



UFSM

Dissertação de Mestrado

Os Efeitos de Organocalcogêneos e de 2,3-Dimercaptopropanol Sobre Convulsão Química e Letalidade Induzidas por Pentilenotetrazol e 4-Aminopiridina em Camundongos

Verônica Bidinotto Brito

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2007

Os Efeitos de Organocalcogêneos e de 2,3-Dimercaptopropanol Sobre Convulsão Química e Letalidade Induzidas por Pentilenotetrazol e 4-Aminopiridina em Camundongos

por

Verônica Bidinotto Brito

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica (PPGBT), Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Bioquímica Toxicológica

Santa Maria, RS, Brasil

2007

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado
Os Efeitos de Organocalcogêneos e de 2,3-Dimercaptopropanol Sobre
Convulsão Química e Letalidade Induzidas por Pentilenotetrazol e 4-
Aminopiridina em Camundongos

Elaborada por

Verônica Bidinotto Brito

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora

Prof. Dr. **Vanderlei Folmer** (UNIPAMPA-UFSM)

Presidente/Orientador

Prof. Dra. **Liane Nanci Rotta** (FFFCMPA)

Prof. Dra. **Tatiana Emanuelli** (UFSM)

Santa Maria, 17 de Agosto de 2007.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Osmar Fernando Brito ...

... pelas boas lembranças,

... eterna saudade.

E, a minha mãe Inês ...

... pela constante torcida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, pela possibilidade de realização deste curso.

A CAPES, pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Ao meu orientador Vanderlei Folmer, pela parceria e paciência.

Ao meu co-orientador João B.T. Rocha, pela disponibilização do espaço físico, pela contribuição que deu para a realização do trabalho e, principalmente, por tudo o que representou em minha formação.

E às amigas Danúbia e Jéssie, pela amizade, companheirismo e parceria em momentos tão importantes.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Os Efeitos de Organocalcogêneos e de 2,3-Dimercaptopropanol Sobre Convulsão Química e Letalidade Induzidas por Pentilenotetrazol e 4-Aminopiridina em Camundongos

AUTORA: Verônica Bidinotto Brito

ORIENTADOR: Vanderlei Folmer

CO-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

LOCAL e DATA da DEFESA: Santa Maria, 17 de Agosto de 2007.

Modelos experimentais de convulsão em animais têm representado um papel importante para a compreensão das alterações fisiológicas e comportamentais associadas com a epilepsia humana. A indução de convulsões parciais ou generalizadas é um método eficiente para avaliar tanto a susceptibilidade às convulsões quanto investigar novos agentes anticonvulsivantes. Neste sentido, estudos demonstraram que as ações convulsivantes dos compostos disseleneto de difenila (PhSe)₂ e 2,3-dimercaptopropanol (BAL) são inibidas por diazepam e fenobarbital, dois moduladores alostéricos clássicos do sistema GABAérgico. Logo, surge o interesse de investigar os efeitos da interação dos compostos (PhSe)₂ e BAL e agentes convulsivantes que ajam através do bloqueio e/ou modulação do sistema GABAérgico. Este é o caso do agente pentilenotetrazol (PTZ), o qual exerce sua ação convulsiva por meio de um bloqueio do canal de Cl⁻ do complexo do receptor GABA_A. Considerando estes fatos, o presente estudo teve como primeiro objetivo investigar os efeitos da pré-administração de (PhSe)₂ e BAL no modelo de convulsão química induzida por PTZ em camundongos (**Artigo 1**). Para este propósito, camundongos foram pré-tratados com (PhSe)₂ (150 µmol/kg, i.p.) ou BAL (250, 500 ou 1000 µmol/kg, i.p.) 10 minutos antes da administração de PTZ. Os resultados obtidos demonstraram que o pré-tratamento com (PhSe)₂ reduziu a latência para a convulsão induzida por PTZ nas doses de 40 e 60 mg/kg, além de causar um decréscimo na latência para a morte induzida por PTZ na dose de 60 mg/kg. Entretanto, a ação convulsivante e letal induzida por PTZ na dose de 80 mg/kg não foi afetada pelo pré-tratamento com (PhSe)₂. Similarmente, o pré-tratamento dos animais com BAL reduziu a latência para a convulsão induzida por 40 e 50 mg/kg de PTZ. Além disso, a latência para a morte induzida por PTZ na dose de 40 mg/kg foi significativamente diminuída pelo pré-tratamento com BAL em todas as doses testadas. Particularmente, na dose de 50 mg/kg de PTZ, decréscimo significativo na latência para a morte ocorreu somente quando os camundongos foram pré-tratados com 500 e 1000 µmol/kg de BAL. Estes resultados demonstram que o (PhSe)₂ e BAL agem em sinergismo com o PTZ potencializando sua ação convulsiva, possivelmente através de uma modulação do sistema GABAérgico. Tendo em vista as similaridades estruturais entre os compostos (PhSe)₂ e ditelureto de difenila (PhTe)₂, nosso próximo objetivo foi investigar o efeito dos compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ sobre um modelo de convulsão química induzida por 4-aminopiridina (4-AP) em camundongos (**Artigo 2**). A ação convulsiva deste agente ocorre através do bloqueio de canais de K⁺ e ativação de canais de Ca²⁺, com conseqüente liberação de neurotransmissores, predominantemente o glutamato. Além disso, foram

investigados os níveis de peroxidação lipídica cerebral após o tratamento dos animais com 4-AP, bem como o efeito do pré-tratamento com os compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ sobre esses níveis. Para este fim, camundongos foram pré-tratados com (PhSe)₂ e (PhTe)₂ (50, 100 ou 150 µmol/kg, s.c.) 30 minutos antes da administração de 4-AP (12 mg/kg, i.p.). Os resultados obtidos demonstraram que o pré-tratamento com (PhSe)₂ e (PhTe)₂, nas doses de 50, 100 e 150 µmol/kg, aumentou significativamente a latência para a convulsão clônica e tônica, bem como inibiu a morte induzida por 4-AP. Além disso, observamos um significativo aumento nos níveis de peroxidação lipídica cerebral após o tratamento com 4-AP, o qual foi significativamente inibido pelo pré-tratamento com os compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂. Portanto, estes resultados demonstram que (PhSe)₂ e (PhTe)₂ aumentam a latência para as convulsões, bem como inibem a morte induzida por 4-AP. É possível que este efeito resulte da modulação de sítios redox de receptores NMDA, e/ou modulação na atividade de canais de Ca²⁺ com conseqüente alteração na liberação de neurotransmissores. Além disso, o trabalho forneceu evidências para as propriedades anticonvulsivas e antioxidantes dos compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂, as quais apontam para suas propriedades neuroprotetoras neste modelo. De forma geral, a utilização dos modelos de convulsão química induzida por PTZ e 4-AP em camundongos foi um método útil na investigação das ações sobre o sistema nervoso central dos compostos (PhSe)₂, (PhTe)₂ e BAL. O emprego destes modelos convulsivos forneceu evidências acerca das ações convulsivas, bem como possíveis mecanismos de ação dos compostos avaliados.

Palavras-chave: convulsão; disseleneto de difenila; ditelureto de difenila; 2,3-dimercaptopropanol; pentilenotetrazol; 4-aminopiridina; peroxidação lipídica; sistema GABAérgico; sistema glutamatérgico.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

The Effects of Organochalcogens and 2,3-Dimercaptopropanol on Chemical Seizure and Lethality Induced by Pentylenetetrazol and 4-Aminopyridine in Mice

AUTHOR: Verônica Bidinotto Brito

ADVISOR: Vanderlei Folmer

CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

DATE and PLACE of the DEFENSE: Santa Maria, August 17, 2007.

Experimental models of seizure in animals have represented an important role for the understanding of the physiological and behavioural alterations associated with the human epilepsy. The induction of partial or generalized seizures is an efficient method for evaluating both the susceptibility to seizures and to investigate new anticonvulsant agents. In this sense, studies showed that the convulsive actions of the diphenyl diselenide (PhSe)₂ and 2,3-dimercaptopropanol (BAL) compounds are inhibited by diazepam and phenobarbital, two classic allosteric modulators of the GABAergic system. Therefore, arises the interest of to investigate the interaction of the (PhSe)₂ and BAL compounds with convulsive agents that act via blockade and/or modulation of the GABAergic system. This is the case of the pentylenetetrazol (PTZ), which exerts its convulsive action by blocking of Cl⁻ channel of the GABA_A receptor complex. Taking into account these facts, the present study had as first objective to investigate the effects of the pre-administration of (PhSe)₂ and BAL in the model of chemical seizure PTZ-induced in mice (**Article 1**). For this purpose, mice were pretreated with (PhSe)₂ (150 μmol/kg, i.p.) or BAL (250, 500, or 1000 μmol/kg, i.p.) 10 minutes prior to administration of PTZ. The obtained results showed that the pretreatment with (PhSe)₂ reduced the latency for seizure PTZ-induced at doses of 40 and 60 mg/kg, beyond to cause a decrease in the latency for death PTZ-induced at dose of 60 mg/kg. However, the convulsive and lethal action PTZ-induced at dose of 80mg/kg was not affected by the pretreatment with (PhSe)₂. Similarly, the pretreatment of the animals with BAL reduced the latency for seizure induced by 40 and 50 mg/kg PTZ. In addition, the latency for death PTZ-induced at dose of 40 mg/kg was significantly decreased by the pretreatment with BAL in all doses tested. Particularly, in the dose of 50 mg/kg of PTZ, a significant decrease in the latency for death occurred only when the mice were pretreated with 500 and 1000 μmol/kg of BAL. These results show that (PhSe)₂ and BAL act in synergism with PTZ potentializing its convulsive action, possibly through a modulation of the GABAergic system. Tacking into account the structural similarities between (PhSe)₂ and diphenyl ditelluride (PhTe)₂ compounds, our further objective was to investigate the effects of the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ compounds on a model of chemical seizure 4-aminopyridine (4-AP)-induced in mice (**Article 2**). The convulsive action of this agent occurs through a blockade of K⁺ channels and activation of Ca²⁺ channels, with consequent release of neurotransmitters, predominantly the glutamate. Moreover, it was investigated the brain lipid peroxidation level after treatment of the animals with 4-AP, as well the effect of the pretreatment with the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ compounds on this level. For this purpose, mice were pretreated with (PhSe)₂ and (PhTe)₂ (50, 100,

or 150 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) 30 minutes before administration of 4-AP (12 mg/kg, i.p.). The obtained results showed that the pretreatment with $(\text{PhSe})_2$ and $(\text{PhTe})_2$ (50, 100, and 150 $\mu\text{mol/kg}$) significantly increased the latency for clonic and tonic seizure, as well as inhibited the death 4-AP-induced. In addition, it was observed a significant increase in the brain lipid peroxidation levels after treatment with 4-AP, which was significantly inhibited by pretreatment with the $(\text{PhSe})_2$ and $(\text{PhTe})_2$ compounds. Therefore, these results show that $(\text{PhSe})_2$ and $(\text{PhTe})_2$ increase the latency for seizures, as well as inhibit the death 4-AP-induced. It is possible that this effect result of the modulation of redox sites of NMDA receptors, and/or modulation in the Ca^{2+} channels activity with consequent alteration in the neurotransmitters release. Moreover, the work provided evidences for the anticonvulsant and antioxidant properties of the $(\text{PhSe})_2$ and $(\text{PhTe})_2$ compounds, which point out for its neuroprotective properties in this model. Of general model, the utilization of the models of chemical seizure PTZ- or 4-AP-induced in mice was a useful method in the investigation of the actions on central nervous system of the $(\text{PhSe})_2$, $(\text{PhTe})_2$, and BAL compounds. The use of these convulsive models provided evidences about the convulsive actions, as well as possible mechanisms of action of the evaluated compounds.

