Um exemplo é o fator de transcrição DAF-16; essa proteína é um ortólogo do fator FOXO (*forkhead Box O*) em humanos, cuja função é modular o sistema antioxidante. Devido aos recursos que este modelo oferece, o mesmo tem contribuído para analisar os mecanismos tóxicos de vários metais; incluindo a toxicidade induzida por manganês (Mn) (Benedetto *et al.*, 2010).

O Mn é o décimo segundo elemento mais prevalente naturalmente na crosta da Terra, é um elemento essencial presente em todos os organismos vivos, bem como em pedras, óleo, água e alimentos. O Mn é requerido para o metabolismo normal de aminoácidos, lipídeos, proteínas e carboidratos. Porém, a exposição a níveis excessivos ao Mn leva a sua deposição no cérebro e neurodegeneração dopaminérgica (DAérgic), com conseqüente desenvolvimento de uma síndrome extrapiramidal referida como manganismo, a qual partilha várias características clínicas com a doença de Parkinson (DP) (Benedetto *et al.*, 2010). O estresse oxidativo medeia, pelo menos em parte, a toxicidade induzida por Mn, a qual está associada com o comprometimento de defesas antioxidantes (Benedetto *et al.*, 2009; Erikson *et al.*, 2006).

Desta maneira o presente estudo, investigou, em um modelo alternativo, a eficácia de compostos com atividade antioxidante em atenuar danos oxidativos induzidos por Mn. Em particular, focou-se na capacidade do Se- e Te-xilofuranosídeos, em modular vias de sinalização que aumentariam a proteção

antioxidante de maneira indireta, o que contribuiria para aumentar a expressão de enzimas antioxidantes em *C. elegans*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Selênio

O elemento químico Se nomeado em homenagem à deusa da lua, Selene, foi descoberto em 1817 pelo químico sueco J.J.Berzelius enquanto investigava uma doença que acometia trabalhadores em uma fábrica de ácido sulfúrico. Esse elemento está localizado no grupo dos calcogênios (grupo 16) na tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}) (Papp *et al.*, 2007).

A similaridade nas propriedades físicas e químicas do Se e Enxofre (S); permitem interações Se-S nos sistemas biológicos, entretanto, as diferenças em suas propriedades físico-químicas estabelecem suas funções específicas (Stadtman, 1980). Os selenóis correspondem às formas de tióis, onde ocorre a substituição do átomo de S pelo átomo de Se (Klayman & Günther, 1973). Sua oxidação pode levar a formação de disseleneto.

O Se é um elemento traço essencial na dieta, cuja essencialidade nutricional foi demonstrada em 1957, em ratos (Schwartz & Foltz, 1957). Esse elemento é encontrado em alimentos como a castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (Dumont *et al.*, 2006). A ingestão diária de 50-200 μg para humanos foi proposta pela Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos.

Nos últimos anos, tem sido descrito que baixos níveis de Se podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e esclerose (Navarro-Alarcon & Lopez-Martinez, 2000). Desta maneira, a suplementação de dietas com Se tem sido aceita pela comunidade científica.

Este calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas sendo a mais importante a antioxidante. Exerce sua atividade biológica, através da incorporação do aminoácido selenocisteína (Sec) em uma única classe de proteínas chamadas selenoproteínas (Wang *et al.*, 2011). O Se atua como um cofator na família de enzimas glutationala-peroxidase (GPx) que protegem contra o estresse

oxidativo, a enzima GPx dependente de Se recicla glutatona, reduzindo a peroxidação lipídica, catalisando a redução de peróxidos, incluindo peróxido de hidrogênio (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008). Devido a essa função na GPx, o Se provavelmente interage com qualquer nutriente que afete o balanço anti e pró-oxidante celular (Navarro-Alarcon & Lopez-Martinez, 2000).

Embora o Se seja bem reconhecido como elemento traço essencial e apresente uma variedade de efeitos protetores para humanos e animais (Combs & Gray, 1998), sua toxicidade foi descrita ainda em 1941. Sabe-se que este micronutriente pode ocasionar toxicidade, como por exemplo na doença chamada “alkali disease”, decorrente da ingestão de plantas seleníferas, que acumulam grande quantidade de Se (Spallholz, 1994). Apesar do mecanismo pelo qual esse elemento exerce sua toxicidade não se encontrar completamente elucidado, vários estudos têm evidenciado que os efeitos tóxicos do Se estão relacionados com a sua habilidade em catalisar a oxidação de tióis endógenos e com a formação de radicais livres (Spallholz, 1994; Barbosa *et al.*, 1998).

Com base em evidências recentes de estudos humanos e laboratoriais sobre os potenciais riscos de Se à saúde em concentrações muito menores do que previamente assumidas, acredita-se que a reavaliação do padrão deste elemento para a água potável é uma questão importante para a saúde pública (Vinceti *et al.*, 2012) evidenciando a toxicidade do elemento.

Dessa forma o Se se destaca por sua bioquímica única, sua capacidade antioxidante e sua estreita janela terapêutica (Pinto *et al.*, 2011).

2.2. Compostos orgânicos de selênio e suas propriedades

Durante as últimas décadas, o interesse pelos compostos orgânicos de Se tem se intensificado, principalmente devido ao fato de que uma variedade destes compostos possui propriedades farmacológicas (Nogueira *et al.*, 2004). Sabe-se que organocalcogênios, podem ser melhores nucleófilos (e, portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos (Arteel & Sies, 2001). Diferentes classes de compostos orgânicos de Se exibem atividade mimética da GPx e decompõem peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos utilizando glutatona reduzida ou outros tióis como doadores de hidrogênio (Nogueira *et al.*, 2004).

Entre esses compostos podemos citar como exemplo o disseleneto de difenila (PhSe)₂. De fato, estudos em animais de laboratório demonstraram que o (PhSe)₂ apresenta propriedades anti-úlceras (Savegnago *et al.*, 2006), anti-inflamatória e antinociceptiva (Savegnago *et al.*, 2007) anti-hiperglicêmica (Barbosa *et al.*, 2006), neuroprotetora (Ghisleni *et al.*, 2003) e pode retardar o desenvolvimento de câncer (Barbosa *et al.*, 2008), também possui efeito protetor contra a lipoperoxidação em ratos e camundongos (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005).

Outro exemplo que podemos citar é o ebselen (2-fenil-1,2-benzilsoselenazol-3(2H)-ona) é um composto orgânico de selênio cujas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias têm merecido destaque no campo da farmacologia. Este composto foi descrito e caracterizado como um mimético da enzima GPx na década de 80 (Muller *et al.*, 1984), entretanto, apenas a partir da década de 90, cresceu enormemente o número de trabalhos demonstrando seus efeitos protetores em diferentes tipos celulares e para os mais diversos tipos de injúria. Esse composto apresenta propriedades antioxidantes, anti-nociceptiva, neuroprotetora e anti-inflamatória em diversos modelos experimentais (Meotti *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2003c; Porciuncula *et al.*, 2003), além de um estudo utilizando camundongos apoE -/- mostrou o efeito antiaterogênico do ebselen na aterosclerose associada à hiperglicemia (Chew *et al.*, 2009); um estudo recente mostrou um efeito protetor sobre o desenvolvimento de catarata (Aydemir *et al.*, 2012). Dessa forma, a atividade antioxidante exibida por compostos orgânicos de Se parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que tem o estresse oxidativo como processo central no seu desenvolvimento.

No entanto, apesar das propriedades farmacológicas benéficas de compostos orgânicos de Se estes também possuem efeitos tóxicos. Por exemplo: A exposição prolongada a altas doses de (PhSe)₂ causa neurotoxicidade em roedores (Nogueira *et al.*, 2003b). Inibição da atividade da enzima δ -ALA-D (Nogueira *et al.*, 2003a) e $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase (Borges *et al.*, 2005) foram observados e o potencial pró-oxidante do (PhSe)₂ parece estar envolvido nestes efeitos.

Além disso, pesquisas recentes relatam a toxicidade de diferentes compostos de Se inorgânico e orgânico em várias linhas de células humanas, incluindo uma linha de neurônios (Maraldi *et al.*, 2011); evidências sugerem que os efeitos tóxicos do Se podem ser altamente específicos para as espécies particulares de animais (Miller & Hontela, 2011; Holm *et al.*, 2005). Parnham e Graf (1991) relataram que

compostos orgânicos de Se apresentam toxicidade *in vivo* e esta toxicidade é dependente da estabilidade da ligação carbono-selênio.

2.3. O Telúrio

O elemento Te foi descoberto em 1782, mas somente posteriormente, foi isolado por Klaproth, que lhe deu o nome em homenagem á deusa da Terra (*Tellus*) (Chasteen *et al.*, 2009). Assim como o Se, o Te também pertence ao grupo dos calcogênios (grupo 16) na tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: telurato (Te^{+6}), telurito (Te^{+4}), telúrio elementar (Te^0) e telureto (Te^{-2}) (Scansetti, 1992). É encontrado com maior frequência na forma de teluretos de ouro, bismuto chumbo e prata. No Brasil, a química do Te foi introduzida pelo Prof. Reinbolt, o qual se dedicou ao estudo sistemático de compostos contendo Te e sua aplicabilidade em síntese orgânica (Zeni *et al.*, 2006; Comasseto *et al.*, 1997; Petragnani, 1995).

O Te^0 é utilizado como componentes de muitas ligas metálicas, na composição da borracha, na indústria de microchips e de componentes eletrônicos. Esse semi-metal também é utilizado na produção industrial de vidro e aço, e como um aditivo antidetonante na gasolina (Fairhill, 1969). Podendo ser encontrado em soluções oxidantes para polir metais (Yarema & Curry, 2005) e na indústria de semicondutores particulados (Zhang & Swihart, 2007; Green *et al.*, 2007). Possui ação bactericida, fungicida e inseticida (Kormutakova *et al.*, 2000; Toptchieva *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2009). Porém, o aumento do uso industrial de produtos químicos provoca riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana, e cresce a preocupação em relação aos potenciais efeitos adversos deste elemento.

Embora os casos de intoxicação ocupacional aguda por Te sejam raros, entretanto, quando ocorrem, os sintomas são: dores de cabeça, sonolência, náuseas, alterações da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho, na respiração e na urina (Muller *et al.*, 1989; Taylor, 1996). O Te pode ser prontamente absorvido pelo organismo em ratos, através da dieta e reduzido de telurito a telureto como metabólitos intermediários, com aumento na excreção urinária e redução na excreção fecal (Ogra *et al.*, 2008), principalmente na forma de

compostos orgânicos, mas também ocorre a absorção de Te inorgânico na forma de teluritos e teluratos (Larner, 1995).

Em contraste com o Se, o Te parece não ter nenhuma função biológica essencial em mamíferos, embora telurocisteína e telurometionina tenham sido detectados em algumas proteínas bacterianas (Boles *et al.*, 1995; Budisa *et al.*, 1995).

2.4. Compostos orgânicos de telúrio e suas propriedades

O primeiro composto orgânico de Te foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840 (Wöhler, 1840). Apenas a partir de 1970, os compostos orgânicos de Te começaram a ser explorados pelos químicos orgânicos, refletindo no crescimento exponencial de artigos publicados desde então (Klaman, 1990).

Em 1987, Sredni *et al.*, descreveram pela primeira vez uma atividade farmacológica para um composto orgânico de Te, ao demonstrarem as propriedades imunomoduladoras do composto codificado como AS-101 (telurato de tricloro amônio-dioxoetileno-O,O') em camundongos, mediando efeitos antitumorais (Hayun *et al.*, 2006). Estudos com alquinil vinil teluretos administrados por via oral, mostraram um efeito do tipo antidepressivo no teste de suspensão da cauda realizado em camundongos, sem alterar a locomoção destes animais (Okoronkwo *et al.*, 2009).

Além disso, estudos têm demonstrado que os diteluretos de diarila podem exibir atividade antioxidante (Engman *et al.*, 1995; Kanda *et al.*, 1999) e são capazes de mimetizar a atividade da enzima GPx (Andersson *et al.*, 1993), uma importante enzima endógena que participa de reações de neutralização de agentes pró-oxidantes. Estudos *in vitro* mostraram que um telureto vinílico, o dietil-2-fenil-telurofenil vinilfosfonato, possui efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica induzida por ferro (Avila *et al.*, 2006). Este composto não apresentou efeitos tóxicos significativos quando administrados sub-agudamente em camundongos pelas vias subcutânea e intraperitoneal (Avila *et al.*, 2006; Avila *et al.*, 2007); além de apresentar atividade antioxidante frente ao agente pró-oxidante nitroprussiato de sódio (SNP) e proteger contra a disfunção mitocondrial induzida por SNP em estruturas cerebrais, indicando possível atividade neuroprotetora *in vitro*, sem alterar

o sistema glutamatérgico (Avila *et al.*, 2008). Adicionalmente um estudo em *C. elegans* mostrou que o dietil-2-fenil-telurofenil vinilfosfonato mostrou-se capaz em reverter o dano oxidativo causado por Mn na sobrevivência á níveis indistinguíveis do controle, assim como na expectativa de vida dos nematóides. O mesmo estudo mostrou que este composto diminuiu os níveis de ERO geradas por Mn, bem como a carbonilação protéica e ainda foi capaz de modular a via do fator de transcrição DAF-16 (Avila *et al.*, 2012). Esses dados tomados em conjunto com estudos realizados em roedores reforçam o potencial antioxidante deste composto. Consequentemente, o emprego farmacológico de compostos organocalcogênios após os devidos ensaios clínicos poderá ocorrer nas próximas décadas.

Vários destes compostos, com diferentes características e estruturas químicas, vêm sendo estudados não apenas quanto as suas propriedades farmacológicas, mas também quanto as suas propriedades toxicológicas. Sabe-se que assim como o Te⁰ e os sais inorgânicos, os compostos orgânicos de Te são bastante tóxicos, e a intensidade desta toxicidade depende da estrutura do composto, da dose administrada e do tipo de animal testado (Nogueira *et al.*, 2004).

A toxicidade do Te parece estar relacionada com seu estado de oxidação (Van Vleet & Ferrans, 1977). O mecanismo proposto para explicar essa toxicidade envolve a oxirredução de grupos-SH de moléculas biologicamente ativas (Blais *et al.*, 1972; Young *et al.*, 1982; Deuticke *et al.*, 1992). De fato, os compostos de Te, inibem enzimas sulfidrílicas, entre elas a δ -ALA-D, esta enzima possui no seu sítio ativo dois resíduos cisteinil, que são facilmente oxidados *in vitro* e *in vivo* por compostos orgânicos de Te, levando a sua inibição (Barbosa *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 2003a); a esqualeno monooxigenase, enzima importante na biosíntese do colesterol que é o precursor da mielina (Laden & Porter, 2001); e a Na⁺, K⁺-ATPase, enzima importante para a atividade neuronal normal (Borges *et al.*, 2005).