Key-Words: seizure; diphenyl diselenide; diphenyl ditelluride; 2,3-dimercaptopropanol; pentylenetetrazol; 4-aminopyridine; lipid peroxidation; GABAergic system; glutamatergic system.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (A) e metabotrópicos (B). 6
- Figura 2.** Representação esquemática do receptor NMDA. 8
- Figura 3.** Representação esquemática do complexo do receptor GABA_A. 16
- Figura 4.** Estrutura do 2,3-dimercaptopropanol (BAL). 18
- Figura 5.** Estrutura do disseleneto de difenila (PhSe)₂. 21
- Figura 6.** Estrutura do ditelureto de difenila (PhTe)₂. 23

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 2

- Figure 1.** Effects of the pretreatment with 150 μmol/kg (PhSe)₂ and (PhTe)₂, and treatment with 4-AP (12 mg/kg) on TBARS production in mice brain. Data are means ± SEM; n=6-8 (**a**) Indicates significant difference from DMSO (P<0.05) and (**b**) indicates significant difference from DMSO + 4-AP (P<0.05). 52

LISTA DE TABELAS

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1

Table 1. Influence of pretreatment with (PhSe)₂ on the PTZ-induced latency to seizures and survival in mice. 29

Table 2. Influence of pretreatment with BAL on the PTZ-induced latency to seizure and survival in mice. 29

Artigo 2

Table 1. Influence of the pre-treatment with (PhSe)₂ on latency to seizures (clonic and tonic) and death, in the model of 4-AP-induced seizure in mice. 50

Table 2. Influence of the pre-treatment with (PhTe)₂ on latency to seizures (clonic and tonic) and death, in the model of 4-AP-induced seizure in mice. 51

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP – 4-aminopiridina

AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico

BAL – British anti-Lewisite; 2,3-dimercaptopropanol; dimercaprol

EROs – espécies reativas de oxigênio

GABA – ácido γ -aminobutírico

GABA-T – GABA α -cetoglutarato transaminase

GSH – glutationa reduzida

GSH-Px – glutationa peroxidase

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HNE – hidroxinonenal

KA – cainato

MDA – malondialdeído

NMDA – N-metil-D-aspartato

(PhSe)₂ – disseleneto de difenila

(PhTe)₂ – ditelureto de difenila

PTZ – pentilenotetrazol

RL – radical livre

SNC – sistema nervoso central

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
APRESENTAÇÃO	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Convulsão e Epilepsia	3
2.2. Os Sistemas Glutamatérgico e GABAérgico	3
2.2.1. O glutamato	4
2.2.1.1. Os receptores de glutamato	6
2.2.2. O ácido γ -aminobutírico (GABA)	9
2.2.2.1. Os receptores de GABA	10
2.3. O Estresse Oxidativo	11
2.3.1. As espécies reativas de oxigênio (EROs)	11
2.3.2. A peroxidação lipídica	12
2.3.3. O dano oxidativo no SNC	13
2.4. Modelos de Convulsão	14
2.4.1. Modelos de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ)	15
2.4.2. Modelos de convulsão induzida por 4-aminopiridina (4-AP)	16
2.5. O 2,3-dimercaptopropanol (BAL)	17
2.6. Os Organocalcogêneos	19
2.6.1. O selênio e o disseleneto de difenila	20
2.6.2. O telúrio e o ditelureto de difenila	21
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos Específicos	24

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS	25
4.1. – Disseleneto de Difenila e 2,3-Dimercaptopropanol Agravam a Convulsão Química e Letalidade Induzidas por Pentilenotetrazol em Camundongos – Artigo 1	26
4.2 – Disseleneto de Difenila e Ditelureto de Difenila Aumentam a Latência para a Convulsão Química e Inibem a Morte Induzidas por 4-Aminopiridina em Camundongos – Artigo 2	32
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	61
7. PERSPECTIVAS	62
8. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E MESTRADO	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

No item **INTRODUÇÃO**, é feita uma abordagem geral sobre o tema desta dissertação e seus objetivos. No item **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, está descrita uma sucinta revisão sobre os temas trabalhados. Já as seções **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho. No item **PERSPECTIVAS**, estão expostos os possíveis estudos para continuação deste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, dispostas no final da dissertação, referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO**.

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia humana é uma desordem neurológica caracterizada pelo aparecimento recorrente e imprevisível de convulsões espontâneas. Embora a epilepsia possa manifestar-se por várias vias diferentes, cada tipo de epilepsia tem em comum a importante característica de aumentar a excitabilidade neuronal, a qual se manifesta através da geração de convulsões (MCNAMARA, 1994, 1999; LOTHMAN e cols., 2001). Estas, por si só, referem-se às alterações transitórias e anormais do comportamento devido à atividade desordenada, descontrolada e, em alta frequência de populações de neurônios no sistema nervoso central (SNC) (MCNAMARA, 1994, 1999; LOTHMAN e cols., 2001).

A epilepsia possui incidência variável entre as diversas regiões do mundo, afetando aproximadamente 1-2% da população mundial (HAUSER & HESDORFFER, 1990; MCNAMARA, 1999; MCKEOWN & MCNAMARA, 2001). Embora avanços tenham ocorrido no desenvolvimento de agentes anticonvulsivantes e no tratamento cirúrgico da epilepsia, aproximadamente 50% dos casos permanecem refratários às intervenções médicas, tolhendo a qualidade de vida de milhares de pessoas (HAUSER & HESDORFFER, 1990).

Tendo em vista estes fatos, a investigação dos eventos celulares e neuroquímicos envolvidos no processo convulsivo em cérebros normais, é capaz de fornecer evidências acerca do mecanismo causador de episódios convulsivos espontâneos, os quais representam a principal característica do cérebro epilético. Neste sentido, modelos experimentais de convulsão em animais têm representado um papel importante para a compreensão das alterações fisiológicas e comportamentais associadas com a epilepsia humana.

Desde o início do século XX, o estudo da convulsão em modelos animais tem conduzido ao descobrimento de estratégias de tratamento contra a epilepsia e, muitas das drogas anticonvulsivas descobertas através da pesquisa em modelos experimentais são comumente prescritas atualmente (PUTNAM & MERRITT, 1937). Uma variedade de técnicas pode ser utilizada para induzir convulsões parciais ou generalizadas, representando um método eficiente para avaliar tanto a susceptibilidade às convulsões quanto investigar novos agentes anticonvulsivantes.

Particularmente, dados da literatura têm demonstrado que o cérebro de roedores é um alvo para as ações tóxicas dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)₂ e ditelureto de difenila (PhTe)₂, assim como do composto quelante 2,3-dimercaptopropanol (BAL) (MACIEL e cols., 2000; NOGUEIRA e cols., 2000, 2003a; WIDY-TYSZIEWICZ e cols., 2002). Neste contexto, estudos prévios demonstraram que as ações convulsivantes dos compostos (PhSe)₂ e BAL são inibidas por diazepam e fenobarbital, dois moduladores alostéricos clássicos do sistema GABAérgico (NOGUEIRA e cols., 2000, 2003a). Logo, surgiu o interesse de investigar os efeitos da interação dos compostos (PhSe)₂ e BAL e agentes convulsivantes que ajam através do bloqueio e/ou modulação do sistema GABAérgico, como é o caso do agente pentilenotetrazol (PTZ). Além disso, o (PhTe)₂ assemelha-se em estrutura e configuração eletrônica com o (PhSe)₂, tornando-o um alvo interessante de investigação. Considerando este aspecto, foi realizado um estudo da interação entre os compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ e o agente convulsivante 4-aminopiridina (4-AP). A 4-AP tem sua ação convulsiva mediada pela predominante liberação de glutamato, dentre outros neurotransmissores.

Deste modo, a investigação dos efeitos, bem como os possíveis mecanismos de ação de (PhSe)₂, (PhTe)₂ e BAL sobre o SNC, em modelos de convulsão induzida por PTZ e 4-AP, é um método útil na busca de possíveis alternativas no controle de processos convulsivos espontâneos. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar em camundongos: os efeitos do pré-tratamento com os compostos (PhSe)₂ e BAL sobre convulsão química e letalidade induzidas por PTZ; assim como, os efeitos do pré-tratamento com os compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ sobre convulsão química e letalidade induzidas por 4-AP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Convulsão e Epilepsia

O termo “convulsão” refere-se a uma alteração transitória e anormal do comportamento devido à atividade desordenada, descontrolada e, em alta frequência de populações de neurônios no SNC (MCNAMARA, 1994, 1999; LOTHMAN e cols., 2001). Por sua vez, a “epilepsia” é uma desordem na função cerebral caracterizada pela ocorrência periódica e imprevisível de convulsões espontâneas.

As convulsões podem ser não-epilépticas quando geradas em cérebros normais através de eletrochoques ou agentes convulsivantes, ou epilépticas quando ocorrem espontaneamente (MCNAMARA, 1994). Embora a epilepsia possa manifestar-se por várias vias diferentes, cada tipo de epilepsia tem em comum a importante característica de aumentar a excitabilidade neuronal, a qual se manifesta através da geração de convulsões (MCNAMARA, 1994, 1999; LOTHMAN e cols., 2001).

A epilepsia é uma desordem neurológica com incidência variável entre as diversas regiões do mundo, afetando mais de 2 milhões de Americanos e aproximadamente 1-2% da população mundial (HAUSER & HESDORFFER, 1990; MCNAMARA, 1999; MCKEOWN & MCNAMARA, 2001). Embora avanços tenham ocorrido no desenvolvimento de agentes anticonvulsivantes e no tratamento cirúrgico da epilepsia, aproximadamente 50% dos casos permanecem refratários às intervenções médicas, tolhendo a qualidade de vida de milhares de pessoas (HAUSER & HESDORFFER, 1990).

2.2. Os Sistemas Glutamatérgico e GABAérgico

Representando os principais neurotransmissores inibitórios e excitatórios, respectivamente, o ácido γ -aminobutírico (GABA) e o glutamato ocupam um papel central em processos neuropatológicos, tais como epilepsia, déficits de função cognitiva e doenças neurodegenerativas (CHOI, 1988; MELDRUM & GARTHWAITE, 1990; BRADFORD, 1995; MELDRUM, 1995). Particularmente, um desequilíbrio em

qualquer um dos sistemas de neurotransmissão excitatória ou inibitória no SNC pode estar implicado no desenvolvimento de processos convulsivos (HEINEMANN & JONES, 1990; BRADFORD, 1995; MELDRUM, 1995). Além disso, a intensificação do desequilíbrio neuronal que conduz aos episódios convulsivos, assim como o seu abrandamento, pode ocorrer a partir da interação de mecanismos inibitórios GABAérgicos e excitatórios glutamatérgicos (BRADFORD, 1995).

2.2.1. O glutamato

O aminoácido glutamato, juntamente com o aspartato, medeia a maior parte da transmissão sináptica excitatória no cérebro. É um mediador chave de uma variedade de processos fisiológicos, tais como comunicação intracelular, crescimento e diferenciação, aprendizado e memória (OZAWA e cols., 1998), desempenhando um papel importante na realização de conexões sinápticas normais no cérebro. Conseqüentemente, um desequilíbrio na via glutamatérgica é um fator importante na gênese de muitas desordens neurológicas. Evidências têm demonstrado que um aumento na neurotransmissão glutamatérgica está envolvido nos mecanismos excitotóxicos das convulsões, além da neurodegeneração (CHOI, 1988; MELDRUM, 1991).

Efetivamente, as principais vias excitatórias do SNC utilizam o glutamato como neurotransmissor (OZAWA e cols., 1998; MELDRUM e cols., 1999). Sua síntese ocorre nos terminais pré-sinápticos, predominantemente a partir da glutamina, a qual é sintetizada nas células gliais e transportada para os terminais nervosos, onde então é convertida em glutamato devido à ação da enzima glutaminase. Entretanto, ele ainda pode provir do α -cetoglutarato, nas reações de transaminação e na aminação redutora pela glutamato desidrogenase (KVAMME, 1998).

Com relação à ação excitatória do glutamato, esta é finalizada pela sua captação da fenda sináptica pelas células gliais ou pelos neurônios pré-sinápticos, onde é armazenado nas vesículas sinápticas. Esta captação do glutamato envolve dois sistemas de transporte: um carreador com alta afinidade e dependente de Na^+ , localizado nas membranas pré-sinápticas e gliais (ROBINSON & DOWD, 1997), e outro com baixa afinidade e independente de Na^+ , localizado nas membranas das vesículas sinápticas. Devido à ação coordenada destes transportadores o glutamato

é armazenado nas vesículas, diminuindo sua concentração na fenda sináptica. Claramente, a captação de moléculas de glutamato apresenta uma função vital na manutenção de altos níveis de precursores de glutamato (glutamina e α -cetoglutarato) e baixas concentrações extracelulares deste neurotransmissor (DICHTER & WILCOX, 1997). Portanto, uma vez armazenado, o glutamato poderá ser liberado na fenda, desde que as membranas pré-sinápticas sejam despolarizadas. Além disso, quando liberado na fenda sináptica, as respostas fisiológicas ao glutamato ocorrem via ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos farmacologicamente e funcionalmente distintos, localizados nas membranas pré e pós-sinápticas, bem como na membrana das células gliais (MELDRUM e cols., 1999).

Como mediador de sinapses excitatórias, o glutamato tem um papel importante em funções essenciais do SNC; entretanto, uma ativação excessiva do sistema glutamatérgico pode provocar dano ou até mesmo morte neuronal (OLNEY, 1978; LIPTON & ROSEMBERG, 1994; PRICE, 1999). Esta morte neuronal provocada pela estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, devido a uma administração de altas doses de glutamato, ou de agonistas de receptores glutamatérgicos (OLNEY & HO, 1970; OLNEY, 1981) foi inicialmente descrita pelo termo “excitotoxicidade”. Após a descoberta de que antagonistas glutamatérgicos podem ter efeitos benéficos em modelos de desordens neurológicas, tais como isquemia cerebral e epilepsia, o conceito de excitotoxicidade foi modificado. Isto é, passou-se a admitir que o glutamato endógeno possa também ser um mediador de neurotoxicidade, quando se acumula no espaço extracelular (OBRENOVITCH, 1999; OBRENOVITCH e cols., 2000).

Apesar do grande interesse em torno deste tema, os mecanismos intracelulares responsáveis pela excitotoxicidade ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, o aumento de Ca^{2+} intracelular, seguido da ativação de receptores ionotrópicos de glutamato, inchaço osmótico celular, produção de radicais livres e peroxidação lipídica nas membranas celulares, além do aumento na expressão de proteínas apoptóticas, demonstram ter um papel importante (CHOI, 1985, 1987, 1988, 1992, 1995; TYMIANSKI, 1996; PRICE, 1999; PORCIÚNCULA e cols., 2001; ROSSATO e cols., 2002a,b; CENTURIÃO e cols., 2005; NA e cols., 2007).

2.2.1.1. Os receptores de glutamato

Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados, de acordo com estudos farmacológicos e moleculares, em dois grandes grupos: receptores ionotrópicos e metabotrópicos (DICTER & WILCOX, 1997; OZAWA e cols., 1998) (Figura 1).

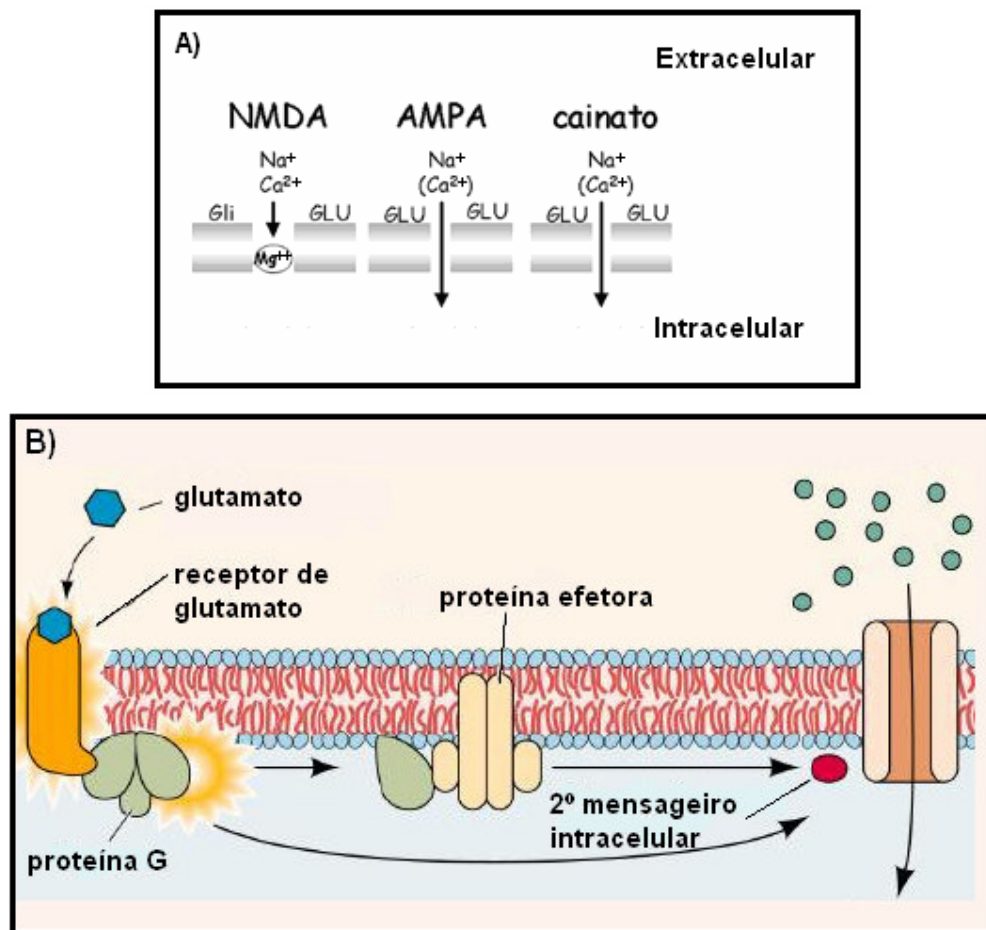


Figura 1. Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (A) e metabotrópicos (B). (Fonte A: <http://www.scielo.br/img/revistas/rbp/v25s2/a12fig01.gif>; B: <http://www.mie.utoronto.ca/.../biopic/fig/44.18.jpg>).

Os receptores ionotrópicos são canais iônicos que permeiam cátions através da membrana neuronal. Portanto, sua ativação provoca a despolarização da membrana sináptica e desencadeia uma resposta excitatória. Estes receptores são subdivididos em N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-

ácido propiônico (AMPA) e cainato (KA), com base na sua sensibilidade a agonistas específicos (COTMANN e cols., 1995).

Os receptores AMPA medeiam a neurotransmissão excitatória rápida e são canais com grande permeabilidade a cátions monovalentes (Na^+ e K^+) e com baixa permeabilidade ao Ca^{2+} (DICHTER & WILCOX, 1997). Estes receptores possuem, ao menos, três sítios para ligantes: o sítio de união de glutamato (ou AMPA), um sítio de união que modula a desensibilização do receptor e outro que bloqueia o influxo de íons e que está localizado no interior do canal (OZAWA e cols., 1998).

Os receptores de KA diferem dos receptores AMPA por serem, além de permeáveis a íons Na^+ e K^+ , relativamente permeáveis a íons Ca^{2+} (OZAWA e cols., 1998). Esses receptores são encontrados em poucas áreas cerebrais ao contrário dos receptores AMPA, que apresentam ampla distribuição no SNC (MONAGHAN & COTMAN, 1982). Além disso, a administração intracerebral ou parenteral de KA em ratos possui efeito convulsivo, e resulta num modelo de dano cerebral que se assemelha ao de pacientes com epilepsia lobo-temporal (BEM-ARI, 1985; DINGLELINE e cols., 1991; KLEINROK e cols., 1995).

Por sua vez, os receptores NMDA medeiam a transmissão sináptica excitatória lenta, são canais com grande permeabilidade ao Ca^{2+} e baixa permeabilidade ao Na^+ e K^+ (LIPTON & ROSEMBERG, 1994; OZAWA e cols., 1998). O complexo do receptor NMDA apresenta diversos sítios para ligantes que regulam a abertura do canal iônico: um sítio para glutamato (ou NMDA), um para o co-agonista endógeno glicina, um sítio no interior do canal para a união de bloqueadores (MK-801 e PCP (fenciclidina)), e sítios modulatórios tais como: um sítio para o Zn^{2+} (antagonista não competitivo do receptor), outro para poliaminas, um sensível a modulação redox (modulado tanto por oxidantes quanto por redutores) e um sítio sensível a H^+ (PIGGOTT e cols., 1992; EULER & LIU, 1993; GOZLAN & BEM-ARI, 1995; MARTIN e cols., 1995; OZAWA e cols., 1998) (Figura 2). Além disso, o canal do receptor NMDA é bloqueado por Mg^{2+} de uma maneira dependente de voltagem (EDMONDS e cols., 1995), ou seja, nos neurônios em potencial de repouso, a ativação do receptor só ocorre se a membrana neuronal for despolarizada, o que permite a saída de Mg^{2+} do interior do canal. O bloqueio dependente de voltagem do canal NMDA por Mg^{2+} pode ser visto como um mecanismo protetor intrínseco contra a entrada excessiva de Ca^{2+} na célula e a conseqüente toxicidade neuronal (SCATTON, 1993).

Particularmente, o “sítio modulatório redox” do receptor NMDA recebeu esta denominação devido a sua sensibilidade aos reagentes redox sulfidrílicos. Por meio deste sítio, agentes redutores sulfidrílicos podem potencializar as respostas mediadas pelo receptor NMDA, enquanto os agentes oxidantes sulfidrílicos são hábeis em diminuir ou inibir estas respostas. De fato, o sítio modulatório redox do receptor NMDA consiste de resíduos críticos de cisteína, os quais quando quimicamente reduzidos aumentam a magnitude das respostas geradas pelo receptor NMDA. Por outro lado, após sua oxidação, as respostas geradas pelo receptor NMDA são diminuídas (PALFREYMAN & REYNOLDS, 1994; MIN, 1999). Este sítio modulatório redox pode ter grande importância fisiológica, uma vez que diversos agentes endógenos (como radicais livres derivados de oxigênio; glutatona oxidada e óxido nítrico dentre outros) têm demonstrado modificar este sítio e, posteriormente, a atividade do receptor NMDA. Além disso, o sítio modulatório redox parece influenciar outros fenômenos relacionados com o receptor NMDA, tais como, a liberação de neurotransmissores, a potenciação a longo prazo e, a excitotoxicidade (PALFREYMAN & REYNOLDS, 1994; MIN, 1999).