Apesar da toxicidade que os compostos orgânicos de telúrio podem exercer sobre os organismos vivos, as possíveis propriedades farmacológicas terapeuticamente relevantes relatadas na literatura nos encorajam a avaliar novos compostos.

2.5. Xilofuranosídeos

A classe de compostos xilofuranosídeos são sintetizados a partir do carboidrato *D*-xilose que se apresenta como um monossacarídeo mais especificamente uma aldopentose, obtida em níveis industriais pela hidrólise da xilana com ácidos diluídos. Os derivados de carboidratos têm despontado como uma classe de compostos com grande potencial de estudos, devido à sua semelhança química com moléculas de ocorrência natural. Sabe-se que o metabolismo da xilose em leveduras consiste em sua redução a xilitol por intermédio da enzima xilose redutase que requer como cofator o NADPH + H⁺, seguida da oxidação à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, que requer como cofator o NAD (Felipe, 2003).

Os selenocarboidratos, em especial, têm sido alvo de estudos importantes para avaliação de suas atividades biológicas (Kobayashi *et al.*, 2002). Particularmente, um estudo utilizando selenocarboidratos mostrou que estes podem ter um papel regulador importante na síntese de melanina, sendo que selenocarboidratos derivados da *D*-glucose e *D*-galactose apresentaram efeitos inibitórios sobre a tirosinase, uma enzima que participa da síntese de melanina (Ahn *et al.*, 2006).

Adicionalmente um estudo recente mostrou a capacidade de Se-xilofuranosídeo em restaurar o dano causado por Cádmio (Cd) em tecido ovariano (Vargas *et al.*, 2012). Os autores reverteram a inibição da atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) causada por Cd em camundongos em um protocolo de pré ou pós tratamento com o Se-xilofuranosídeo.

Além disso, estudos prévios do nosso grupo, realizados *in vitro*, utilizando Te-xilofuranosídeo, mostraram que este exibiu importante atividade antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica em gema de ovo e fígado de camundongo quando esse foram expostos ao pró-oxidante sulfato ferroso, (dados não mostrados).

Sendo assim, estes estudos nos levam a hipotetizar o potencial benéfico dos compostos xilofuranosídeos sobre os organismos vivos.

2.6. Estresse oxidativo

Quando um elétron encontra-se sozinho em um orbital atômico, ele é dito desemparelhado. Espécies que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência são chamadas de radicais livres (RLs) e geralmente são altamente reativas (Halliwell & Gutteridge, 1990). O metabolismo basal das células aeróbicas produz continuamente RLs e espécies reativas (ERs) através da respiração e outras atividades metabólicas (Azbill *et al.*, 1997; Halliwell, 1994). Nos organismos aeróbios isso geralmente ocorre com a redução de uma molécula de oxigênio (O_2) a ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Visto que esta é uma reação de oxido-redução, é importante ressaltar que a formação do $O_2^{\cdot-}$ e outros RLs em seres vivos ocorrem principalmente onde há alto fluxo de elétrons como, por exemplo, na mitocôndria, onde os elétrons podem passar diretamente dos transportadores de elétrons para o oxigênio durante a cadeia respiratória (Halliwell, 1991).

As ERO possuem um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é na resposta imune a infecções. Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de O_2 , geralmente denominado queima ou explosão respiratória. Nesse processo, o O_2 consumido é convertido em $O_2^{\cdot-}$ através do complexo da NADPH oxidase, que é usado para eliminar bactérias e partículas engolfadas pelos fagócitos, no processo chamado de fagocitose (Halliwell, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1999). Além disso, as ERO também desempenham um papel importante na sinalização intracelular (Ray *et al.*, 2012).

As ERO e ERN são um importante fator de dano em muitos processos patológicos e toxicológicos. Sob condições normais, os sistemas antioxidantes celulares minimizam os danos causados pelas ERO, porém, quando a produção de RLs excede a capacidade protetora da célula, tem-se o estresse oxidativo. As principais ERO e ERN vinculadas ao estresse oxidativo são o $O_2^{\cdot-}$, o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o H_2O_2 , o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (Halliwell, 1989). Sabe-se que o estresse oxidativo está relacionado com o aparecimento de diversas doenças entre elas aterosclerose, câncer, catarata, isquemia, enfisema pulmonar, diabetes mellitus, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e cirrose hepática (Johnson, 2004; Halliwell & Gutteridge, 1990; Floyd, 1990; Cohen, 1989; Alexi *et al.*, 2000).

Os estudos sobre a toxicidade das ERO/ERN têm sido acompanhados por pesquisas sobre o uso de antioxidantes, de moléculas com atividade neutralizante de espécies reativas e até mesmo de moléculas que estimulem antioxidantes endógenos. Dentre os antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular hidrofílicos e lipofílicos estão incluídos as vitaminas A, E e C, flavonóides, ubiquinonas e o conteúdo de glutathiona reduzida (Gianni *et al.*, 2004). Existem ainda defesas antioxidantes enzimáticas entre elas destacam-se a superóxido dismutase, a catalase, e as enzimas do ciclo redox da glutathiona.

Assim, o estudo de novos compostos de Se e Te, com potenciais antioxidantes para detoxificar diferentes ERs e/ou ativar fatores de transcrição das enzimas antioxidante, pode representar alternativas terapêuticas para controlar o dano oxidativo.

2.7. O manganês

O manganês (Mn) constitui cerca de 0,1% da crosta terrestre, sendo o décimo segundo elemento mais prevalente naturalmente na crosta da Terra. É um elemento essencial presente em todos os organismos vivos, bem como em pedras, óleo, água e alimentos. O Mn é requerido para o metabolismo normal de aminoácidos, lipídeos, proteínas e carboidratos. No cérebro de mamíferos, pequenas quantidades de Mn são necessárias para o desenvolvimento do cérebro, para a homeostase celular e para a atividade de várias enzimas, tais como Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD), uma enzima importante para o sistema antioxidante em células eucariotas, glutamina sintetase (enzima que metaboliza o glutamato a glutamina), arginase (enzima importante no ciclo da uréia) (Aschner & Aschner, 2005; Avila *et al.*, 2010).

Não há dose diária recomendada de Mn. Entretanto, foi estabelecida uma ingestão diária recomendada e segura de 2-5mg/dia para adultos (Greger, 1998). Considerada a essencialidade do Mn, uma série de fatores tem sido associados com à restrição severa à ingestão de Mn, tais como: redução na fertilidade e defeitos no nascimento, bem como tolerância anormal à glicose, metabolismo lipídico e de carboidratos (Keen *et al.*, 1999).

No entanto, a exposição excessiva ao Mn aumenta a deposição cerebral do referido metal, culminando na neurodegeneração dopaminérgica (Figura I) e em uma

síndrome extrapiramidal referida como manganismo, que compartilha algumas características da doença de Parkinson (Benedetto *et al.*, 2010). O Mn no estado de oxidação Mn^{3+} é um potente agente oxidante e pode acelerar a oxidação de dopamina (DA) (Figura I), podendo explicar assim a drástica diminuição dos níveis de DA, porque esta reação parece ser irreversível (Diaz-Veliz *et al.*, 2004). A neurotoxicidade do Mn parte de mecanismo comum, disfunção mitocondrial, ou seja, esgotamento de ATP, transdução de sinal aberrante, estresse oxidativo, agregação de proteínas e ativação de vias de morte celular (Benedetto *et al.*, 2009). Adicionalmente, sabe-se que o Mn pode causar danos oxidativos por inibir os complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória, a qual é seguida pela disfunção mitocondrial, e por um aumento substancial na formação de ERO, especialmente do superóxido, que é substrato para a SOD (Gunter *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004).

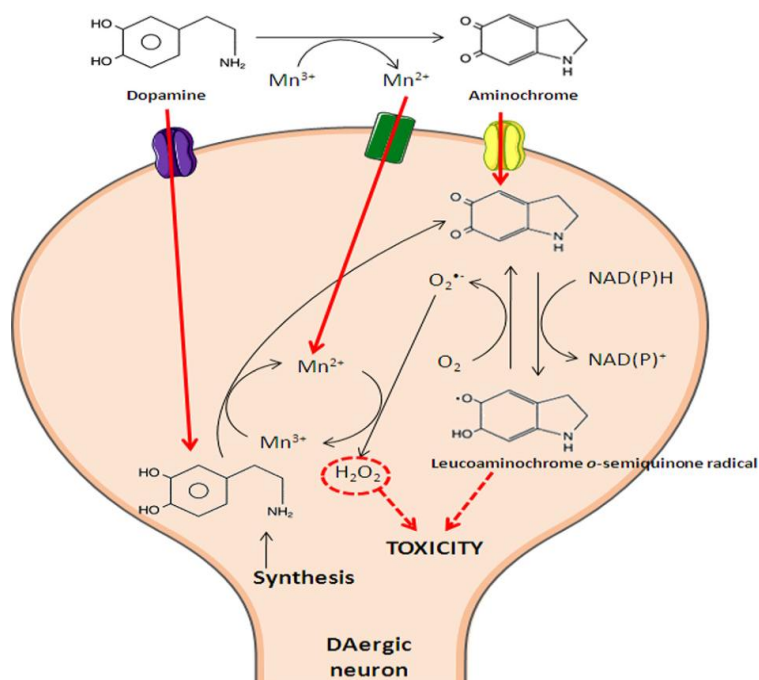


Figura I. Oxidação dopaminérgica induzida por Mn.

Fonte. (Farina *et al.*, 2013)

2.8. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (Caeno-recente; rhabditis-redondo; elegans-elegante) (*C. elegans*) é um nematóide de vida livre da família Rhabditidae que mede cerca de

1 milímetro de comprimento e vive normalmente no solo. Nas últimas décadas, descobertas importantes com relevância para os mamíferos foram realizadas usando este nematóide.

Isso foi possível porque há uma forte conservação entre o *C. elegans* e os mamíferos em princípios celulares e moleculares. Estima-se que 60%-80% dos genes humanos possuem homólogos em *C. elegans* (Kaletta & Hengartner, 2006). É o ser vivo mais utilizado para estudos de biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e de ecotoxicologia (Schierenberg & Wood, 1985). Em contraste com os estudos com células livres e cultura de células, o *C. elegans* permite a investigação dentro do contexto de um organismo completo, com diferentes células funcionando em consonância com diferentes sistemas (Kaletta & Hengartner, 2006).

Este verme é de fácil manipulação, sendo mantido em placas de Petri com meio NGM (*Nematode Growth Media*) e alimenta-se de várias estirpes de bactéria *Escherichia coli* (OP50). Os *C. elegans* possuem uma longevidade de duas a três semanas, em condições de crescimento normais (~20 °C). Durante o desenvolvimento pós-embrionário passam por quatro fases larvais (L1-L4) até ao estágio adulto, dando origem a uma extensa descendência (>200 vermes) por autofecundação (Figura II). Além disso, sua transparência proporciona também grandes vantagens, em particular no estudo dos efeitos tóxicos, marcadores fluorescentes em genes repórteres, os quais podem ser observados nos animais vivos.

Entre os genes repórteres podemos citar o DAF-16, que é um fator de transcrição homólogo ao fator de transcrição pertencente á família das proteínas FOXO. O DAF-16 funciona como um fator de transcrição que atua na via da sinalização insulina/IGF-1 controla vários processos biológicos tais como longevidade, reserva lipídica, reprodução, resposta ao estresse, termotolerância, resistência a patógenos, metabolismo e autofagia (Lee *et al.*, 2003), regulando a formação da larva dauer (estágio de atividade metabólica baixa durante a restrição calórica).

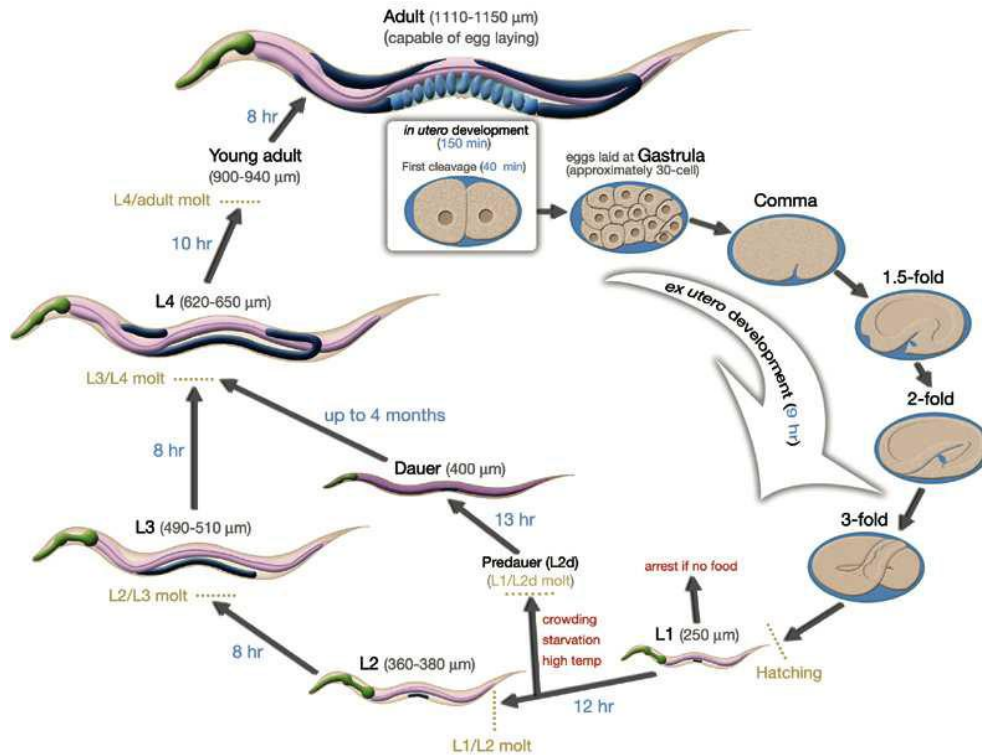


Figura II. Ciclo de vida do *C. elegans*.

Fonte: wormatlas

A via da sinalização insulina/IGF-1 (Figura III) é iniciada pelo receptor DAF-2, o homólogo do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos. Quando DAF-2 é ativado fosforila a fosfoinositol 3-quinase, AGE-1, gerando PIP3, que por sua vez recruta as kinases AKT-1, AKT-2, SGK-1 e PDK-1 para a membrana plasmática onde PDK-1 fosforila AKT e SGK-1. O complexo AKT-1/AKT-2/SGK-1 fosforila o fator de transcrição DAF-16, sequestrando-o no citoplasma e então prevenindo a ativação ou repressão de genes-alvos no núcleo (Landis & Murphy, 2010). O papel desta via de sinalização na longevidade e no metabolismo é conservado em *C. elegans*, *Drosophila* e mamíferos. A via do DAF-2/insulina/IGF1 regula a expressão de várias enzimas de detoxificação, tais como superóxido dismutase e catalases (Murphy *et al.*, 2003). Dessa maneira, o estudo da via de sinalização do DAF-16 pode ser uma valiosa ferramenta para verificar se os compostos orgânicos Se e Te-xilofuranosídeos estimulam a transcrição de enzimas antioxidantes.

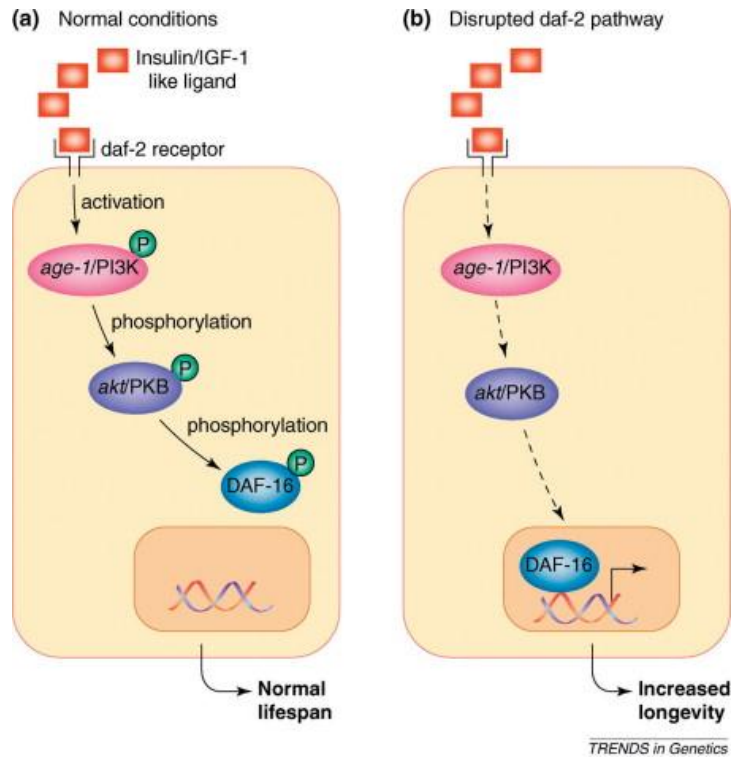


Figura III. Via de sinalização semelhante à insulina/IGF-1

Fonte. (Carter *et al.*, 2002)

3. JUSTIFICATIVA

O presente estudo justifica-se pela utilização de um modelo alternativo, o *C. elegans*, para uma primeira análise *in vivo* sobre a eficácia de compostos xilofuranosídeos em atenuar danos oxidativos induzidos por Mn. Visto que os derivados de carboidratos têm despontado como uma classe de compostos com grande potencial de estudos, devido à sua semelhança química com moléculas de ocorrência natural e ainda por esses compostos serem menos lipofílicos do que os compostos clássicos como ebselen e disseleneto de difenila. Em particular, focou-se na capacidade do Se- e Te-xilofuranosídeos, em modular vias de sinalização que aumentariam a proteção antioxidante de maneira indireta, o que contribuiria para aumentar a expressão de enzimas antioxidantes em *C. elegans*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antioxidante de xilofuranosídeos contendo selênio e telúrio bem como investigar e os mecanismos moleculares desta atividade em *Caenorhabditis elegans*.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar a dose letal 50% LD₅₀ em *C. elegans* de compostos Se e Te-xilofuranosídeos.
- Determinar se os compostos causam toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento.
- Avaliar se os compostos podem aumentar a longevidade de *C. elegans* e se esta alteração se deve à migração do fator de transcrição DAF-16 para o núcleo.
- Avaliar se Se e Te-xilofuranosídeos são capazes de aumentar a expressão da enzima superóxido dismutase, bem como sua atividade.
- Avaliar se os danos causados pelo manganês na longevidade podem ser revertidos/ prevenidos pelos compostos em *C. elegans*.
- Avaliar por ensaios bioquímicos se os danos oxidativos causados pelo manganês podem ser revertidos/ prevenidos pelos compostos.
- Dosar a quantidade de manganês absorvida pelos nematóides.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está apresentado da mesma forma que foi submetido à Revista **Biochemical Pharmacology**.

**Seleno- and Telluro-Xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity
in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway**

Suzi G. N. Wollenhaupt^a, Ana Thalita Soares^a, Willian G. Salgueiro^a, Simone NoreMBERG^b, Denise Bohrer^b, Priscila Gubert^b, Felix A. Soares^b, Ricardo F. Affeldt^c, Diogo S. Lüdtke^c, Francielli W. Santos^d, Cristiane C. Denardin^a, Michael Aschner, Daiana S. Avila^{a*}.

^aGrupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe), Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^dLaboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

^eDivision of Clinical Pharmacology and Pediatric Toxicology, Department of Pediatrics, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37240, USA

Corresponding author: Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil. Phone: 55-55-3413-4321/ FAX: 55-55-3413-4321. E-mail: avilads1@gmail.com

Abstract

Organochalcogens are promising pharmacological agents that possess significant biological activities. Nevertheless, because of the complexity of mammalian models, it has been difficult to determine the molecular pathways and specific proteins that are modulated in response to treatments with these compounds. The nematode worm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is an alternative experimental model that affords easy genetic manipulations, green fluorescent protein tagging and *in vivo* live analysis of toxicity. Abundant evidence points to oxidative stress in mediating manganese (Mn)-induced toxicity. In this study we challenged worms with Mn, a known pro oxidizing agent, and investigated the efficacy of selenium (Se)- and tellurium (Te)- xylofuranosides in reversing and/or protecting the worms from Mn-induced toxicity. In addition, we investigated their putative mechanism of action. First, we determined the lethal dose 50% (LD₅₀) and the effects of the xylofuranosides on various toxic parameters. This was followed by studies on the ability of xylofuranosides to afford protection against Mn-induced toxicity. Both Se- and Te-xylofuranosides reversed the Mn-induced reduction in survival, decreased reactive oxygen species (ROS) production, and increased the expression of superoxide dismutase (SOD-3), indicating that increased survival was associated with decreased oxidative stress. Furthermore, we observed that the xylofuranosides induced nuclear translocation of the transcription factor DAF-16/FOXO, which in the worm is known to regulate stress responsiveness, aging and metabolism. These findings suggest that xylofuranosides attenuate Mn-induced ROS generation, at least in part, by regulating the DAF-16/FOXO signaling pathway.

Key-words: xylofuranoside, *C. elegans*, oxidative stress, DAF-16, SOD, manganese.

1. Introduction

The essential trace element selenium (Se) is of fundamental importance to human health. As a constituent of the small group of selenocysteine-containing selenoproteins, Se participates in important enzymatic reactions (Papp et al., 2007). In contrast to Se, tellurium (Te) does not serve known essential biological functions in living systems, although tellurocysteine and telluromethionine have been detected in some bacterial proteins (Boles et al., 1995; Budisa et al., 1995).

Organochalcogens are promising pharmacological agents that possess significant biological activities (Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2004). Selenium compounds possess antinociceptive and anti-inflammatory (Jesse et al., 2009), antisecretory and antiulcer (Savegnago et al., 2006c), antioxidant (Borges et al., 2008; Imai et al., 2003; Prigol et al., 2009; Santos et al., 2005) properties. On the other hand, tellurium compounds also present neuroprotective (Avila et al., 2010), hepatoprotective (Avila et al., 2011), anticancer (Engman et al., 2003) properties. The beneficial effects of organochalcogens are attributed, at least in part, to their antioxidant activity (Acker et al., 2009; Prigol et al., 2008; Souza et al., 2009) as they are potent ROS scavengers (Nogueira et al., 2004). Hence, researchers have increasingly sought to develop natural and synthetic organochalcogens with antioxidant activity and to decipher their molecular mechanisms of action (Affeldt, 2012; Braga, 2010a; Braga et al., 2010b).

The compounds tested herein were synthesized from carbohydrate D-xylose, and are referred to as xylofuranosides. Because of the complexity of mammalian models, it has been difficult to determine the molecular pathways and specific proteins that are modulated in response to treatments with these compounds.

We used *C. elegans*, a free-living nematode that lives mainly in the liquid phase of soils and is the first multicellular organism to have its genome completely sequenced.

The worms' genome shows an unexpectedly high level of conservation with the vertebrate genome, which makes *C. elegans* an ideal system for genetic, molecular and developmental studies (Bettinger et al., 2004; Brenner, 1974; Leacock and Reinke, 2006; Schafer, 2006; Schroeder, 2006). The straightforward generation of knockout strains for genes of interest and of transgenic worms expressing green fluorescent protein (GFP)-tagged proteins make it an ideal model for expression or protein localization studies (Chalfie et al., 1994; Gerstein et al., 2010; Helmcke et al., 2010). The short life-cycle, easy and inexpensive maintenance, and detailed characterization of the complete cell lineage (zygote to adult) allow the utilization of rapid, low-cost tests that readily lend themselves to mechanistic studies of toxicant action (Peterson et al., 2008), including Mn-induced toxicity (Benedetto et al., 2010).

Exposure to excessive Mn levels, increased brain Mn deposition leads to dopaminergic (DAergic) neurodegeneration and an extrapyramidal syndrome referred to as manganism, which shares multiple clinical features with Parkinson's disease (PD) (Benedetto et al., 2010). Oxidative stress mediates, at least in part, Mn-induced toxicity and is associated with compromised antioxidant defenses (Benedetto et al., 2009; Erikson et al., 2006).

C. elegans possess antioxidant defense system analogous to those inherent to mammals. Among them is SOD, the gene *sod-3* encodes the mitochondrial Mn-SOD isoform (Giglio et al., 1994), which is regulated by the insulin/IGF-like signaling (IIS) pathway. Moreover, an increase or decrease in antioxidant defenses, such as SOD-3, requires mediators of the stress response, such as the transcription factor DAF-16, a homolog of mammalian FOXO (forkhead box O subclass of transcription factors).

In the present study, we sought to determine the efficacy of the xylofuranosides compounds with antioxidant activity to attenuate Mn-induced ROS. Specifically, we hypothesized that the Se- and Te-containing xylofuranosides will rescue *C. elegans* from the Mn-induced toxicity. We focused specifically on the efficacy of the xylofuranosides compounds in attenuating Mn-induced ROS generation and their mechanism/s of action.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Compound 1 {(3aR,5S,6R,6aR)-2,2-dimethyl-5-(p-tolylselanyl-methyl) tetrahydrofuro [2,3-d] [1,3] dioxol-6-ol} (Se compound), Compound 2 {(3aR,5S,6R,6aR)-2,2-dimethyl-5-(p-tolyltellanyl-selanyl-methyl) tetrahydrofuro [2,3,d] [1,3]dioxol-6-ol} (Te compound) (Figure 1A and 1B) were synthesized according to previously described methods Braga et al., (2010a). All the other reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO). These xylofuranosides were chosen based on a pre-screening of their scavenger activity *in vitro* using egg yolk and mouse liver assays (data not shown).

2.2 *C. elegans* strains and handling of the worms

C. elegans Bristol N2 (wild type), TJ356 (DAF-16::GFP) and CF1553 (SOD-3::GFP) (muls84n) were handled and maintained at 20°C on *E. coli* OP50/NGM (nematode growth media) plates as previously described by Brenner (1974). All strains were obtained from Caenorhabditis Genetics Center (CGC, Minnesota). Synchronous L1 population were obtained by isolating embryos from gravid hermaphrodites using bleaching solution (1% NaOCl; 0.25M NaOH), followed by floatation on a sucrose gradient to segregate eggs from dissolved worms and

bacterial debris, accordingly to standard procedures previously described by Stiernagle (1999).

2.3 Dose-response curves and acute Mn exposure treatments

The lethal dose 50% (LD₅₀) of Compound 1 and Compound 2 in *C. elegans* was determined with doses ranging from 0.01 to 2.25 mM. Synchronized L1 worms (2.500) were treated for 30 min with each of the Xylofuranosides, followed by three washes with 85 mM NaCl solution. Worms were placed on OP50 seeded NGM plates and dose-response curves were plotted from scoring the number of surviving worms on each dish at 24h post-exposure. LD₅₀ values were obtained from these curves. Xylofuranosides' doses below the LD₀₅ (5% lethality) were chosen for subsequent experiments.

To assess the effect of xylofuranoside on Mn-exposed animals, we pre- or post-treated (2.500) worms for 30 min with doses below the LD₀₅ of each Compound and 30 min with Mn 75 mM as follows: pre-treatment {Group 1: DMSO/H₂O; Group 2: DMSO/Mn 75 mM; Group 3: Compound 1 or 2 (0.1 μM)/Mn 75 mM; Group 4: Compound 1 or 2 (10 μM)/Mn 75 mM and Group 5: Compound 1 or 2 (25 μM)/Mn 75 mM}; post-treatment {Group 1: H₂O/DMSO; Group 2: Mn 75 mM/DMSO; Group 3: Mn 75 mM/Compound 1 or 2 (0.1 μM); Group 4: Mn 75 mM/Compound 1 or 2 (10 μM) and Group 5: Mn 75 mM/Compound 1 or 2 (25 μM) }; followed by three washes in NaCl 85 mM. Next, worms were placed on OP50 seeded NGM plates. Scoring of surviving worms was performed 24h after exposure. For all dose-response curves, scores were normalized to percent of control (0 mM xylofuranoside/0 mM MnCl₂ exposure). The Mn dose was based on a dose-response curve performed in pilot studies (data not shown).

2.4 Lifespan experiments

Synchronized L1 worms (1.500) were acutely exposed to the xylofuranoside compounds as described earlier. Live and healthy-looking worms (around 20 per condition in duplicates) were collected on the same day at the late L4 stage and transferred every four days to new OP50-seeded NGM plates. Survival was assessed each day until all worms died. All tested *C. elegans* strains were assessed in parallel, and each experiment was performed in triplicates. Plotted curves represent averages of three independent experiments.

2.5 Brood size

Synchronized L1 worms (1.500) were acutely exposed to the xylofuranosides as previously described. After 24h, worms were individually transferred to new NGM plates seeded with OP50. For assessing brood size, nematodes were monitored and transferred to a new plate every 1.5 days, and the total number of eggs released on the plates was scored (Guo et al., 2009). The data were expressed as percent of control. The experiments were repeated triplicates in three independent worm preparations.