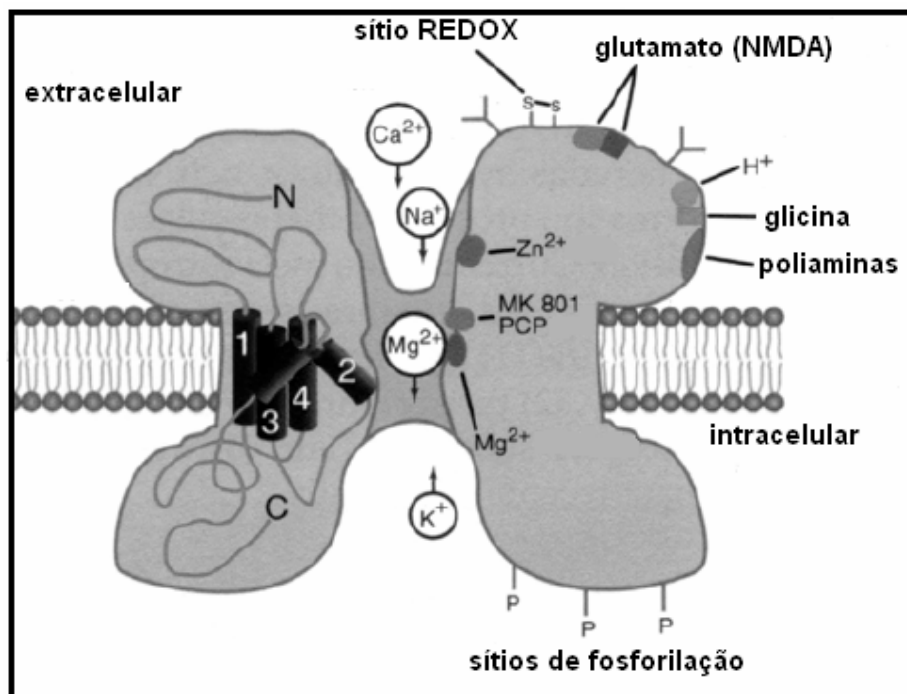


Figura 2. Representação esquemática do receptor NMDA. (Adaptado de Waxman MN. Neurotransmitter receptors. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds. Fundamental neuroscience. London: Academic Press; 1999).

A ativação do receptor NMDA está envolvida no processo de plasticidade neuronal (CHEN & TONEGAWA, 1997; KACZMAREK e cols., 1997). Entretanto, sua estimulação excessiva acarreta aumento do Ca^{2+} intracelular com conseqüente toxicidade celular (MODY & MACDONALD, 1995). Existem evidências de que a excitotoxicidade esteja envolvida na morte neuronal observada em algumas doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer, síndrome de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, neurodegeneração associada a infecções por HIV; bem como em patologias agudas, como o dano neuronal isquêmico e hipoglicêmico (MELDRUM & GARTHWAITE, 1990; DINGLELINE e cols., 1991; LIPTON & ROSEMBERG, 1994; PRICE, 1999).

Diferentemente dos receptores ionotrópicos, os receptores glutamatérgicos metabotrópicos estão associados a sistemas de segundos mensageiros intracelulares (CONN & PINN, 1997). Estes receptores são acoplados a proteínas G (proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina), as quais modulam a atividade de efetores intracelulares, tais como a adenilato ciclase e a fosfolipase C (SCHOEPP & CONN, 1993; COTMANN e cols., 1995; PIN & DUVOISIN, 1995).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos, assim como o ionotrópico NMDA, estão envolvidos no processo de indução da plasticidade neuronal (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Localizados nos terminais pré e pós-sinápticos e nas células gliais, estes receptores também possuem papel importante na indução de convulsões e morte neuronal (TIZZANO e cols., 1995; NICOLETTI e cols., 1996). Particularmente, a ativação de receptores de glutamato metabotrópicos pré-sinápticos pode promover efeitos excitatórios ou inibitórios (TOMOYUKI e cols., 1996; OZAWA e cols., 1998).

2.2.2. O ácido γ -aminobutírico (GABA)

A neurotransmissão sináptica inibitória no SNC de mamíferos é mediada principalmente pelo neurotransmissor GABA, o qual é encontrado em altas concentrações (milimolares) em muitas regiões cerebrais (PAUL, 1995; OLSEN & DELOREY, 1999). A glicose é o principal precursor para a produção de GABA *in vivo*, embora o piruvato e alguns aminoácidos também possam agir como precursores. O primeiro passo na formação deste neurotransmissor é a transaminação do α -cetoglutarato, formado a partir do metabolismo da glicose no

ciclo de Krebs. O α -cetoglutarato é transaminado pela GABA α -cetoglutarato transaminase (GABA-T) formando glutamato (MCGEER & MCGEER, 1989). Nas células em que o GABA é usado como neurotransmissor a presença da enzima glutamato descarboxilase (GAD) catalisa a descarboxilação do glutamato formando o GABA (MCGEER & MCGEER, 1989).

É importante salientar que a GABA-T é tanto uma enzima de síntese quanto de degradação. Este papel duplo é o responsável pela manutenção das concentrações normais de GABA (MCGEER & MCGEER, 1989). Assim como o glutamato, o GABA é armazenado em vesículas sinápticas e liberado para o meio extracelular de maneira dependente de Ca^{2+} . A recaptação do GABA pela ação de transportadores, presentes tanto na membrana do terminal pré-sináptico quanto nas células gliais, é responsável pela finalização da resposta GABAérgica (PAUL, 1995).

2.2.2.1. Os receptores de GABA

Os receptores GABAérgicos foram divididos em três classes, de acordo com suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas: GABA_A, GABA_C (receptores ionotrópicos) e GABA_B (receptores metabotrópicos) (COOPER e cols., 1996; OLSEN & DELOREY, 1999). Os receptores GABA_A e GABA_C são canais iônicos que permitem a entrada de Cl^- , provocando uma hiperpolarização localizada na membrana neuronal, o que dificulta o disparo do potencial de ação necessário para a liberação de neurotransmissores (PAUL, 1995). Portanto, a ação do GABA desencadeia a redução da excitabilidade neuronal.

Com relação as suas características específicas, os receptores GABA_A são ativados por muscimol (o qual se liga no sítio do GABA, no receptor) e bloqueados por bicuculina (seu antagonista competitivo) e picrotoxina (um bloqueador do canal iônico). Além disso, benzodiazepínicos, barbitúricos e alguns neuroesteróides são moduladores da ação do receptor GABA_A (MEHTA & TICKU, 1999).

Quanto aos receptores GABA_B, estes estão associados a proteínas G e, portanto, modulam a atividade de segundos mensageiros intracelulares e a abertura de canais iônicos (Ca^{2+} e K^+) (PAUL, 1995; BENNETT & BALCAR, 1999; OLSEN & DELOREY, 1999). Estão localizados nos terminais pré e pós-sinápticos neuronais e na membrana das células gliais (MACDONALD, 1997). Os receptores GABA_B são

ativados por baclofen (ou GABA) (HOLTZ e cols., 1986) e seletivamente bloqueados por faclofen e saclofen (BOWERY, 1993).

Os receptores GABA_C, assim como os GABA_A, estão expressos em muitas áreas cerebrais, entretanto possuem uma expressão especialmente alta na retina (QIAN & RIPPS, 2001). Diferentemente dos GABA_A, são insensíveis a bicuculina, barbitúricos, benzodiazepínicos e neuroesteróides, bem como insensíveis ao agonista do receptor GABA_B baclofen (DREW e cols., 1984). Por outro lado, são competitivamente inibidos por TPMPA (ácido 4-il-metil-fosfínico-1,2,5,6-tetrahidropiridina) (MURATRA e cols., 1996; RAGOZZINO e cols., 1996). Além disso, a picrotoxina exerce um antagonismo misto em um sítio alostérico do receptor (WANG e cols., 1995; QIAN e cols., 2005). Recentemente, também foi demonstrado que a bilobalida, um constituinte ativo do extrato das folhas da Ginkgo biloba, exerce uma antagonismo misto sobre a subunidade ρ_1 do receptor GABA_C (HUANG e cols., 2006).

Contudo, apesar do papel fisiológico relevante dos receptores GABAérgicos, evidências sugerem que algumas alterações na função GABAérgica estejam envolvidas em desordens neurológicas e psiquiátricas, dentre as quais a doença de Huntington e de Parkinson, epilepsia, esquizofrenia, discinesia tardia, alcoolismo, distúrbios do sono e ansiedade (ENNA & BOWERY, 1997; OLSEN & DELOREY, 1999).

2.3. O Estresse Oxidativo

2.3.1. As espécies reativas de oxigênio (EROs)

As células estão continuamente produzindo radicais livres e espécies reativas de oxigênio como parte dos processos metabólicos. Tais espécies são capazes de gerar estresse oxidativo em decorrência de suas propriedades oxidantes. As principais EROs vinculadas ao estresse oxidativo são o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1989). Estas espécies podem ser neutralizadas por um elaborado sistema de defesa antioxidante que pode ser enzimático (através da catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e glutathione S-transferase) ou não-enzimático (através das

vitaminas A, E e C, flavonóides, ubiquinonas e da glutathiona reduzida (GSH)) (JI & FU, 1992; MIEYAL e cols., 1995; ALEXI e cols., 1998; GIANNI e cols., 2004). Neste contexto, um estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs quanto da redução na capacidade antioxidante celular total. Ou seja, a ocorrência de um dano oxidativo depende de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a atividade das defesas antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; DAWSON & DAWSON, 1996).

2.3.2. A peroxidação lipídica

Alguns compostos são metabolicamente ativados até intermediários reativos, os quais são responsáveis por iniciar eventos tóxicos. Um tipo particular de intermediário reativo é o radical livre (RL). Estes são moléculas, muitas vezes derivadas de oxigênio, que possuem um elétron ímpar na sua órbita externa, caracterizando-se por grande instabilidade, por ter uma vida média muito curta (microsegundos) e por procurar sua estabilidade através do pareamento de seus elétrons (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000). Os RL são espécies eletrofílicas extremamente reativas que podem reagir com componentes celulares. São gerados por uma variedade de processos, podendo atacar uma diversidade de biomoléculas alvo, tais como DNA, lipídeos, ácidos graxos e proteínas de membrana (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000).

Um alvo preferencial desses RL é os ácidos graxos insaturados encontrados na dupla camada de lipídeos das membranas celulares, as quais são vitais para o funcionamento da célula. Estas membranas biológicas são constituídas principalmente por fosfolipídeos, os quais possuem uma cabeça polar e duas caudas hidrofóbicas. Geralmente, as caudas hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, que podem diferir no comprimento e na configuração em que se apresentam, como por exemplo, no número de insaturações (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; ALBERTS e cols., 1994). Quando os RL reagem com esses ácidos graxos insaturados, eles modificam as duplas ligações, determinando rearranjos por perda de fragmentos, ou induzindo angulações diferentes à estrutura do fosfolipídeo. Conseqüentemente, através de uma série de reações em cadeia, a membrana perde suas características estruturais. Desta forma, criam-se verdadeiras fendas iônicas,

as quais alteram sua permeabilidade, favorecendo a entrada e saída indiscriminada de metabólitos e detritos da célula (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000).