2.6 Fluorescence quantification

GFP fluorescence was assayed with a plate reader (CHAMELEON™V Hidex Model 425-106). Synchronized L1 worms (1.500) were acutely exposed to the xylofuranosides as previously described. Control or treated worms (1.500 per group) were pipetted into 100 µL of M9 buffer to each well (of a 96-well plate), and total GFP fluorescence was measured with 485 nm excitation and 530 nm emission filters. Quadruplicates were used for each determination.

2.7 ROS measurement

Synchronized L1 worms (10 000) per condition were acutely treated with each of the xylofuranosides and/or Mn (0 or 50 mM), as previously described. Next the worms were homogenized by sonication and centrifuged. The supernatants were transferred to a 96-well plate and 2'7' dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) was added at a final concentration of 3.25 mM. Fluorescence intensity was measured (excitation: 485 nm; emission: 535 nm) as previously described (Liao et al., 2011), using a plate reader (CHAMELEON™V Hidex Model 425-106). The fluorescence from each well was measured for 120 min at 10 min intervals. Fluorescence measurements were normalized to time zero values, and changes in fluorescence (reflecting ROS levels) were expressed as percent control. The experiments were performed in triplicates in three independent worm preparations.

2.8 Epifluorescence microscopy

For each slide, at least 30 worms were mounted on 2% agarose pads in M9 and anaesthetized with 0.2% tricaine/0.02% tetramisole in M9. Image acquisitions and scoring were carried out with an epifluorescence microscope housed in air-conditioned room (20-22°C).

2.9 Mn analysis by atomic absorption spectrophotometry

Triplicates of 10 000 L1 worms per condition were treated with MnCl₂ 75mM as previously described. The samples were washed eight times with NaCl and subsequently dehydrated at 70°C for 3h and further digested in 200 µL ultrapure nitric acid for 2h in a sand bath (70°C). Analysis was carried out with an ANALYTIK Jena AG (Jena, Germany) model ZEE nit 600 atomic absorption spectrometer equipped with SpectrAA (Varian, Australia) hollow cathode lamps. A transversal Zeeman-effect background correction system operating in two or three-field was

used for graphite furnace measurements. Bovine liver digested in ultrapure nitric acid was used as internal standard (NSB Standard Reference Material; U.S. Department of Commerce, Washington, DC, USA; diluted at 5 µg Mn/L).

2.10 Statistics

Dose-response lethality curves, longevity curves and ROS content were generated with GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). We used a sigmoid dose-response model with a top constraint at 100% to draw the curves and determine the LD₅₀ or the average lifespan values reported in the graphs. Statistical analysis of significance was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) for the dose-response curves, longevity curves and ROS content, followed by *post-hoc* Tukey test when the overall p value was less than 0.05. In all figures, the bars represent the standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1 Dose-response curves for xylofuranosides

Using a sigmoid dose-response curve with a top constraint at 100% to determine the LD₅₀, the LD₅₀ for Se- and Te-xylofuranosides approximated 0.73 mM and 0.8 mM, respectively (Figure 2). In this assay, the worms showed similar tolerance to Te- and Se-xylofuranosides.

3.2 Effects of sublethal doses of Compounds 1 and 2 on Mn-induced toxicity

Mn (75 mM) caused ~40% decrease in worm survival. Pre-treatment for 30 min with below the LD₀₅ doses of Compound 1 (0.1 µM) protected the worms from the Mn-induced lethality; however at higher tested doses, Se-xylofuranosides failed to protect the worms from Mn-induced lethality (Fig. 3A; $p < 0.05$ compared to the Mn-treated group). This effect was absent in worms pre-treated with Te-xylofuranosides

prior to Mn (Fig. 3B). Post-treatment with below the LD₀₅ doses of Se-xylofuranosides (0.1 μ M and 10 μ M) reversed the Mn-induced lethality in the worms, restoring survival rate to levels indistinguishable from controls (Fig. 3C; $p < 0.05$ compared to the Mn-treated group). Te-xylofuranosides (10 μ M) also reversed the Mn-induced lethality (Fig. 3D; $p < 0.05$ compared to the Mn-treated group). However, the effects were not dose-dependent, and Se-xylofuranosides at 25 μ M failed to rescue the worms from the Mn-induced lethality. In contrast, post-treatment with Te-xylofuranosides effectively reversed the Mn-induced lethality both concentrations 10 and 25 μ M.

3.3 Life span and brood size followed xylofuranoside exposure

As shown in Fig. 4, treatments with Se-xylofuranosides (Fig.4A) or Te-xylofuranosides (Fig. 4B) at all tested doses had no effect on the worms' life-span. This data indicates that these compounds do not increase the worms' life-span. Next we examined the effects of xylofuranosides on *C. elegans* fertility by measuring brood size. As shown in Figures 5A, Se-xylofuranosides at the lowest tested dose (0.1 μ M) caused a significant increase in brood size vs. unexposed animals (Fig. 5A; $p < 0.05$ compared to the control group). In contrast, Te-xylofuranosides did not affect the brood size (Fig. 5B).

3.4 ROS levels

ROS levels were determined with the dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) dye, which is oxidized to the DCF fluorophore in the presence of free radicals. Mn exposure caused a significant increase in DCF-DA oxidation from $t = 30$ min, reflecting the generation of ROS (Fig. 6; $p < 0.0001$). Post-treatment with Te-xylofuranosides for 30 min at both 10 μ M or 25 μ M reversed the Mn-induced ROS generation (Fig. 6;

$p < 0.0001$). Se-xylofuranosides failed to fully reverse the Mn-induced effect on ROS generation in the worms.

3.5 Fluorescence quantification

An increase in SOD-3 expression was observed following treatment with both xylofuranosides (Fig.7A), suggesting increased levels of antioxidants. In agreement, treatments with both compounds caused increased translocation of the transcription factor DAF-16 to the nucleus (Fig. 8B, Control; Fig. 8C, Treated), consistent with the increased transcription of SOD-3 (Fig. 7).

3.6 Effects of Compound 2 on Mn levels

To determine whether Te-xylofuranosides affected net Mn uptake, we measured Mn levels in whole worms. Pre-treatment with Te-xylofuranosides and Mn did not alter Mn levels compared with worms treated with Mn alone, suggesting that Te-xylofuranosides does not affect net Mn fluxes (Figure 9).

4. Discussion

In the present study, we examined the antioxidant effect of two synthetic organochalcogens that belong to the xylofuranosides class (Fig. 1) using *C. elegans* as an experimental model and Mn as pro-oxidant. First, we analyzed the LD₅₀ for the xylofuranosides, noting an LD₅₀ of 0.73 mM for Se-xylofuranoside, a relatively high value for Se-containing Compounds when compared to previous studies (Avila et al., 2012), and 0.8 mM for Te-xylofuranoside (Fig.2). Next, we showed that Se-xylofuranoside confers protection against Mn-induced toxicity, and that both Se- and Te-xylofuranosides (each at specific doses) significantly attenuate the Mn-induced lethality. The rescue associated with these compounds appears to be mediated via the IIS pathway, consistent with nuclear translocation of the transcription factor

FOXO/DAF-16 (Fig.8 A and C) and increased levels of its target protein SOD-3 (Fig. 7A, B and D) in xylofuranoside treated animals.

The concept that Se- and Te-containing molecules may be more potent nucleophiles (and therefore antioxidants) than classical antioxidants has led to the design of synthetic organochalcogen compounds (Arteel and Sies, 2001). It has been noted that Se-containing molecules possess antinociceptive (Savegnago et al., 2006b) and anticancer (Wang et al., 2012) properties. Additionally a recent study demonstrated the ability of a Se-xylofuranoside to reverse cadmium (Cd)-induced damage in ovarian tissue (Vargas et al., 2012). Similarly, Te compounds showed antioxidant (Avila et al., 2008; Savegnago et al., 2006a) and hepatoprotective activities (Avila et al., 2011), promoted memory improvement (Souza et al., 2012), and exhibited anticancer properties (Sredni, 2012). Notably, several Te-containing compounds have been shown to possess antioxidants activity, with greater efficacy compared to their Se and sulfur analogue (Engman et al., 2000; Engman et al., 1995; Kanski et al., 2001; Wieslander et al., 1998). These findings are consistent with the high efficacy of Te-xylofuranoside in preventing lipid peroxidation in egg yolk and mouse liver *in vitro* (data not shown).

Both xylofuranoside failed to extend the life-span of *C. elegans* (Fig.4). This finding is in agreement with other authors, who demonstrated that the antioxidant epigallocatechin gallate (Brown et al., 2006; Zhang et al., 2009) and other organochalcogens that prevented oxidative stress, failed to alter life-span in wild-type worms under non-oxidative stress conditions (20°C) (Avila et al., 2012).

Furthermore, we evaluated the effect of xylofuanosides on *C. elegans* reproduction, noting an increase in brood size upon treatment with Se-xylofuranoside (at the lowest dose), whereas the highest dose had no effect (Fig. 5A). Our finding is

consistent with studies that observed an increase in brood size in worms treated with inorganic Se (Li et al., 2011). Se has long been recognized in animal husbandry as being essential for successful reproduction (Rayman, 2000). In contrast, the Te analogue compound did not cause significant changes in brood size (Fig. 5B). This is likely related to the fact that Te does not have any known biological activity. Notably, both compounds did not cause significant toxicity in the worms, thus leading us to test their efficacy in attenuating Mn-induced toxicity in *C. elegans*.

Mn is an essential metal and important for brain development and the functioning of multiple enzymes, such as Mn-SOD and glutamine synthase (Aschner et al., 2009). However, it is known that Mn can cause oxidative damage by inhibiting complexes I, II, III and IV of the respiratory chain, which is followed by mitochondrial dysfunction and by a substantial increase in ROS formation, especially superoxide, a substrate for SOD (Gunter et al., 2006; Zhang et al., 2004). Furthermore, Mn²⁺ is a potent dopamine (DA) oxidant, leading to the generation of DA quinone products, followed by DA depletion (Archibald and Tyree, 1987). The resulting quinone can initiate superoxide radical formation by the reduction to the semiquinone by NADH or NADPH-dependent flavoproteins, which is then readily oxidized by molecular oxygen to form superoxide radicals (Martinez-Finley et al., 2013). Notably, Benedetto et al. (2010), demonstrated that DA secreted by neurons and not intracellular DA is directly involved in the generation of ROS induced by Mn exposure in *C. elegans*.

Mn caused a decrease in worms' survival and an increase in ROS production. Se-xylofuranoside (at the lowest dose) protected the worms from the ill effects of Mn (observed after 24h exposure Fig. 3A). This finding may be explained by the essentiality of Se to the worm (Gladyshev et al., 1999). When worms were treated with Te-xylofuranoside, a trend towards protection was noted (Fig. 3B). Notably, both

Se- and Te-xylofuranosides also reduced Mn-induced worm mortality (observed after 24h of exposure, Fig. 3C and 3D), providing further evidence for the ability of these compounds to reverse the Mn-induced toxicity.

Te-xylofuranoside reversed the Mn-induced effects by decreasing oxidative stress. ROS generation, assayed by DCF-DA dye fluorescence, was significantly decreased in Mn-treated worms by Te-xylofuranoside (Fig.6). These effects coincided with increased expression levels of SOD (Fig.7 B) and the translocation of DAF-16 to the nucleus (Fig.8 A). The attenuating in Mn-induced ROS levels by Te-xylofuranoside may be attributed to its free radical-scavenging capacity (data not shown) and the up-regulation of stress-resistance-related proteins, such as SOD-3 (Wu et al., 2012; Zhang et al., 2009).

The IIS cascade commences with the binding of insulin-like ligands to the receptor DAF-2, which phosphorylates a PI3-kinase encoded by the gene *age-1*. Thereafter, the signals are transduced via the protein kinases PDK-1, AKT-1/AKT-2 and SGK-1 to the FOXO transcription factor DAF-16, representing the prime target of this cascade (Houthoofd and Vanfleteren, 2007). DAF-16, a transcription factor and the worm's orthologue of mammalian FOXO, translocates from the cytosol to the nucleus, binds to a daf-16 binding element, (forkhear box O) and activates the expression of target genes that codify antioxidant enzymes, such as SOD-3. Here we report that Te-xylofuranoside increased DAF-16 translocation to the nucleus, increasing SOD-3 expression, thus neutralizing ROS generated in response to Mn treatment.

Sub-chronic co-treatment with organochalcogen in animals chronically treated with Mn reduced striatal Mn levels compared with controls (Avila et al., 2010). In contrast, a recent study in *C. elegans* showed that treatment with other classes of

organochalcogens failed to affect Mn levels in the worm (Avila et al., 2012). Therefore, we investigated whether the efficacy of Te-xylofuranoside in decreasing ROS generation in response to Mn treatment was due to reduced net Mn uptake in worms. Our results showed no change after treatment with Te-xylofuranoside, with Mn levels being indistinguishable from those found in Mn alone treated worms. This suggests that the Te present in this Xylofuranoside does not compete with Mn carriers (Fig. 9), consistent with lack of Te uptake via Mn transporters.

5. Conclusion

Se and Te-xylofuranosides did not increase worms' longevity, yet treatment with Se-xylofuranoside significantly increased brood size. Additionally, both compounds led to nuclear translocation of the transcription factor DAF-16, resulting in increased SOD-3 expression. As a consequence, Se and Te-xylofuranosides were efficient in preventing and/or reversing the oxidative damage caused by Mn in *C. elegans*. Furthermore, Te-xylofuranoside also exhibited ROS sequestering activity, reducing Mn-induced oxidative stress in the worms. Combined, these findings illustrate the utility of the worm model in elucidating protective and toxic mechanisms, meriting further pharmacologic characterization of the xylofuranosides as potential antioxidants.

Acknowledgements

Authors would like to acknowledge the financial support provided by grants from the FAPERGS- ARD 11/1673-7 and CNPq- Universal 476471/2011-7 and scholarships from FAPERGS, CNPq and UNIPAMPA (PBDA).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Acker, C.I., Brandao, R., Rosario, A.R., Nogueira, C.W., 2009. Antioxidant effect of alkynylselenoalcohol compounds on liver and brain of rats in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol* 28, 280-287.
- Affeldt, R.F.B., H. C.; Baldassari, L. C.; Lüdtke, D. S. , 2012. Synthesis of Selenium-linked Glycoconjugates and Disaccharides. *Tetrahedron* 68, 10470-10475.
- Archibald, F.S., Tyree, C., 1987. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch Biochem Biophys* 256, 638-650.
- Arteel, G.E., Sies, H., 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol* 10, 153-158.
- Aschner, M., Erikson, K.M., Herrero Hernandez, E., Tjalkens, R., 2009. Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology. *Neuromolecular Med* 11, 252-266.
- Avila, D.S., Benedetto, A., Au, C., Manarin, F., Erikson, K., Soares, F.A., Rocha, J.B., Aschner, M., 2012. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 52, 1903-1910.
- Avila, D.S., Colle, D., Gubert, P., Palma, A.S., Puntel, G., Manarin, F., NoreMBERG, S., Nascimento, P.C., Aschner, M., Rocha, J.B., Soares, F.A., 2010. A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol Sci* 115, 194-201.
- Avila, D.S., Gubert, P., Palma, A., Colle, D., Alves, D., Nogueira, C.W., Rocha, J.B., Soares, F.A., 2008. An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Res Bull* 76, 114-123.
- Avila, D.S., Palma, A.S., Colle, D., Scolari, R., Manarin, F., da Silveira, A.F., Nogueira, C.W., Rocha, J.B., Soares, F.A., 2011. Hepatoprotective activity of a vinylic telluride against acute exposure to acetaminophen. *Eur J Pharmacol* 661, 92-101.
- Benedetto, A., Au, C., Aschner, M., 2009. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. *Chem Rev* 109, 4862-4884.

Benedetto, A., Au, C., Avila, D.S., Milatovic, D., Aschner, M., 2010. Extracellular dopamine potentiates mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 6.

Bettinger, J.C., Carnell, L., Davies, A.G., McIntire, S.L., 2004. The use of *Caenorhabditis elegans* in molecular neuropharmacology. *Int. Rev. Neurobiol* 62, 195-212.

Boles, J.O., Lebioda, L., Dunlap, R.B., Odom, J.D., 1995. Telluromethionine in structural biochemistry. *SAAS Bull Biochem Biotechnol* 8, 29-34.

Borges, L.P., Brandao, R., Godoi, B., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2008. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chem Biol Interact* 171, 15-25.

Braga, H.C., Stefani, H.A., Paixao, M.W., Santos, F.W., Ludtke, D.S., 2010a. Synthesis of 5'-seleno-xylofuranosides. *Tetrahedron* 66, 3441-3446.

Braga, H.C., Wouters, A.D., Zerillo, F.B., Ludtke, D.S., 2010b. Synthesis of seleno-carbohydrates derived from D-galactose. *Carbohydr Res* 345, 2328-2333.

Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.

Brown, M.K., Evans, J.L., Luo, Y., 2006. Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and alpha-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol Biochem Behav* 85, 620-628.

Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J., Huber, R., 1995. High-Level Biosynthetic Substitution of Methionine in Proteins by Its Analogs 2-Aminohexanoic Acid, Selenomethionine, Telluromethionine and Ethionine in *Escherichia-Coli*. *Eur J Biochem* 230, 788-796.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression. *Science* 263, 802-805.

Engman, L., Al-Maharik, N., McNaughton, M., Birmingham, A., Powis, G., 2003. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. *Bioorgan Med Chem* 11, 5091-5100.

Engman, L., Kandra, T., Gallegos, A., Williams, R., Powis, G., 2000. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer Drug Des* 15, 323-330.

Engman, L., Persson, J., Vessman, K., Ekstrom, M., Berglund, M., Andersson, C.M., 1995. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Radic Biol Med* 19, 441-452.

Erikson, K.M., Dorman, D.C., Fitsanakis, V., Lash, L.H., Aschner, M., 2006. Alterations of oxidative stress biomarkers due to in utero and neonatal exposures of airborne manganese. *Biol Trace Elem Res* 111, 199-215.

Gerstein, M.B., Lu, Z.J., Van Nostrand, E.L., Cheng, C., Arshinoff, B.I., Liu, T., Yip, K.Y., Robilotto, R., Rechtsteiner, A., Ikegami, K., Alves, P., Chateigner, A., Perry, M., Morris, M., Auerbach, R.K., Feng, X., Leng, J., Vielle, A., Niu, W., Rhrissorrakrai, K., Agarwal, A., Alexander, R.P., Barber, G., Brdlik, C.M., Brennan, J., Brouillet, J.J., Carr, A., Cheung, M.S., Clawson, H., Contrino, S., Dannenberg, L.O., Dernburg, A.F., Desai, A., Dick, L., Dose, A.C., Du, J.A., Egelhofer, T., Ercan, S., Euskirchen, G., Ewing, B., Feingold, E.A., Gassmann, R., Good, P.J., Green, P., Gullier, F., Gutwein, M., Guyer, M.S., Habegger, L., Han, T., Henikoff, J.G., Henz, S.R., Hinrichs, A., Holster, H., Hyman, T., Iniguez, A.L., Janette, J., Jensen, M., Kato, M., Kent, W.J., Kephart, E., Khivansara, V., Khurana, E., Kim, J.K., Kolasinska-Zwierz, P., Lai, E.C., Latorre, I., Leahey, A., Lewis, S., Lloyd, P., Lochovsky, L., Lowdon, R.F., Lubling, Y., Lyne, R., MacCoss, M., Mackowiak, S.D., Mangone, M., McKay, S., Mecnas, D., Merrihew, G., Miller, D.M., Muroyama, A., Murray, J.I., Ooi, S.L., Pham, H., Phippen, T., Preston, E.A., Rajewsky, N., Ratsch, G., Rosenbaum, H., Rozowsky, J., Rutherford, K., Ruzanov, P., Sarov, M., Sasidharan, R., Sboner, A., Scheid, P., Segal, E., Shin, H.J., Shou, C., Slack, F.J., Slightam, C., Smith, R., Spencer, W.C., Stinson, E.O., Taing, S., Takasaki, T., Vafeados, D., Voronina, K., Wang, G.L., Washington, N.L., Whittle, C.M., Wu, B.J., Yan, K.K., Zeller, G., Zha, Z., Zhong, M., Zhou, X.L., Ahringer, J., Strome, S., Gunsalus, K.C., Mickle, G., Liu, X.S., Reinke, V., Kim, S.K., Hillier, L.W., Henikoff, S., Piano, F., Snyder, M., Stein, L., Lieb, J.D., Waterston, R.H., Consortium, m., 2010. Integrative Analysis of the *Caenorhabditis elegans* Genome by the modENCODE Project. *Science* 330, 1775-1787.

Giglio, M.P., Hunter, T., Bannister, J.V., Bannister, W.H., Hunter, G.J., 1994. Manganese Superoxide-Dismutase Gene of *Caenorhabditis-Elegans*. *Biochem Mol Biol Int* 33, 37-40.

Gladyshev, V.N., Krause, M., Xu, X.M., Korotkov, K.V., Kryukov, G.V., Sun, Q.A., Lee, B.J., Wootton, J.C., Hatfield, D.L., 1999. Selenocysteine-containing thioredoxin reductase in *C. elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 244-249.

Gunter, T.E., Gavin, C.E., Aschner, M., Gunter, K.K., 2006. Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 27, 765-776.

Guo, Y., Yang, Y., Wang, D., 2009. Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages. *Reprod Toxicol* 28, 90-95.

Helmcke, K.J., Avila, D.S., Aschner, M., 2010. Utility of *Caenorhabditis elegans* in high throughput neurotoxicological research. *Neurotoxicol Teratol* 32, 62-67.

Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R., 2007. Public and private mechanisms of life extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Genet Genomics* 277, 601-617.

Imai, H., Graham, D.I., Masayasu, H., Macrae, I.M., 2003. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 34, 56-63.

Jesse, C.R., Savegnago, L., Nogueira, C.W., 2009. Mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of bis selenide in mice. *J Pharm Pharmacol* 61, 623-630.

Kanski, J., Drake, J., Aksenova, M., Engman, L., Butterfield, D.A., 2001. 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, 12-21.

Leacock, S.W., Reinke, V., 2006. Expression profiling of MAP kinase-mediated meiotic progression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 2, e174.

Li, W.H., Hsu, F.L., Liu, J.T., Liao, V.H., 2011. The ameliorative and toxic effects of selenite on *Caenorhabditis elegans*. *Food Chem Toxicol* 49, 812-819.

Martinez-Finley, E.J., Gavin, C.E., Aschner, M., Gunter, T.E., 2013. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*.

Meotti, F.C., Silva, D.O., Dos Santos, A.R., Zeni, G., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2003. Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. *Environ Toxicol Pharmacol* 15, 37-44.

Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104, 6255-6285.

Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A., Khanna, K.K., 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 9, 775-806.

Peterson, R.T., Nass, R., Boyd, W.A., Freedman, J.H., Dong, K., Narahashi, T., 2008. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology* 29, 546-555.

Prigol, M., Luchese, C., Nogueira, C.W., 2009. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. *Cell Biochem Funct* 27, 216-222.

Prigol, M., Wilhelm, E.A., Schneider, C.C., Nogueira, C.W., 2008. Protective effect of unsymmetrical dichalcogenide, a novel antioxidant agent, in vitro and an in vivo model of brain oxidative damage. *Chem Biol Interact* 176, 129-136.

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

Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B., Weis, S.N., Fachinetto, J.M., Favero, A.M., Nogueira, C.W., 2005. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact* 151, 159-165.

Savegnago, L., Borges, V.C., Alves, D., Jesse, C.R., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2006a. Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-buthyltelurenyl-2-methylthioheptene. *Life Sci* 79, 1546-1552.

Savegnago, L., Jesse, C.R., Moro, A.V., Borges, V.C., Santos, F.W., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2006b. Bis selenide alkene derivatives: A class of potential antioxidant and antinociceptive agents. *Pharmacol Biochem Behav* 83, 221-229.

Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2006c. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ Toxicol Pharmacol* 21, 86-92.

Schafer, W.F., 2006. Genetics of egg-laying in worms. *Annu Rev Genet* 40, 487-509.

Schroeder, F.C., 2006. Small molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chem Biol* 1, 198-200.

Souza, A.C., Acker, C.I., Gai, B.M., dos Santos Neto, J.S., Nogueira, C.W., 2012. 2-phenylethynyl-butyltellurium improves memory in mice. *Neurochem Int* 60, 409-414.

Souza, A.C., Luchese, C., Santos Neto, J.S., Nogueira, C.W., 2009. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: studies in vitro and in vivo. *Life Sci* 84, 351-357.

Sredni, B., 2012. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin Cancer Biol* 22, 60-69.

- Stiernagle, T., 1999. Maintenance of *C. elegans*. In: Hope, I. A., ed. *C. elegans: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Vargas, L.M., Soares, M.B., Izaguirry, A.P., Ludtke, D.S., Braga, H.C., Savegnago, L., Wollenhaupt, S., Brum, D.D., Leivas, F.G., Santos, F.W., 2012. Cadmium inhibits the ovary delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in vitro and ex vivo: protective role of seleno-furanoside. *J Appl Toxicol*.
- Wang, L., Yang, Z., Fu, J., Yin, H., Xiong, K., Tan, Q., Jin, H., Li, J., Wang, T., Tang, W., Yin, J., Cai, G., Liu, M., Kehr, S., Becker, K., Zeng, H., 2012. Ethaselen: a potent mammalian thioredoxin reductase 1 inhibitor and novel organoselenium anticancer agent. *Free Radic Biol Med* 52, 898-908.
- Wieslander, E., Engman, L., Svensjo, E., Erlansson, M., Johansson, U., Linden, M., Andersson, C.M., Brattsand, R., 1998. Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems. *Biochem Pharmacol* 55, 573-584.
- Wu, H., Zhao, Y., Guo, Y., Xu, L., Zhao, B.L., 2012. Significant longevity-extending effects of a tetrapeptide from maize on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Food Chem* 130, 254-260.
- Zhang, L., Jie, G., Zhang, J., Zhao, B., 2009. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radic Biol Med* 46, 414-421.
- Zhang, S., Fu, J., Zhou, Z., 2004. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicol In Vitro* 18, 71-77.

Figure Legends

Figure 1: Chemical structure of the xylofuranosides compounds: A) Compound 1 (Se-xylofuranoside), and B) Compound 2 (Te-xylofuranoside).

Figure 2: Dose-response curves for acute treatment with xylofuranosides (30 min): red line Se-xylofuranoside, yellow line Te-xylofuranoside. Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 3: Survival rate following Mn exposure (75mM) and pre-treatment with xylofuranosides: A) Se-xylofuranoside, and B) Te-xylofuranoside; and post-treatment with xylofuranosides, C) Se-xylofuranoside, and D) Te-xylofuranoside. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates $p < 0.05$ as compared to control Mn.

Figure 4: Life span of worms treated with xylofuranosides. A) Se-xylofuranoside, and B) Se-xylofuranoside. Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 5: Brood size of worms treated with xylofuranosides. A) Se-xylofuranoside, and B) Te-xylofuranoside. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates $p < 0.05$ as compared to controls.

Figure 6: Xylofuranoside pre-treatment protection the Mn-induced ROS production. ROS were measured by DCF-DA. Black line shows control values, red line shows Mn group (50 mM), blue line shows Te-xylofuranoside (0.1 μ M) vs. Mn, purple line shows Te-xylofuranoside (10 μ M) vs. Mn and pink line shows Te-xylofuranoside (25 μ M) vs. Mn. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates statistical difference ($p < 0.05$) from Mn (50 mM) group.

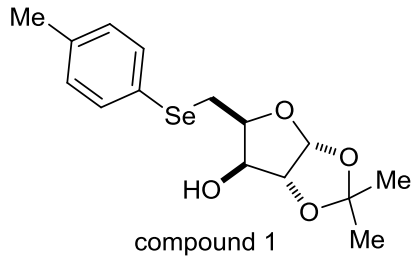
Figure 7: Fluorescence intensity of SOD::GFP. A) Se-xylofuranoside, B) Te-xylofuranoside, C) Control, and D) Worm treated with xylofuranosides. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates statistical difference ($p < 0.05$).

Figure 8: Xylofuranosides cause nuclear translocation of the transcriptional factor DAF-16 in *C. elegans*. A) Percentage of worms expressing DAF-16 in the nucleus and/or in the cytosol, B) control, C) Worm treated with xylofuranosides. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates statistical difference ($p < 0.05$) from control group.