Este processo é o resultado da auto-oxidação, onde cada fosfolípídeo afetado passa a ter a função de RL atacando cadeias vizinhas. Porém, para que este processo seja iniciado é necessário que uma espécie suficientemente reativa abstraia um átomo de hidrogênio da cadeia carbônica do ácido graxo, deixando-o na forma de RL (MEDEIROS e cols., 1996). Quando tal ataque é observado, uma série de reações secundárias ocorre, provocando a formação de produtos intermediários tais como, radicais peroxila, alcoxila e hidroperóxidos, e também a formação de produtos terminais como o alcano e etano, malondialdeído (MDA) e 4-hidróxi-2,3-trans-nonenal, o qual é mais conhecido como hidroxinonenal (HNE) (PÓVOA, 1995). Particularmente, dos aldeídos formados no processo de peroxidação, muita atenção tem sido dada ao MDA, muito embora este seja menos nocivo que os aldeídos insaturados, como é o caso do HNE, o qual é altamente citotóxico (ESTERBAUER, 1985). Além disso, a formação destes aldeídos pode danificar células adjacentes, enzimas ligadas às membranas, além de prejudicar a função de receptores.

2.3.3. O dano oxidativo no SNC

Estudos em genética molecular e neuroquímica têm demonstrado que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são importantes processos envolvidos na morte celular e, são eventos precoces associados com a neurodegeneração (BEAL, 1996). Embora a etiologia de muitas patologias do SNC permaneça desconhecida, evidências têm apontado para a ação combinada de três fatores: defeitos no metabolismo energético, excitotoxicidade e estresse oxidativo (BEAL, 1996). Um defeito no metabolismo energético pode conduzir a despolarização neuronal, ativação do receptor para aminoácidos excitatórios NMDA, e aumento no cálcio intracelular, o qual é captado pelas mitocôndrias. A mitocôndria, por sua vez, é a maior fonte intracelular de RL, e o aumento na concentração intracelular de cálcio pode, portanto, aumentar a geração de RL (BEAL, 1996). Como o DNA mitocondrial é particularmente susceptível ao estresse oxidativo, seu dano pode representar um evento precoce associado com a neurodegeneração (AMES e cols., 1993; BEAL, 1996; ALEXI e cols., 1998; MAILLY e cols., 1999; KOWALTOWSKI e cols., 2001). Além disso, o envolvimento do estresse oxidativo nas patologias

cerebrais pode estar associado a um desequilíbrio na regulação redox do SNC (WEBER, 1999; SCHULZ e cols., 2000).

Realmente, o cérebro é um alvo potencial às reações oxidativas. Quando comparado a outros órgãos, podemos observar que o cérebro possui características próprias que o tornam altamente susceptível ao ataque dos RL. Muitas dessas características referem-se à sua composição e suas condições metabólicas. Por exemplo, o cérebro apresenta alto consumo de oxigênio, tem no metabolismo oxidativo da glicose a principal fonte de energia, tem um alto fluxo sanguíneo, alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e alta concentração de neurotransmissores, que podem sofrer oxidação (CLEMENS & PENETTA, 1995). Além disso, o cérebro possui neurônios com grandes prolongamentos, sob os quais altos gradientes iônicos devem ser mantidos para as funções normais. Todas essas características predispõem o cérebro ao ataque dos RL (CLEMENS & PENETTA, 1995).

Particularmente, em muitos processos neuropatológicos, e aqui é importante salientar as convulsões e a epilepsia, quantidades excessivas do aminoácido glutamato, dentre outros aminoácidos neurotransmissores, são liberadas na fenda sináptica. Este evento tem como consequência a ativação de uma cascata excitatória, a qual envolve o influxo de Ca^{2+} , a produção de metabólitos, a excitotoxicidade e o estresse oxidativo, culminando em efeitos deletérios sobre o metabolismo neuronal (CHOI, 1985, 1988, 1992, 1995; MELDRUM, 1991; MAILLY e cols., 1999).

2.4. Modelos de Convulsão

A epilepsia humana é uma das desordens neurológicas mais comuns, apresentando uma elevada incidência mundial (HAUSER & HESDORFFER, 1990; MCNAMARA, 1999; MCKEOWN & MCNAMARA, 2001). Considerando este fato, a investigação dos eventos celulares e neuroquímicos envolvidos no processo convulsivo em cérebros normais, tem atuado como ferramenta eficaz capaz de fornecer evidências acerca do mecanismo causador de episódios convulsivos espontâneos, os quais representam a principal característica do cérebro epilético. Neste sentido, modelos experimentais de convulsão em animais têm representado

um papel fundamental para a compreensão das alterações fisiológicas e comportamentais associadas com a epilepsia humana.

Desde o início do século XX (PUTNAM & MERRITT, 1937), o estudo da convulsão em modelos animais tem conduzido ao descobrimento de estratégias de tratamento contra a epilepsia e, muitas das drogas anticonvulsivas descobertas através da pesquisa em modelos experimentais são comumente prescritas atualmente. Entretanto, como a epilepsia humana é definida pelo aparecimento de múltiplas e recorrentes convulsões espontâneas, a indução de atividade convulsiva aguda na ausência de comportamento epileptiforme crônico em modelos animais *in vivo* é considerada um modelo de convulsão e não de epilepsia (ENGEL, 1992).

Uma variedade de técnicas pode ser utilizada para induzir convulsões parciais (ou focais) ou generalizadas. Tipicamente, a indução de convulsões parciais envolve a estimulação química ou elétrica de uma região cerebral específica. No entanto, a administração sistêmica de agentes convulsivantes é utilizada em modelos animais para a indução de convulsões generalizadas clônico-tônicas, onde a atividade convulsiva atinge ambos os hemisférios cerebrais ampla e simultaneamente, desde o início da crise convulsiva (SHORVON, 1990). A indução de convulsões parciais ou generalizadas representa um método eficiente para avaliar tanto a susceptibilidade às convulsões quanto investigar novos agentes anticonvulsivantes.

De interesse particular para a compreensão deste trabalho, uma convulsão *tônica* consiste em contrações musculares sustentadas, enquanto uma convulsão *clônica* consiste em contrações musculares alternadas com períodos de relaxamento muscular. Ainda, uma convulsão *clônico-tônica* envolve a contração de grupos musculares de todo o corpo e está associada com a perda de consciência, tipicamente por um período de 30-60 segundos (MACNAMARA, 1994).

2.4.1. Modelos de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ)

O pentilenotetrazol é um agente químico convulsivante, freqüentemente utilizado em modelos experimentais para a indução de convulsões (WALLENSTEIN, 1983; DE LIMA & RAE, 1991; ZHU e cols., 2007). Sua ação convulsiva ocorre através do bloqueio do canal de Cl^- do complexo do receptor $GABA_A$, inibindo, portanto, canais ativados por GABA (MACDONALD & BARKER, 1978). Desta forma, a injeção sistêmica de altas doses de PTZ causa convulsões em roedores

(KALUEFF e cols., 2005; SAYYAH e cols., 2005), as quais estão associadas com alterações significativas no sistema GABAérgico (ROCHA e cols., 1996).

Estudos iniciais de união específica de radioligantes sugeriram o sítio benzodiazepínico do receptor $GABA_A$ como o sítio de ação do PTZ (REHAVI e cols., 1982; PRITCHETT e cols., 1989). Além disso, foi demonstrado que uma única administração de PTZ diminui a união específica de benzodiazepínicos no receptor $GABA_A$ (ROCHA e cols., 1996). Entretanto, estudos de união específica subseqüentes demonstraram que o PTZ também poderia agir sobre o sítio picrotoxínico deste receptor (RAMAMJANEYULU & TICKU, 1984; HUANG e cols., 2001). Portanto, considerando estes estudos, considera-se que o PTZ age sobre os sítios benzodiazepínico e picrotoxínico do complexo do receptor $GABA_A$ (SQUIRES e cols., 1984; HUANG e cols., 2001) (Figura 3).

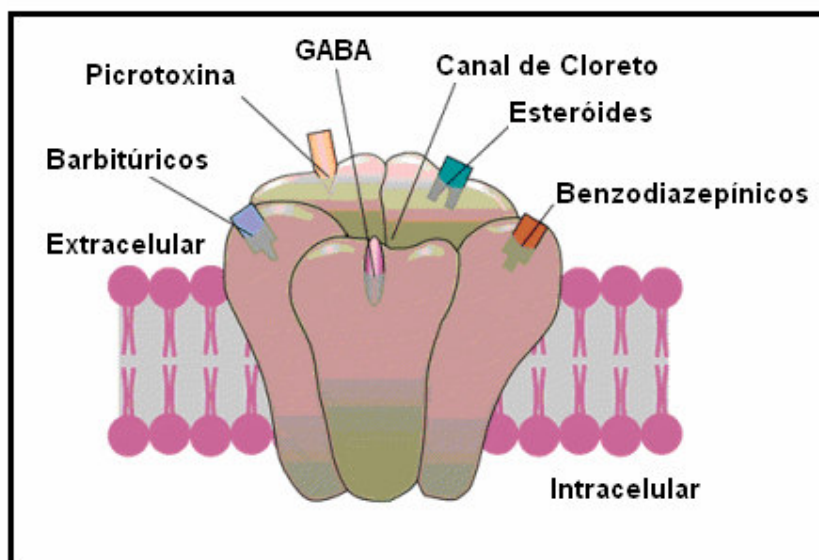


Figura 3. Representação esquemática do complexo do receptor $GABA_A$. (Fonte: homepage.psy.utexas.edu/.../sec2/Brain/37.GIF).

2.4.2. Modelos de convulsão induzida por 4-aminopiridina (4-AP)

A 4-aminopiridina é um conhecido bloqueador de canais de K^+ e ativador de canais de Ca^{2+} , ambos dependentes de voltagem (THESLEFF, 1980; ROGAWSKI & BARKER, 1983), que possui ação convulsivante quando administrada sistemicamente a uma variedade de espécies (SCHAFER, 1973; SPYKER e cols.,

1980; YAMAGUCHI & ROGAWSKI, 1992). Os efeitos convulsivantes da 4-AP devem-se à estimulação da liberação de vários neurotransmissores, onde o glutamato ocupa um papel de destaque (MORALES-VILLAGRÁN & TAPIA, 1996; PEÑA & TAPIA, 1999) com superestimulação de seus receptores, particularmente os do tipo NMDA. Além disso, estudos usando microdiálise demonstraram que a 4-AP estimula preferencialmente a liberação de glutamato no estriado, e que esta liberação tem uma estreita correlação com a atividade convulsiva comportamental (MORALES-VILLAGRÁN & TAPIA, 1996).

A ação da 4-AP tem sido relacionada com o aumento da neurotransmissão glutamatérgica (TAPIA e cols., 1999). Portanto, convulsões induzidas pela injeção sistêmica ou intracerebral de 4-AP podem ser bloqueadas pelo uso de antagonistas competitivos e não-competitivos do receptor NMDA (FRAGOSO-VELOZ & TAPIA, 1992; MORALES-VILLAGRÁN e cols., 1996; AYALA & TAPIA, 2005).

É importante salientar que a 4-AP também possui propriedades terapêuticas. Nas últimas décadas, ela tem sido utilizada clinicamente para aliviar sintomas neurológicos secundários ao bloqueio de condução nervosa em pacientes com diversas desordens neuromusculares, tais como miastenia gravis, síndrome de Lambert-Eaton e botulismo (LUNDH e cols., 1979; SELLIN, 1981; MCEVOY e cols., 1989). Ela também tem sido utilizada a fim de aumentar a condução nervosa após trauma da medula espinhal, bem como em doenças desmielinizantes como a esclerose múltipla (DAVIS e cols., 1990; HAYES e cols., 1994; JENSEN & SHI, 2003). Além disso, a 4-AP tem sido testada como agente para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer (DAVIDSON e cols., 1988). Entretanto, seu uso clínico ainda é limitado pelo baixo índice terapêutico e pelo risco de convulsões e toxicidade ao SNC.

2.5. O 2,3-dimercaptopropanol (BAL)

O BAL (British anti-Lewisite, 2,3-dimercaptopropanol ou dimercaprol) foi desenvolvido durante a 2ª Guerra Mundial na Inglaterra, como antídoto contra gases tóxicos contendo dicloro-vinil arsênio, conhecido como Lewisite. Este composto é um agente quelante ditiólico (Figura 4) bastante lipofílico, característica esta que o permite atravessar facilmente a membrana celular e atingir os espaços intracelulares (ANDERSEN, 1989).

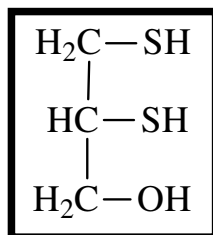


Figura 4. Estrutura do 2,3-dimercaptopropanol (BAL).

O BAL demonstrava extrema eficácia na intoxicação de animais com arsênio, os quais apresentavam 100% de sobrevivência após o tratamento (STOCKEN & THOMPSON, 1946). Além de aumentar a excreção de arsênio em animais intoxicados, experimentos utilizando fatias de tecido epitelial de ratos demonstraram que o BAL prevenia o declínio na captação de oxigênio associada à inibição da enzima piruvato desidrogenase causada pelo Lewisite (PETERS & STOCKEN, 1945). Sua primeira aplicação clínica foi descrita para o tratamento de dermatites, decorrentes do uso terapêutico de compostos orgânicos contendo arsênio, em pacientes com sífilis (LONGCOPE e cols., 1946). A partir de então, intensificaram-se as pesquisas sobre o BAL, passando a ser recomendado para o tratamento de intoxicações agudas causadas por muitos metais pesados, tais como As, Bi, Sb, Pb, Cu, Au e Hg (AASETH, 1983; KLAASSEN, 1990; EMANUELLI e cols., 1996).

Uma das terapêuticas fundamentais em intoxicações agudas por mercúrio é a utilização de compostos que apresentem na estrutura grupos sulfidrílicos (–SH), tais como o BAL (SNODGRASS e cols., 1981; SINGER e cols., 1994; KLAASSEN, 1996). A presença de dois grupos –SH vicinais é reconhecida como essencial para a eficácia do agente quelante (MUCKTER e cols., 1997). Entretanto, apesar da comprovada eficácia do BAL contra intoxicações por arsênio e outros metais, muitos pacientes tratados com este composto apresentaram efeitos colaterais, tais como febre, aumento da pressão sistólica e diastólica, taquicardia, náuseas, vômitos, salivação, lacrimejamento, transpiração e dores de cabeça (APOSHIAN e cols., 1995; PORRU & ALESSIO, 1996), questionando-se sua utilização.

De fato, o BAL possui um baixo índice terapêutico, uma vez que a dose terapêutica efetiva é muito próxima da dose letal (CHISOLM, 1970; ANDERSEN, 1989; KOJIMA e cols., 1989). Esta é a principal razão para o declínio do uso do BAL e o aumento do uso de outros ditióis quelantes, tais como o DMPS (ácido 2,3-

dimercapto-1-propanosulfônico) e o DMSA (ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico), análogos químicos e menos tóxicos deste composto (ANDERSEN, 1989).

Consideravelmente, trabalhos em modelos experimentais têm demonstrado que o tratamento com BAL promove a redistribuição de metais de órgãos periféricos para o cérebro, rins, coração e pulmões, causando toxicidade, fato que também limita seu uso terapêutico (CHISOLM, 1970; EYBL e cols., 1973; GABARD, 1976; KIYOZUMI e cols., 1988; ANDERSEN, 1989; KOJIMA e cols., 1989). Além disso, seu uso é contra-indicado em intoxicações agudas por cloreto de cádmio (DALHAMN & FRIBERG, 1955), pois, devido à sua característica lipofílica, o complexo metal-BAL aumenta a redistribuição do metal, tendo como conseqüência o acréscimo da deposição de cádmio no cérebro.

PEPPIN e colaboradores (1995) relataram o desenvolvimento de encefalopatia seguida de morte, em uma percentagem relativamente elevada de pacientes tratados com Melarsoprol, uma preparação farmacêutica que contém BAL. Ainda, em modelos experimentais, altas doses de BAL causaram convulsão seguida da morte dos animais (NOGUEIRA e cols., 2000). Portanto, limitações terapêuticas são impostas ao BAL, uma vez que níveis tóxicos deste composto podem induzir sintomas clínicos tais como nervosismo, hiperatividade, hiperreflexia e convulsões (MORTENSEN & WALSON, 1993; PORRU & ALESSIO, 1996).

2.6. Os Organocalcogêneos

O interesse pelos organocalcogêneos teve início a partir de 1930, após a descoberta de aplicações sintéticas e propriedades biológicas interessantes destes compostos (PETRAGNANI e cols., 1976; COMASSETO, 1983; PARNHAM & GRAF, 1991; KANDA e cols., 1999). Os organocalcogêneos são importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (PAULMIER, 1986), conseqüentemente, o risco de contaminação ocupacional também tem motivado estudos toxicológicos.

Outro aspecto relevante é a tentativa crescente de desenvolvimento de compostos que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas (PARNHAM & GRAF, 1991). Sob este ponto de vista, têm chamado bastante atenção os organocalcogêneos com propriedades antioxidantes, que em geral, são

inibidores da peroxidação lipídica (SIES, 1993; ENGMAN e cols., 1995; BRIVIBA e cols., 1998; KANDA e cols., 1999).

2.6.1. O selênio e o disseleneto de difenila

O selênio é um elemento traço, cuja essencialidade nutricional, foi demonstrada pela 1ª vez em 1957, em ratos (SCHWARTZ & FOLTZ, 1957). Ele apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante a antioxidante (KLAYMAN, 1973). Particularmente, níveis normais de selênio no organismo são indispensáveis para o apropriado funcionamento do sistema imunológico (RAYMAN, 2000). Nos últimos anos, níveis baixos de selênio têm sido descritos como fator de predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose cardiovascular, cirrose e diabetes (NAVARRO-ALARCÓN & LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000). Além disso, problemas musculares, alterações digestivas, doenças cardiovasculares e alterações reumáticas podem estar associadas à deficiência de selênio no organismo (NEVE e cols., 1987).

Com relação as suas características químicas, o selênio pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}). Tendo em vista a similaridade entre as propriedades químicas do enxofre e do selênio, tem sido estimulada a síntese e o estudo, com fins comparativos, de uma grande variedade de selenomoléculas derivadas de compostos que contenham enxofre (PARNHAM & GRAF, 1991). Entretanto, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre selênio e enxofre constituem as bases de seus papéis biológicos específicos (STADTMAN, 1980).

Descrita em 1973, a glutathiona peroxidase (GSH-Px) foi a primeira selenoproteína caracterizada, onde o selênio participa do sítio ativo da enzima na forma de selenocisteína (FLOHÉ e cols., 1989; CHAPPUIS & POUPON, 1991). Com a descoberta do papel essencial do selênio no sítio ativo da enzima GSH-Px (ROTRUCK e cols., 1981) e com o aumento do entendimento do papel fisiológico do selênio na regulação do dano oxidativo (CADENAS & SIES, 1985; URSINI & BINDOLI, 1987), aumentou o interesse na síntese de compostos orgânicos contendo selênio que possuam propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (PARNHAM & GRAF, 1991).

Neste contexto, trabalhos recentes têm demonstrado que o composto orgânico de selênio disseleneto de difenila (PhSe_2) (Figura 5) tem uma atividade biológica interessante. Ele causa mínima toxicidade quando administrado em baixas doses e agudamente a ratos e camundongos, apresentando atividade antiinflamatória, anti-nociceptiva, neuroprotetora, quimioprotetora e antioxidante (COMMANDEUR e cols., 2001; ROSSATO e cols., 2002a; GHISLENI e cols., 2003; NOGUEIRA e cols., 2003b). Além disso, o $(\text{PhSe})_2$ facilita a memória de reconhecimento de objetos em roedores, o que pode estar relacionado com as ações neuroprotetoras do composto (ROSA e cols., 2003).

Entretanto, apesar de suas propriedades farmacológicas benéficas, o $(\text{PhSe})_2$ também possui efeitos tóxicos, pois a exposição prolongada à doses altas é causa de neurotoxicidade em roedores (NOGUEIRA e cols., 2003a). Estudos em camundongos demonstraram que, devido a grande lipofilicidade, o $(\text{PhSe})_2$ atravessa facilmente a barreira cérebro-sangue após tratamento agudo ou prolongado, aumentando os níveis de selênio no cérebro dos animais (JACQUES-SILVA e cols., 2001; MACIEL e cols., 2003). Portanto, esses trabalhos dão suporte para a hipótese que o cérebro é um alvo potencial para as ações farmacológicas, terapêuticas e também tóxicas do composto orgânico $(\text{PhSe})_2$.

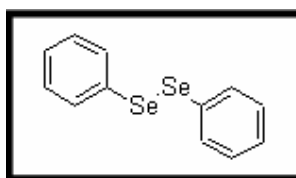


Figura 5. Estrutura do disseleneto de difenila $(\text{PhSe})_2$.

2.6.2. O telúrio e o ditelureto de difenila

O elemento telúrio foi descoberto em 1782, entretanto, a inclusão deste átomo em moléculas orgânicas ocorreu somente no início do século XIX. Os efeitos do telúrio sobre o organismo animal começaram a ser estudados com GMELIN em 1824; contudo, os primeiros relatos a respeito da toxicidade deste elemento aconteceram após o acidente de Windscale (UK), na Europa (STEWART & CROOKS, 1958). No Brasil, a química do telúrio foi introduzida pelo professor Nicola Petragnani, o qual se dedicou ao estudo de compostos orgânicos contendo telúrio e

sua aplicabilidade como intermediários em síntese orgânica (PETRAGNANI, 1995; COMASSETO e cols. 1997).

O telúrio, assim como o enxofre e o selênio, pertence ao grupo 16, da tabela periódica. Ele pode apresentar-se sob diferentes estados de oxidação, quais sejam: telurato (Te^{+6}), telurito (Te^{+4}), telúrio elementar (Te^0) e telureto (Te^{-2}) (SCANSETTI, 1992), sendo encontrado com maior frequência na forma de teluretos. Industrialmente, o telúrio é utilizado no manufaturamento de semicondutores e outros componentes eletrônicos, sendo também empregado na síntese de fármacos, explosivos, na vulcanização da borracha, em lubrificantes sólidos e na petroquímica (FAIRHILL, 1969; PAZ, 1989; TAYLOR, 1996).