Figure 9: Te-xylofuranoside treatment does not alter Mn levels in N2 (wildtype) worms. Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 1

A) Se-xylofuranoside



B) Te-xylofuranoside

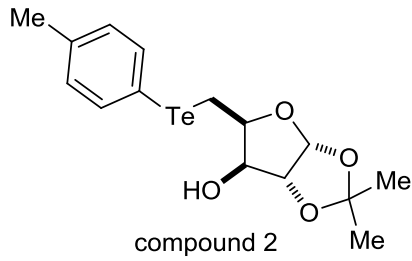


Figure 2

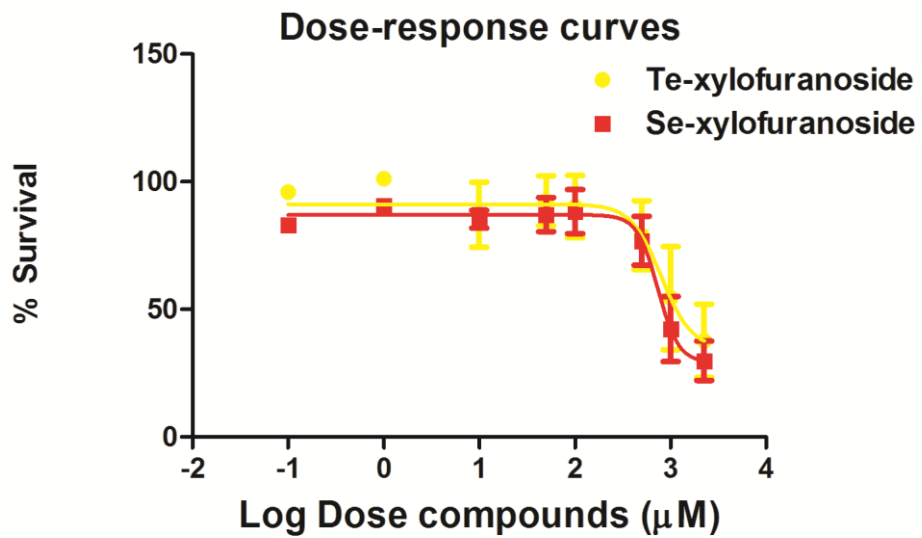
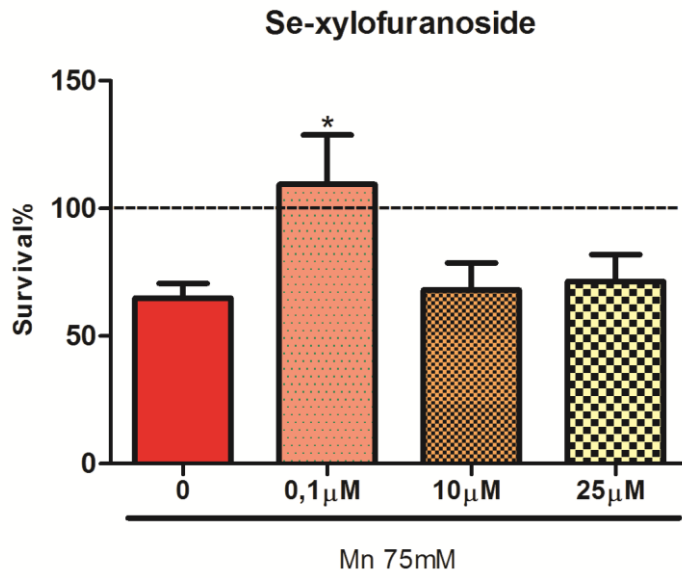
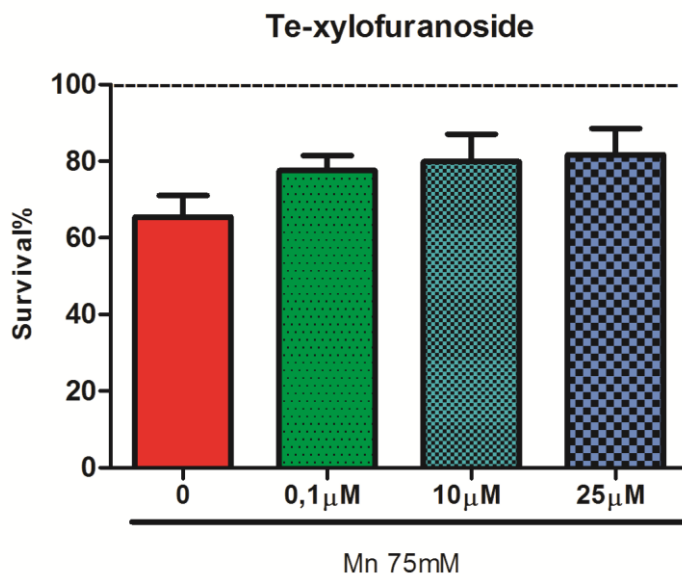


Figure 3

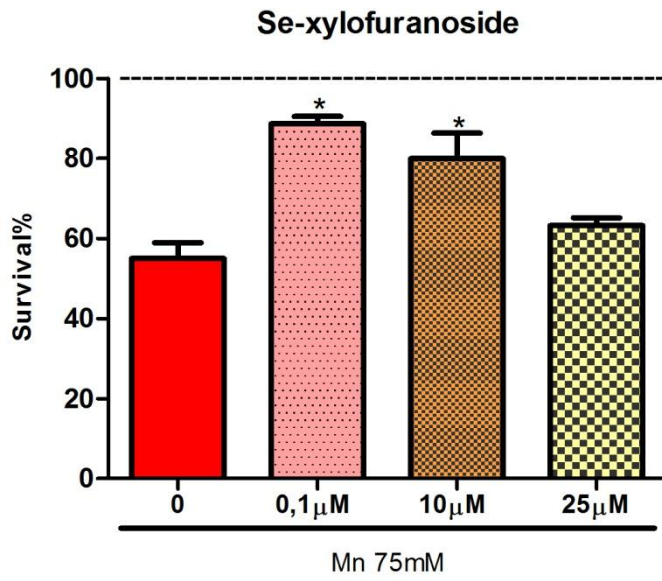
A



B



C



D

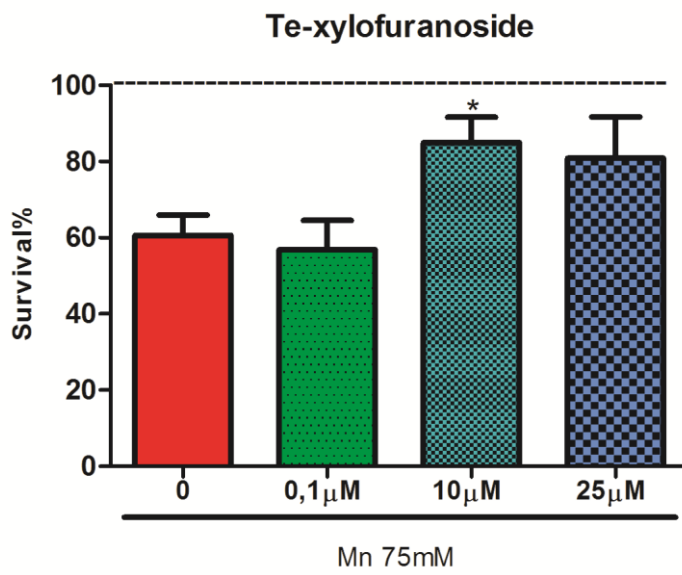
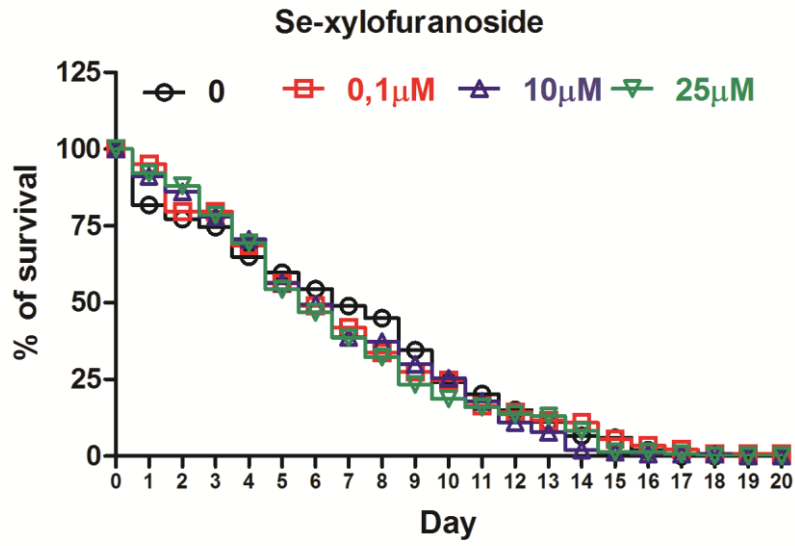


Figure 4

A



B

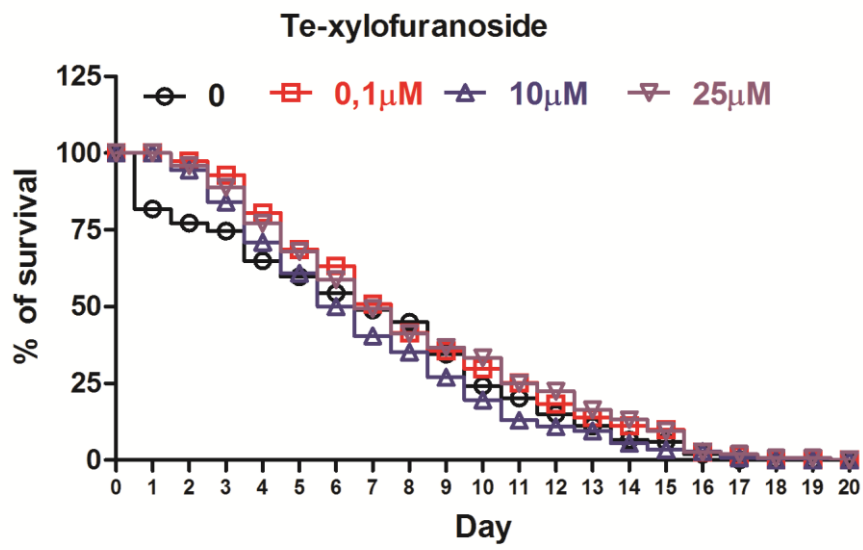
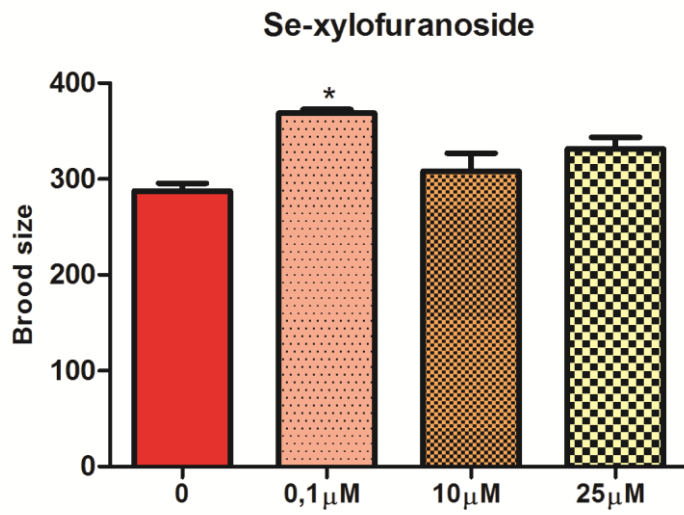


Figure 5

A



B

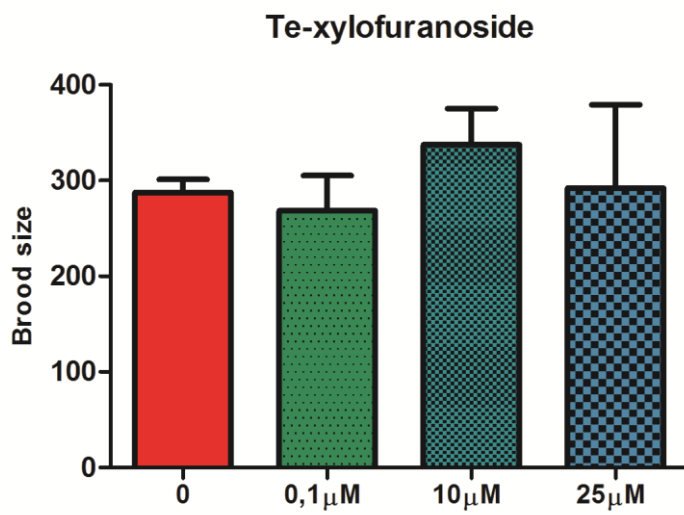


Figure 6

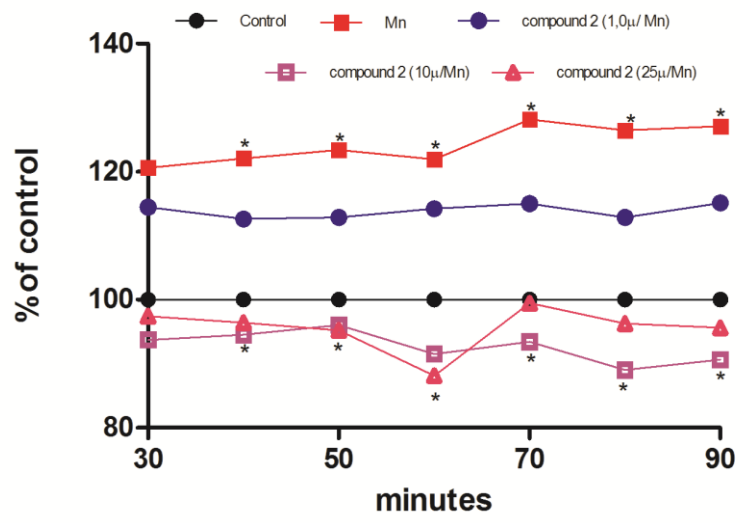
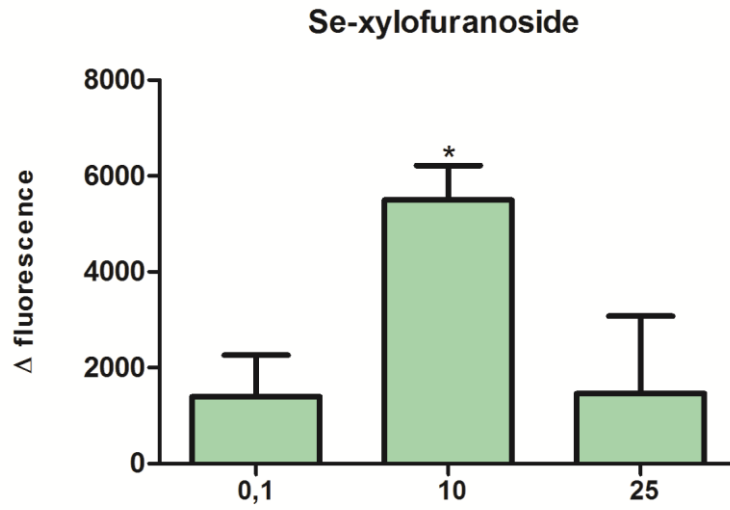