Ao contrário do selênio, o telúrio é um elemento traço raro e não apresenta função fisiológica descrita até o momento (TAYLOR, 1996; NOGUEIRA e cols., 2004). Entretanto, as configurações eletrônicas do selênio e do telúrio são semelhantes, e conseqüentemente, estes apresentam algumas características similares, dentre elas, a toxicidade. Casos de intoxicação ocupacional aguda por telúrio são raros, entretanto, quando ocorrem, os sintomas são dores de cabeça, náuseas e alteração da frequência cardíaca (MÜLLER e cols., 1989; TAYLOR, 1996). Particularmente, os compostos de telúrio inorgânico são potentes agentes neurotóxicos, permeáveis à barreira placentária e, portanto, teratogênicos a ratos (AGNEW, 1972; LACASSE & RICHTER, 1976); também, causam hidrocefalia, hipomielinização ou desmielinização (D'GREGORIO & MILLER, 1988; TOEWS e cols., 1991; TAYLOR, 1996). Estes são, portanto, compostos altamente tóxicos, principalmente para os mamíferos em desenvolvimento, podendo afetar a pele e outros órgãos, dentre os quais, os rins (TAYLOR, 1996).

Por outro lado, algumas formas orgânicas de telúrio apresentam notáveis propriedades antiinflamatórias e antivirais (HANSEN, 1853; SREDNI e cols., 1987; SUN e cols., 1996). Estudos têm demonstrado que o composto orgânico de telúrio ditelureto de difenila (PhTe)₂ (Figura 6), pode apresentar propriedade tiol peroxidase, decompondo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou uma variedade de hidroperóxidos lipídicos formando água ou seus alcoóis equivalentes, utilizando GSH ou outros tióis sintéticos reduzidos como doadores de elétrons (ENGMAN e cols., 1992; KANDA e cols., 1999; KLOTZ e cols., 2003; NOGUEIRA e cols., 2004).

Contudo, o composto (PhTe)₂ também possui efeitos tóxicos, os quais têm se demonstrado mais extremos que os causados pelo seu análogo estrutural (PhSe)₂,

produzindo sérios efeitos neurotóxicos em camundongos após exposição aguda ou prolongada (MACIEL e cols., 2000; WIDY-TYSZIEWICZ e cols., 2002).

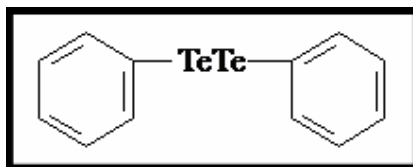


Figura 6. Estrutura do ditelureto de difenila (PhTe)₂.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos, bem como os possíveis mecanismos de ação dos organocalcogêneos - $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$, e do agente quelante sulfidrílico – BAL sobre o SNC, em modelos de convulsão química induzida por PTZ e 4-AP.

3.2. Objetivos Específicos

Considerando os aspectos expostos anteriormente, o presente trabalho pretende avaliar:

1. Em um modelo de convulsão química induzida por PTZ em camundongos:
O efeito do pré-tratamento com os compostos $(\text{PhSe})_2$ e BAL sobre a latência para episódios convulsivos clônico-tônicos e letais.
2. Em um modelo de convulsão química induzida por 4-AP em camundongos:
O efeito do pré-tratamento com os compostos $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$ sobre a latência para episódios convulsivos (clônicos e tônicos) e letais; e
Os níveis de peroxidação lipídica cerebral em animais pré-tratados com os compostos $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$, e tratados com 4-AP.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. O **Artigo 1** está disposto na forma em que foi publicado, e o **Artigo 2** está disposto na forma como foi submetido para a revista científica.

4.1. – Disseleneto de Difenila e 2,3-Dimercaptopropanol Agravam a Convulsão Química e Letalidade Induzidas por Pentilenotetrazol em Camundongos

Artigo 1

Diphenyl diselenide and 2,3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice

Verônica B. Brito, Vanderlei Folmer, Gustavo O. Puntel, Roselei Fachinetto, Júlio C.M. Soares, Gilson Zeni, Cristina W. Nogueira, João B.T. Rocha

Brain Research Bulletin 68 (2006) 414–418.



Diphenyl diselenide and 2,3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice

Verônica B. Brito, Vanderlei Folmer, Gustavo O. Puntel, Roselei Fachinetto, Júlio C.M. Soares, Gilson Zeni, Cristina W. Nogueira, João B.T. Rocha *

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, CAMPUS UNIVERSITARIO-CAMOBÍ, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Received 6 May 2005; received in revised form 8 September 2005; accepted 16 September 2005

Available online 3 October 2005

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the interaction between a classic GABAergic antagonist — pentylenetetrazol (PTZ) with an organoselenium compound — diphenyl diselenide (PhSe)₂ and with the metal chelating agent — 2,3 dimercaptopropanol (BAL). Mice were pre-treated with 150 μmol/kg (PhSe)₂ or BAL (250, 500 or 1000 μmol/kg) before treatment with PTZ. Pre-treatment with (PhSe)₂ reduced the latency for PTZ-induced seizure at doses of 40 and 60 mg/kg and cause a decrease in the latency for PTZ-induced death at the dose of 60 mg/kg. However, treatment with PTZ at dose of 80 mg/kg was not affected by (PhSe)₂ pre-treatment. Pre-treatment with BAL reduced the latency for PTZ-induced seizure at doses of 40 and 50 mg/kg. In addition, the latency for PTZ-induced death at the dose of 40 mg/kg was decreased significantly by pre-treatment with all doses of BAL. At the dose of 50 mg/kg, a significant decrease in the latency for death occurred only in mice pre-treated with 500 and 1000 μmol/kg of BAL. Our results indicate that the PTZ-induced chemical seizures and mortality was enhanced by (PhSe)₂ and BAL. These results indicated that (PhSe)₂ and BAL interact with PTZ possibly by modulating the GABAergic system.

© 2005 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Seizure; (PhSe)₂; PTZ; BAL; Glutamate; GABA

1. Introduction

The essential trace mineral selenium (Se) is of fundamental importance to human health. As a constituent of selenoproteins, Se has structural and enzymatic roles, it is necessary for the proper functioning of the immune system and the deficiency of Se is always associated with the loss of immunocompetence [44]. However, it is well known that exposition for a long time to selenium compounds is highly toxic to several species of mammals [33,35,36]. The molecular mechanism which underlies selenium toxicity is still not completely understood. Nearly 65 years ago, Painter proposed that its toxicity could be related to endogenous thiols oxidation of biological importance [35]. These studies were corroborated by others, who showed that the Se toxicity will be manifested acutely or chronically when oxidative damage exceeds antioxidant defenses

[50,51]. In addition, toxicity of selenium compounds not only depends on the chemical form and quantity of the element consumed, but also on a variety of other factors including, among others, species, age and the route of administration [31,33].

In this context, diphenyl diselenide (PhSe)₂ is an organoselenium compound with interesting biological activity. It causes minimal toxicity when administrated acutely to mice and rats in doses that have anti-inflammatory and nociceptive activities [32]. However, besides to these pharmacological properties, (PhSe)₂ has toxic effects and chronic exposure to high doses cause neurotoxicity in mice [31]. Studies performed by our group demonstrated that (PhSe)₂ crosses the blood–brain barrier after acute or chronic treatment increasing Se levels in mice brain [23,29]. These results have supported the hypothesis that the brain is a potential target for the toxicity of highly lipophilic organoselenium compounds and possibly for their pharmacological and therapeutic actions. Nevertheless, the mechanism underlying the neurotoxicity of organoselenium compounds is still poorly known.

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3220 8140; fax: +55 21 3220 8978.
E-mail address: jbtrocha@yahoo.com.br (J.B.T. Rocha).

BAL (2,3-dimercaptopropanol) is a dithiol chelating agent that shows sulfhydrylic and lipophylic characteristics. Because of its lipophylicity, this compound can cross the cellular membrane and reach the intracellular spaces [3,4]. Although BAL has capacity to ameliorate the deleterious effects of metal intoxication, its toxicity limits its therapeutic use [3,10]. Furthermore, treatment with BAL promotes metal redistribution from peripheral organs to brain [1,17,20,21,56]. In a previous work, we demonstrated that high doses of BAL causes convulsion followed by death of the animals [30]. In addition, GABAergic allosteric modulators (diazepam and phenobarbital) blocked the appearance of seizures and reduced almost completely the death caused by BAL, which indicates that parts of its pro-convulsive effects is mediated at least indirectly by interfering with the GABAergic system [30].

Pentylenetetrazol (PTZ) is a convulsant chemical agent frequently used in experimental models for induction of seizures [13,43]. PTZ is a GABAergic non-competitive antagonist that does not interact directly with GABA receptors, but blocks the GABA-mediated Cl^- influx [22]. Some studies have indicated that the pharmacological effect of PTZ is at least partly mediated via interactions with the ionophore channel of the GABA_A receptor [52]. The intraperitoneal injection of PTZ in rats causes tonic-clonic seizures [25,48]. Evidence suggest that (PhSe)₂-induced seizure are abolished or reduced by allosteric modulators of GABAergic system (diazepam, phenobarbital and muscimol) and by atropine, a competitive antagonist of muscarinic cholinergic receptors, suggesting that the neurotoxic effect of (PhSe)₂ is related to a direct interaction with muscarinic receptors [31]. Furthermore, radioligand-binding studies demonstrated that the site of action of PTZ is the benzodiazepine site of the GABA_A receptor [41,45]. Experiments also revealed that a single administration of PTZ produced benzodiazepine-binding decrease, suggesting that PTZ-induced chemical seizure may be associated with significant changes of the GABAergic system [47].

The fact that convulsant properties of the (PhSe)₂ and BAL are modulated at least indirectly by classic allosteric GABAergic agonists as diazepam and phenobarbital [30], indicates that their pro-convulsive effects are mediated at least indirectly by antagonism of the GABAergic system. However, data showing that the (PhSe)₂ and BAL can facilitate the action of convulsant agents who act via blockade of GABAergic system are still lacking in the literature.

Therefore, the aim of present study was to investigate the effects of pre-administration of (PhSe)₂ and BAL in the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice. The latency for to seizure and death were recorded as parameter of neurotoxicity of the compounds.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Diphenyl diselenide (PhSe)₂ was synthesized by method previously described [18,40]. Pentylenetetrazol (PTZ), 2,3 dimercaptopropanol (BAL) and Tween were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Animals

Male mice (*Mus musculus*, 2–3-month-old) weighing 25–35 g, from our own breeding colony were used. The animals were kept on separate animal rooms, at 12 light/dark cycle (07:00–19:00 h lights on), at a room temperature of (22 ± 2 °C), with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

2.3. Experimental procedures

The mice were pre-treated with a single injection of (PhSe)₂ (150 µmol/kg, 2.5 ml per kg of body mass, i.p., dissolved in Tween — 10%) or Tween (vehicle) and 10 min after were treated with a single injection of PTZ (40, 60 or 80 mg/kg, i.p., dissolved in water), or only water (vehicle). Other group of study was pre-treated with a single injection of BAL (250, 500 or 1000 µmol/kg, 2.5 ml/kg of body mass, i.p., dissolved in 0.9% saline) or only saline (vehicle). Ten minutes after the injection of BAL, the mice were treated with a single injection of PTZ (40 or 50 mg/kg, i.p., dissolved in water) or water (vehicle).