Figure 7

A



B

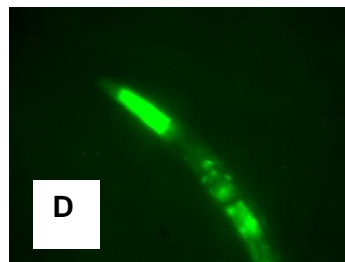
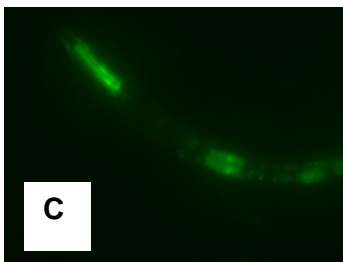
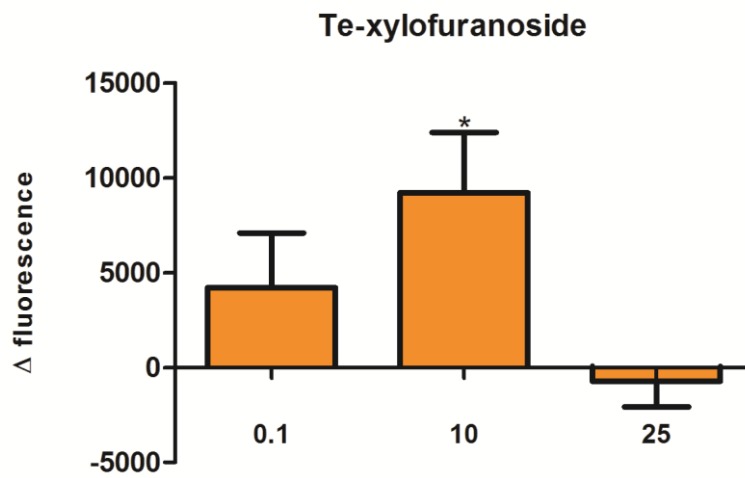


Figure 8

A

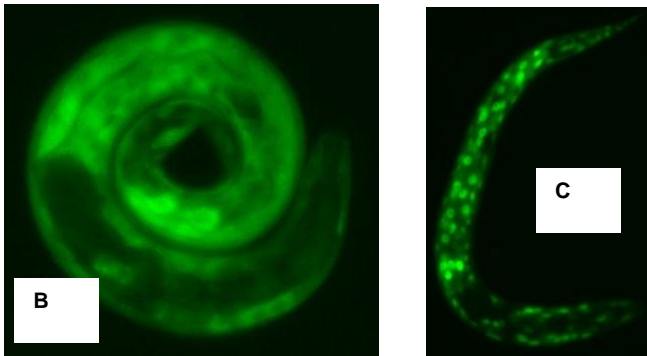
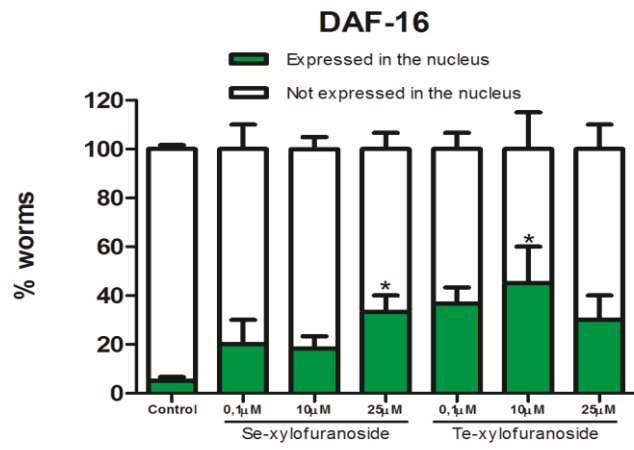
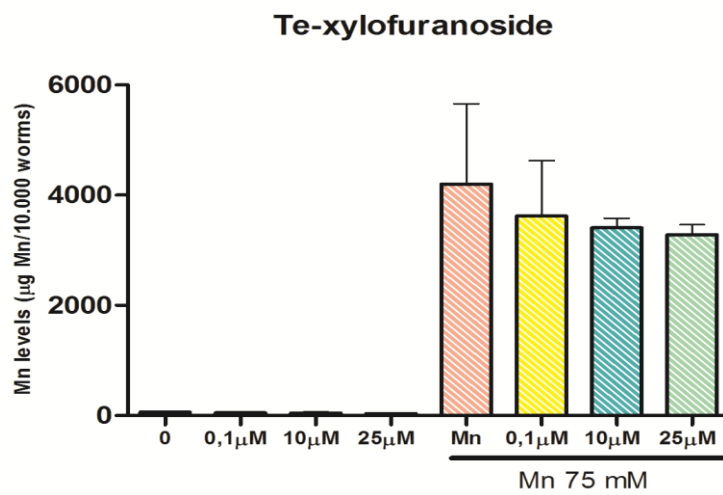


Figure 9



6. CONCLUSÕES

- A DL50 para o Se-xilofuranosídeo foi de 0,73mM enquanto para o Te-xilofuranosídeos encontramos uma DL50 de 0,8mM.
- O tratamento com doses sub-letais (0,1µM) do Se-xilofuranosídeos causou um aumento na reprodução dos nematóides, o que atribuímos ao fato de o Se ser um elemento essencial à reprodução em *C. elegans*.
- Se e Te-xilofuranosídeos contendo Se e Te não aumentaram a longevidade dos vermes assim como outros antioxidantes.
- Se e Te-xilofuranosídeos levaram à migração nuclear do fator de transcrição DAF-16.
- Os xilofuranosídeos induziram um aumento da expressão da enzima antioxidante SOD-3, que é um conhecido alvo da via do DAF-16/FOXO.
- Os xilofuranosídeos contendo Se e Te foram capazes de prevenir e/ou reverter os danos oxidativos causados pelo Mn em *C. elegans*.
- Te-xilofuranosídeo exibiu atividade scavenger de ERO, reduzindo o estresse oxidativo induzido por Mn.
- Observamos que o Te-xilofuranosídeo não interfere na absorção de Mn pelo nematóide.
- Esses achados demonstram a utilidade do modelo em elucidar os mecanismos protetores e tóxicos, além de nos possibilitar verificar o potencial antioxidante *in vivo* dos compostos e que tal efeito se deve à modulação da via DAF-16/FOXO, a qual possui importante papel na manutenção da homeostase oxidativa e, conseqüentemente, no envelhecimento.

7. PERSPECTIVAS

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

- Verificar se os Se e Te-xilofuranosídeos, podem exercer alguma atividade sobre o sistema nervoso dos *C. elegans*, assim como tentar verificar o mecanismo de ação dos compostos;

- Determinar se os compostos são seletivos para tipos de neurônios;

- Verificar se os compostos podem influenciar no comportamento dos animais, e quais os possíveis mecanismos estariam envolvidos nesta ação;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Affeldt, R. F. B., H. C.; Baldassari, L. C.; Lüdtke, D. S. (2012). Synthesis of Selenium-linked Glycoconjugates and Disaccharides. *Tetrahedron* 68: 10470-10475.
- Ahn, S. J., Koketsu, M., Ishihara, H., Lee, S. M., Ha, S. K., Lee, K. H., Kang, T. H. & Kima, S. Y. (2006). Regulation of melanin synthesis by selenium-containing carbohydrates. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54(3): 281-286.
- Alexi, T., Borlongan, C. V., Faull, R. L., Williams, C. E., Clark, R. G., Gluckman, P. D. & Hughes, P. E. (2000). Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 60(5): 409-470.
- Andersson, C. M., Hallberg, A., Brattsand, R., Cotgreave, I. A., Engman, L. & Person, J. (1993). Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. *Bioorg Med Chem Lett* 3: 2553-2558.
- Arteel, G. E. & Sies, H. (2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol* 10(4): 153-158.
- Aschner, J. L. & Aschner, M. (2005). Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Aspects Med* 26(4-5): 353-362.
- Avila, D. S., Benedetto, A., Au, C., Manarin, F., Erikson, K., Soares, F. A., Rocha, J. B. & Aschner, M. (2012). Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 52(9): 1903-1910.
- Avila, D. S., Beque, M. C., Folmer, V., Braga, A. L., Zeni, G., Nogueira, C. W., Soares, F. A. & Rocha, J. B. (2006). Diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. *Toxicology* 224(1-2): 100-107.
- Avila, D. S., Colle, D., Gubert, P., Palma, A. S., Puntel, G., Manarin, F., Noremborg, S., Nascimento, P. C., Aschner, M., Rocha, J. B. & Soares, F. A. (2010). A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol Sci* 115(1): 194-201.
- Avila, D. S., Gubert, P., Dalla Corte, C. L., Alves, D., Nogueira, C. W., Rocha, J. B. & Soares, F. A. (2007). A biochemical and toxicological study with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in a sub-chronic intraperitoneal treatment in mice. *Life Sci* 80(20): 1865-1872.
- Avila, D. S., Gubert, P., Palma, A., Colle, D., Alves, D., Nogueira, C. W., Rocha, J. B. & Soares, F. A. (2008). An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Res Bull* 76(1-2): 114-123.

- Aydemir, O., Guler, M., Kaya, M. K., Deniz, N. & Ustundag, B. (2012). Protective effects of ebselen on sodium-selenite-induced experimental cataract in rats. **J Cataract Refract Surg** 38(12): 2160-2166.
- Azbill, R. D., Mu, X., Bruce-Keller, A. J., Mattson, M. P. & Springer, J. E. (1997). Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. **Brain Res** 765(2): 283-290.
- Ba, L. A., Doring, M., Jamier, V. & Jacob, C. (2010). Tellurium: an element with great biological potency and potential. **Org Biomol Chem** 8(19): 4203-4216.
- Barbosa, N. B., Rocha, J. B., Wondracek, D. C., Perottoni, J., Zeni, G. & Nogueira, C. W. (2006). Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chem Biol Interact** 163(3): 230-238.
- Barbosa, N. B., Rocha, J. B., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M. C. & Braga, A. L. (1998). Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol Appl Pharmacol** 149(2): 243-253.
- Barbosa, N. B. D., Nogueira, C. W., Guecheva, T. N., Bellinaso, M. D. & Rocha, J. B. T. (2008). Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. **Archives of Toxicology** 82(9): 655-663.
- Benedetto, A., Au, C. & Aschner, M. (2009). Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. **Chem Rev** 109(10): 4862-4884.
- Benedetto, A., Au, C., Avila, D. S., Milatovic, D. & Aschner, M. (2010). Extracellular dopamine potentiates mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genet** 6(8).
- Blais, F. X., Onischuk, R. T. & DeMeio, R. H. (1972). Hemolysis by tellurite. I. The tellurite test for hemolysis. **J Am Osteopath Assoc** 72(2): 207-210.
- Boles, J. O., Lebioda, L., Dunlap, R. B. & Odom, J. D. (1995). Telluromethionine in structural biochemistry. **SAAS Bull Biochem Biotechnol** 8: 29-34.
- Borges, V. C., Rocha, J. B. & Nogueira, C. W. (2005). Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. **Toxicology** 215(3): 191-197.
- Braga, H. C., Stefani, H. A., Paixao, M. W., Santos, F. W. & Ludtke, D. S. (2010a). Synthesis of 5'-seleno-xylofuranosides. **Tetrahedron** 66(19): 3441-3446.

- Braga, H. C., Wouters, A. D., Zerillo, F. B. & Ludtke, D. S. (2010b). Synthesis of seleno-carbohydrates derived from D-galactose. ***Carbohydr Res*** 345(16): 2328-2333.
- Briviba, K., Tamler, R., Klotz, L. O., Engman, L., Cotgreave, I. A. & Sies, H. (1998). Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. ***Biochem Pharmacol*** 55(6): 817-823.
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J. & Huber, R. (1995). High-Level Biosynthetic Substitution of Methionine in Proteins by Its Analogs 2-Aminohexanoic Acid, Selenomethionine, Telluromethionine and Ethionine in Escherichia-Coli. ***European Journal of Biochemistry*** 230(2): 788-796.
- Carter, C. S., Ramsey, M. M. & Sonntag, W. E. (2002). A critical analysis of the role of growth hormone and IGF-1 in aging and lifespan. ***Trends Genet*** 18(6): 295-301.
- Castro, M. E., Molina, R. C., Diaz, W. A., Pradenas, G. A. & Vasquez, C. C. (2009). Expression of Aeromonas caviae ST pyruvate dehydrogenase complex components mediate tellurite resistance in Escherichia coli. ***Biochem Biophys Res Commun*** 380(1): 148-152.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression. ***Science*** 263: 802-805.
- Chasteen, T. G., Fuentes, D. E., Tantalean, J. C. & Vasquez, C. C. (2009). Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. ***FEMS Microbiol Rev*** 33(4): 820-832.
- Chew, P., Yuen, D. Y., Koh, P., Stefanovic, N., Febbraio, M. A., Kola, I., Cooper, M. E. & de Haan, J. B. (2009). Site-specific antiatherogenic effect of the antioxidant ebselen in the diabetic apolipoprotein E-deficient mouse. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol*** 29(6): 823-830.
- Cohen, M. V. (1989). Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? ***Ann Intern Med*** 111(11): 918-931.
- Comasseto, J. V., Ling, L. W., Petraghani, N. & Stefani, H. A. (1997). Vinylic selenides and tellurides - Preparation, reactivity and synthetic applications. ***Synthesis-Stuttgart*** (4): 373.
- Combs, G. F., Jr. & Gray, W. P. (1998). Chemopreventive agents: selenium. ***Pharmacol Ther*** 79(3): 179-192.
- Deuticke, B., Lutkemeier, P. & Poser, B. (1992). Tellurite-induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. ***Biochim Biophys Acta*** 1109(1): 97-107.

- Diaz-Veliz, G., Mora, S., Gomez, P., Dossi, M. T., Montiel, J., Arriagada, C., Aboitiz, F. & Segura-Aguilar, J. (2004). Behavioral effects of manganese injected in the rat substantia nigra are potentiated by dicumarol, a DT-diaphorase inhibitor. ***Pharmacol Biochem Behav*** 77(2): 245-251.
- Dumont, E., Vanhaecke, F. & Cornelis, R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. ***Anal Bioanal Chem*** 385(7): 1304-1323.
- Engman, L., Kandra, T., Gallegos, A., Williams, R. & Powis, G. (2000). Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. ***Anticancer Drug Des*** 15(5): 323-330.
- Engman, L., Persson, J., Vessman, K., Ekstrom, M., Berglund, M. & Andersson, C. M. (1995). Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. ***Free Radic Biol Med*** 19(4): 441-452.
- Erikson, K. M., Dorman, D. C., Fitsanakis, V., Lash, L. H. & Aschner, M. (2006). Alterations of oxidative stress biomarkers due to in utero and neonatal exposures of airborne manganese. ***Biol Trace Elem Res*** 111(1-3): 199-215.
- Fairhill, L. T. (1969). Tellurium. In: Industrial Toxicology. ***Hafner Publishing Co***: 120.
- Farina, M., Avila, D. S., da Rocha, J. B. & Aschner, M. (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. ***Neurochem Int*** 62(5): 575-594.
- Felipe, M. G. A. (2003). Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. ***Simpósio nacional de fermentações*** 14.
- Floyd, R. A. (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. ***FASEB J*** 4: 2587-2597.
- Ghisleni, G., Porciuncula, L. O., Cimarosti, H., Batista, T. R. J., Salbego, C. G. & Souza, D. O. (2003). Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immuncontent. ***Brain Res*** 986(1-2): 196-199.
- Gianni, P., Jan, K. J., Douglas, M. J., Stuart, P. M. & Tarnopolsky, M. A. (2004). Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. ***Exp Gerontol*** 39(9): 1391-1400.
- Green, M., Harwood, H., Barrowman, C., Rahman, P., Eggeman, A., Festry, F., Dobson, P. & Ng, T. (2007). A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labelling. ***Journal of Materials Chemistry*** 17(19): 1989-1994.
- Greger, J. L. (1998). Dietary standards for manganese: overlap between nutritional and toxicological studies. ***J Nutr*** 128(2 Suppl): 368S-371S.

- Gunter, T. E., Gavin, C. E., Aschner, M. & Gunter, K. K. (2006). Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. ***Neurotoxicology*** 27(5): 765-776.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. ***Am J Med*** 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? ***Lancet*** 344(8924): 721-724.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. ***Methods Enzymol*** 186: 1-85.
- Halliwell, B. & Gutteridge, M. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. (3rd Ed. ed.). New York: **Oxford University Press**.
- Halliwell, B. G., J.M.C. (1989). Free radicals in Biology and Medicine. **Clerendon Press**.
- Hayun, M., Naor, Y., Weil, M., Albeck, M., Peled, A., Don, J., Haran-Ghera, N. & Sredni, B. (2006). The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in Multiple Myeloma: Association with the Akt/Survivin pathway. ***Biochemical Pharmacology*** 72(11): 1423-1431.
- Holm, J., Palace, V., Siwik, P., Sterling, G., Evans, R., Baron, C., Werner, J. & Wautier, K. (2005). Developmental effects of bioaccumulated selenium in eggs and larvae of two salmonid species. ***Environ Toxicol Chem*** 24(9): 2373-2381.
- Imai, H., Graham, D. I., Masayasu, H. & Macrae, I. M. (2003). Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. ***Free Radic Biol Med*** 34(1): 56-63.
- Ineu, R. P., Pereira, M. E., Aschner, M., Nogueira, C. W., Zeni, G. & Rocha, J. B. (2008). Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. ***Food Chem Toxicol*** 46(9): 3023-3029.
- Jesse, C. R., Savegnago, L. & Nogueira, C. W. (2009). Mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of bis selenide in mice. ***J Pharm Pharmacol*** 61(5): 623-630.
- Johnson, I. T. (2004). New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. ***Mutat Res*** 551(1-2): 9-28.
- Kaletta, T. & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: C-elegans as a model organism. ***Nature Reviews Drug Discovery*** 5(5): 387-398.
- Kanda, T., Engman, L., Cotgreave, I. A. & Powis, G. (1999). Novel Water-Soluble Diorganyl Tellurides with Thiol Peroxidase and Antioxidant Activity. ***J Org Chem*** 64(22): 8161-8169.

- Keen, C. L., Ensunsa, J. L., Watson, M. H., Baly, D. L., Donovan, S. M., Monaco, M. H. & Clegg, M. S. (1999). Nutritional aspects of manganese from experimental studies. **Neurotoxicology** 20(2-3): 213-223.
- Klaman, D. (1990). Organotellurium compounds. *Methods of Organic Chemistry*.
- Klayman, D. L. & Günther, W. H. H. (1973). *Organic selenium compounds: their chemistry and biology*. New York,: Wiley-Interscience.
- Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N. & Suzuki, K. T. (2002). Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99(25): 15932-15936.
- Kormutakova, R., Klucar, L. & Turna, J. (2000). DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of Escherichia coli and identification of essential genes. **Biometals** 13(2): 135-139.
- Laden, B. P. & Porter, T. D. (2001). Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. **J Lipid Res** 42(2): 235-240.
- Landis, J. N. & Murphy, C. T. (2010). Integration of diverse inputs in the regulation of Caenorhabditis elegans DAF-16/FOXO. **Dev Dyn** 239(5): 1405-1412.
- Larner, A. J. (1995). How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis. **Med Hypotheses** 44(4): 295-297.
- Lee, J. M., Calkins, M. J., Chan, K., Kan, Y. W. & Johnson, J. A. (2003). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. **Journal of Biological Chemistry** 278(14): 12029-12038.
- Maraldi, T., Riccio, M., Zambonin, L., Vinceti, M., De Pol, A. & Hakim, G. (2011). Low levels of selenium compounds are selectively toxic for a human neuron cell line through ROS/RNS increase and apoptotic process activation. **Neurotoxicology** 32(2): 180-187.
- Meotti, F. C., Silva, D. O., Dos Santos, A. R., Zeni, G., Rocha, J. B. & Nogueira, C. W. (2003). Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. **Environ Toxicol Pharmacol** 15(1): 37-44.
- Meotti, F. C., Stangherlin, E. C., Zeni, G., Nogueira, C. W. & Rocha, J. B. (2004). Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ Res** 94(3): 276-282.
- Miller, L. L. & Hontela, A. (2011). Species-specific sensitivity to selenium-induced impairment of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Toxicol Appl Pharmacol** 253(2): 137-144.

- Muller, A., Cadenas, E., Graf, P. & Sies, H. (1984). A novel biologically active seleno-organic compound--I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). **Biochem Pharmacol** 33(20): 3235-3239.
- Muller, R., Zschiesche, W., Steffen, H. M. & Schaller, K. H. (1989). Tellurium-Intoxication. **Klinische Wochenschrift** 67(22): 1152-1155.
- Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H. & Kenyon, C. (2003). Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 424(6946): 277-283.
- Navarro-Alarcon, M. & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. **Sci Total Environ** 400(1-3): 115-141.
- Navarro-Alarcon, M. & Lopez-Martinez, M. C. (2000). Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci Total Environ** 249(1-3): 347-371.
- Nogueira, C. W., Borges, V. C., Zeni, G. & Rocha, J. B. (2003a). Organochalcogens effects on delta-aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology** 191(2-3): 169-178.
- Nogueira, C. W., Meotti, F. C., Curte, E., Pilissao, C., Zeni, G. & Rocha, J. B. (2003b). Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology** 183(1-3): 29-37.
- Nogueira, C. W., Quinhones, E. B., Jung, E. A., Zeni, G. & Rocha, J. B. (2003c). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm Res** 52(2): 56-63.
- Nogueira, C. W., Zeni, G. & Rocha, J. B. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev** 104(12): 6255-6285.
- Ogra, Y., Kobayashi, R., Ishiwata, K. & Suzuki, K. T. (2008). Comparison of distribution and metabolism between tellurium and selenium in rats. **J Inorg Biochem** 102(7): 1507-1513.
- Okoronkwo, A. E., Godoi, B., Shumacher, R. F., Neto, J. S. S., Luchese, C., Prigol, M., Nogueira, C. W. & Zeni, G. (2009). Cps3-tellurium copper cross-coupling: synthesis of alkynyl tellurides a novel class of antidepressive-like compounds. **Tetrahedron Lett.** 50: 909-915.
- Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A. & Khanna, K. K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal** 9(7): 775-806.
- Petragnani, N. (1995). In: *comprehensive Organometallic Chemistry II*, (Ed. A. Mckillop), vol. LI, **Pergamon Press Exeter UK**.

- Pinto, A., Speckmann, B., Heisler, M., Sies, H. & Steinbrenner, H. (2011). Delaying of insulin signal transduction in skeletal muscle cells by selenium compounds. **J Inorg Biochem** 105(6): 812-820.
- Porciuncula, L. O., Rocha, J. B., Cimarosti, H., Vinade, L., Ghisleni, G., Salbego, C. G. & Souza, D. O. (2003). Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunocontent of inducible nitric oxide synthase. **Neurosci Lett** 346(1-2): 101-104.
- Posser, T., de Paula, M. T., Franco, J. L., Leal, R. B. & da Rocha, J. B. (2011). Diphenyl diselenide induces apoptotic cell death and modulates ERK1/2 phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Archives of Toxicology** 85(6): 645-651.
- Ray, P. D., Huang, B. W. & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal** 24(5): 981-990.
- Santos, F. W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J. B., do Nascimento, P. C. & Nogueira, C. W. (2004). Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol Lett** 152(3): 255-263.
- Santos, F. W., Zeni, G., Rocha, J. B., do Nascimento, P. C., Marques, M. S. & Nogueira, C. W. (2005). Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food Chem Toxicol** 43(12): 1723-1730.
- Savegnago, L., Pinto, L. G., Jesse, C. R., Alves, D., Rocha, J. B., Nogueira, C. W. & Zeni, G. (2007). Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. **Eur J Pharmacol** 555(2-3): 129-138.
- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J. B., Nogueira, C. W. & Zeni, G. (2006). Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Pharmacol** 21(1): 86-92.
- Scambia, G., Panici, P. B., Battaglia, F., Ferrandina, G., Gaggini, C. & Mancuso, S. (1989). Growth inhibitory effect of diheptyl diselenide on various human cancer cell lines. **Anticancer Res** 9(6): 1697-1699.
- Scansetti, G. (1992). Exposure to metals that have recently come into use. **Sci Total Environ** 120(1-2): 85-91.
- Schierenberg, E. & Wood, W. B. (1985). Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. **Dev Biol** 107(2): 337-354.
- Schwartz, K. & Foltz, P. J. (1957). Selenium as a integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J Am Chem Soc** 79: 200-221.

- Spallholz, J. E. (1994). On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. ***Free Radic Biol Med*** 17(1): 45-64.
- Stadtman, T. C. (1980). Selenium-dependent enzymes. ***Annu Rev Biochem*** 49: 93-110.
- Taylor, A. (1996). Biochemistry of tellurium. ***Biol Trace Elem Res*** 55(3): 231-239.
- Taylor, C. M. (1998). Glycopeptides and glycoproteins: Focus on the glycosidic linkage. ***Tetrahedron*** 54(38): 11317-11362.
- Toptchieva, A., Sisson, G., Bryden, L. J., Taylor, D. E. & Hoffman, P. S. (2003). An inducible tellurite-resistance operon in *Proteus mirabilis*. ***Microbiology*** 149(Pt 5): 1285-1295.
- Van Vleet, J. & Ferrans, V. J. (1977). Ultrastructural alterations in skeletal muscle of ducklings fed selenium-vitamin E-deficient diet. ***Am J Vet Res*** 38(9): 1399-1405.
- Vargas, L. M., Soares, M. B., Izaguirry, A. P., Ludtke, D. S., Braga, H. C., Savegnago, L., Wollenhaupt, S., Brum, D. D., Leivas, F. G. & Santos, F. W. (2012). Cadmium inhibits the ovary delta-aminolevulinate dehydratase activity in vitro and ex vivo: protective role of seleno-furanoside. ***J Appl Toxicol***.
- Vinceti, M., Crespi, C. M., Bonvicini, F., Malagoli, C., Ferrante, M., Marmioli, S. & Stranges, S. (2012). The need for a reassessment of the safe upper limit of selenium in drinking water. ***Sci Total Environ*** 443C: 633-642.
- Wang, R., Sun, B., Zhang, Z., Li, S. & Xu, S. (2011). Dietary selenium influences pancreatic tissue levels of selenoprotein W in chickens. ***J Inorg Biochem*** 105(9): 1156-1160.
- Wöhler, F. L. (1840). *Annals of Chemistry*: 35:111.
- Yarema, M. C. & Curry, S. C. (2005). Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing solutions. ***Pediatrics*** 116(2): e319-321.
- Young, V. R., Nahapetian, A. & Janghorbani, M. (1982). Selenium bioavailability with reference to human nutrition. ***Am J Clin Nutr*** 35(5): 1076-1088.
- Zeni, G., Ludtke, D. S., Panatieri, R. B. & Braga, A. L. (2006). Vinylic tellurides: from preparation to their applicability in organic synthesis. ***Chem Rev*** 106(3): 1032-1076.
- Zhang, H. W. & Swihart, M. T. (2007). Synthesis of tellurium dioxide nanoparticles by spray pyrolysis. ***Chemistry of Materials*** 19(6): 1290-1301.
- Zhang, S., Fu, J. & Zhou, Z. (2004). In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. ***Toxicol In Vitro*** 18(1): 71-77.

ANEXO A

Elsevier Editorial System(tm) for Biochemical Pharmacology
Manuscript Draft

Manuscript Number: BCP-D-13-00413

Title: Seleno- and Telluro-Xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Toxicology

Keywords: xylofuranoside, *C. elegans*, oxidative stress, DAF-16, manganese

Corresponding Author: Dr. Daiana Silva Ávila,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Pampa

First Author: Suzi N Wollenhaupt

Order of Authors: Suzi N Wollenhaupt; Ana T Soares; Willian G Salgueiro; Simone NoreMBERG, PhD; Denise Bohrer, PhD; Priscilia Gubert; Felix A Soares, PhD; Ricardo F Affeldt; Diogo D Lüdtke, PhD; Francielli W Santos, PhD; Cristiane C Denardin, PhD; Michael Aschner, PhD; Daiana Silva Ávila

Manuscript Region of Origin: America

Abstract: Organochalcogens are promising pharmacological agents that possess significant biological activities. Nevertheless, because of the complexity of mammalian models, it has been difficult to determine the molecular pathways and specific proteins that are modulated in response to treatments with these compounds. The nematode worm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is an alternative experimental model that affords easy genetic manipulations, green fluorescent protein tagging and in vivo live analysis of toxicity. Abundant evidence points to oxidative stress in mediating manganese (Mn)-induced toxicity. In this study we challenged worms with Mn, a known pro oxidizing agent, and investigated the efficacy of selenium (Se)- and tellurium (Te)- xylofuranosides in reversing and/or protecting the worms from Mn-induced toxicity. In addition, we investigated their putative mechanism of action. First, we determined the lethal dose 50% (LD50) and the effects of the xylofuranosides on various toxic parameters. This was followed by studies on the ability of xylofuranosides to afford protection against Mn-induced toxicity. Both Se- and Te-xylofuranosides reversed the Mn-induced reduction in survival, decreased reactive oxygen species (ROS) production, and increased the expression of superoxide dismutase (SOD-3), indicating that increased survival was associated with decreased oxidative stress. Furthermore, we observed that the xylofuranosides induced nuclear translocation of the transcription factor DAF-16/FOXO, which in the worm is known to regulate stress responsiveness, aging and metabolism. These findings suggest that xylofuranosides attenuate Mn-induced ROS generation, at least in part, by regulating the DAF-16/FOXO signaling pathway.