The dose of 150 µmol/kg (PhSe)₂ was selected in accordance with previous work when this dose did not cause convulsive effects [31]. In addition, previous works carried out in our group indicated the appropriate doses of BAL to be tested here [30]. The dose of the convulsive agent PTZ was elected based in a preliminary study of dose-response curve (data not shown).

In short, after the treatment with PTZ the behavior of animals was observed for 30 min in Plexiglas chambers for the appearance of tonic-clonic seizures. The latency for the onset of the first tonic-clonic convulsive episode and the latency for death were recorded [30].

2.4. Statistical analyses

Data of latency for the onset of the first tonic-clonic convulsive episode between correlated groups were analyzed by Mann-Whitney *U*-test, and the number of seizures and survival between the groups were analyzed by Fischer's exact test. Differences between the groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

3. Results

Table 1 shows that (PhSe)₂, i.p., at dose of 150 µmol/kg caused seizures in animals only when the mice were post-injected with PTZ, and when used alone the survival was of 100%. The pre-treatment with (PhSe)₂ caused a decrease on the latency to PTZ-induced seizure at the doses of 40 and 60 mg/kg and caused a decrease on the latency to PTZ-induced death at dose of 60 mg/kg. The survival was not affected by pre-treatment with (PhSe)₂, when the dose of PTZ was 40 mg/kg. At the highest dose of PTZ (80 mg/kg) all animals died, regardless of the pre-treatment.

Table 2 shows that BAL, i.p., alone (1000 µmol/kg) caused seizures in 60% of the animals, and this dose did not cause death. At lower doses (250 and 500 µmol/kg), BAL did not provoke convulsive episodes. The convulsant effects of BAL and PTZ were increased by their combined administrations. In fact, the latency to seizure induced by 40 or 50 mg/kg PTZ was considerably reduced by all the tested doses of BAL (250–1000 µmol/kg). The latency to death induced by 40 mg/kg of PTZ was reduced by all tested doses of BAL. At 50 mg/kg of PTZ, the latency to death was affected significantly by 500 and 1000 µmol/kg. The death incidence was also significantly potentiated by the treatment with the two drugs.

Table 1
Influence of pre-treatment with (PhSe)₂ on the PTZ-induced latency to seizures and survival in mice

Pre-treatment + treatment	Seizures	Latency for seizure (min)	Survival	Latency for death (min)
Tween	0/10	30 ± 0	10/10	30 ± 0
Tween + PTZ 40 mg/kg	0/9	30 ± 0	9/9	30 ± 0
Tween + PTZ 60 mg/kg	8/14	15.32 ± 3.59	14/14	30 ± 0
Tween + PTZ 80 mg/kg	9/9	1.62 ± 0.13	0/9	5.85 ± 1.27
(PhSe) ₂	0/15	30 ± 0	15/15	30 ± 0
(PhSe) ₂ + PTZ 40 mg/kg	9/9 ^b	5.30 ± 1.37 ^a	9/9	30 ± 0
(PhSe) ₂ + PTZ 60 mg/kg	14/14	3.01 ± 0.64 ^a	9/14	23.73 ± 2.70 ^a
(PhSe) ₂ + PTZ 80 mg/kg	9/9	1.46 ± 0.14	0/9	5.46 ± 0.83

After 10 min of pre-treatment with 150 μmol/kg diphenyl diselenide, i.p. (experimental groups) or vehicle (control group), mice were injected i.p. with PTZ (40, 60 or 80 mg/kg). After treatment with PTZ, mice behavior was observed for 30 min.

^a Significantly different from respective control (Tween pre-treatment) $p < 0.05$ by Mann–Whitney test.

^b Significantly different from respective control (Tween pre-treatment) $p < 0.05$ by Fisher exact test.

Table 2
Influence of pre-treatment with BAL on the PTZ-induced latency to seizure and survival in mice

Pre-treatment + treatment	Seizures	Latency for seizure (min)	Survival	Latency for death (min)
Saline	0/10	30 ± 0	10/10	30 ± 0
Saline + PTZ 40 mg/kg	3/10	22.20 ± 4.00	10/10	30 ± 0
Saline + PTZ 50 mg/kg	3/7	19.01 ± 5.19	7/7	30 ± 0
BAL 250 μmol/kg	0/5	30 ± 0	5/5	30 ± 0
BAL 500 μmol/kg	0/5	30 ± 0	5/5	30 ± 0
BAL 1000 μmol/kg	3/5	22.39 ± 3.38	5/5	30 ± 0
BAL 250 μmol/kg + PTZ 40 mg/kg	7/7	5.24 ± 2.77 ^a	5/7	12.89 ± 3.03 ^a
BAL 500 μmol/kg + PTZ 40 mg/kg	7/7	2.08 ± 0.29 ^a	1/7	8.28 ± 2.63 ^a
BAL 1000 μmol/kg + PTZ 40 mg/kg	7/7	3.81 ± 0.56 ^a	0/7 ^b	8.97 ± 1.24 ^a
BAL 250 μmol/kg + PTZ 50 mg/kg	9/10	3.34 ± 0.84 ^a	2/10	24.83 ± 3.62
BAL 500 μmol/kg + PTZ 50 mg/kg	10/10	2.84 ± 0.53 ^a	1/10 ^b	13.66 ± 3.73 ^a
BAL 1000 μmol/kg + PTZ 50 mg/kg	10/10	3.14 ± 0.82 ^a	0/10 ^b	8.58 ± 1.58 ^a

After 10 min of pre-treatment with BAL i.p. (experimental groups) or vehicle (control group), mice were injected i.p. with PTZ (40 or 50 mg/kg). After treatment with PTZ, mice behavior was observed for 30 min.

^a Significantly different from respective control $p < 0.05$ by Mann–Whitney test.

^b Significantly different from respective control $p < 0.05$ by Fisher exact test.

4. Discussion

Our data demonstrate that the pre-administration of organoselenium compound — (PhSe)₂ before treatment with PTZ caused neurotoxicity, which was demonstrated by an increase in the susceptibility for PTZ-induced seizure or death. Likewise (PhSe)₂, the administration of BAL prior PTZ reduced the latency for PTZ-induced seizure or death, pointing to a possible common mechanism between (PhSe)₂ and BAL as pro-convulsive agents.

PTZ is a chemical convulsant that can generate clonic or tonic-clonic seizures in animals and man [11,12,37,57]. PTZ has different effects in the behavior and cerebral metabolites, depending on the dose. Doses above of 50 mg/kg have been reported to be convulsive [15,19], whereas doses below 40 mg/kg did not produce seizures [19]. In fact, these are subconvulsive doses and produce sensitization to convulsions during chronic treatment [14,16]. Our results are in close agreement with literature data and show that only few animals convulsed when 40 mg/kg of PTZ was used. PTZ is a selective blocker of the chloride ionophore complex of the GABA_A receptor [22,43] and its convulsant effects after repeated or single dose

affects several neurotransmitter systems, such as the GABAergic [26,27,37,42,46,47,55], adenosinergic [34,53] and the glutamatergic system in different brain areas [14,24,27,49,54].

In addition, there are points of evidence that the neurotransmitters glutamate and GABA are centrally involved in the convulsive process and the abnormal amplification and synchronization of neuronal firing that leads to seizure episodes and their subsidence involve likely interaction of GABAergic inhibitory mechanisms and glutamatergic excitatory mechanisms [7]. In this context, there is evidence of the role of excitatory amino acids, mainly glutamate, in the neurotoxic effects of seizures [9,28].

Experimental evidence suggest that GABAergic agonists are effective in reducing the (PhSe)₂-induced [31] and BAL-induced convulsion [30]. In line with this, here we demonstrated for the first time that the effects of the convulsant agent PTZ is considerably increased by (PhSe)₂ and BAL, highlighting the role of inhibition of GABAergic system on the neurotoxicity of these compounds. However, the participation of glutamatergic system is unlikely, because the NMDA receptor antagonist MK-801 did not modulate the convulsant activity of BAL and (PhSe)₂ [30,31].

The mechanism of action of (PhSe)₂ and BAL can involve a direct interaction with the redox state of the GABA receptors. In fact, the GABA_A receptors activity can be increased by reducing agents such as DTT and decreased by oxidizing agents such as DTNB [2]. In this regard, (PhSe)₂ is a compound that can oxidize –SH groups from proteins and of low-molecular weight thiol-containing molecules such as glutathione [5,33]. Consequently, this compound could potentially oxidize the GABA_A receptor redox site, diminishing GABA_A receptor activity.

In the case of BAL, it is well established that this dithiol compound is rapidly oxidized to its disulfide form in aqueous medium [6,17] forming a potential oxidant molecule. In previous work from our laboratory we demonstrated that GABAergic allosteric modulators (diazepam and phenobarbital) blocked the appearance of seizures and reduced almost completely the death caused by BAL, while sodium valproate and MK-801 were not effective in reducing the incidence of seizures [30].

Thus one possible mechanism for the potentiation of PTZ effect by (PhSe)₂ and BAL can involve the depletion of reduced thiols by these compounds. In line with this, literature data indicates that PTZ can lead a decrease in the levels of non-protein and protein –SH groups in brain of mice [38,39]. This reduction could increase the susceptibility of GABAergic receptor to inactivation by oxidation.

In view of the potential increase in the use of Se compounds, including diphenyl diselenide, as a pharmacological agent [8], it becomes interesting to study the interaction of this compound with other drugs. In addition, the chelating agent BAL is used therapeutically, therefore is recommendable to avoid the combined use of BAL and diphenyl diselenide, because they apparently have some common mechanism of action as pro-convulsive agents.

Acknowledgements

The financial support by CNPq, CAPES and FAPERGS is gratefully acknowledged.

References

- [1] J. Aaseth, J. Alexander, Treatment of mercuric chloride poisoning with dimercaptosuccinic acid and diuretics: preliminary studies, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 19 (1982) 173–186.
- [2] A. Amato, C.N. Connolly, S.J. Moss, T.G. Smart, Modulation of neuronal and recombinant GABA_A receptors by redox reagents, *J. Physiol.* 517 (1999) 35–50.
- [3] O. Andersen, Oral cadmium exposure in mice: toxicokinetics and efficiency of chelating agents, *Toxicology* 20 (1989) 83–112.
- [4] H.V. Aposhian, R.M. Maiorino, M. Rivera, D.C. Bruce, R.C. Dart, K.M. Hurlbut, D.J. Levine, W. Zheng, F. Quintus, D. Carter, M.M. Aposhian, Human studies with the chelating agents DMPS and DMSA, *Clin. Toxicol.* 30 (1992) 505–528.
- [5] N.B.V. Barbosa, J.B.T. Rocha, G. Zeni, T. Emanuelli, M.M.C. Beque, A.L. Braga, Effect of organic forms of selenium on δ-aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats, *Toxicol. Appl. Pharm.* 149 (1998) 243–253.
- [6] E.S.G. Barron, Z.B. Miller, G. Kalnitsky, The oxidation of dithiols, *Biochem. J.* 41 (1947) 62–68.
- [7] H.F. Bradford, Glutamate, GABA and epilepsy, *Prog. Neurobiol.* 47 (1995) 477–511.
- [8] M.E. Burger, R. Fachineto, L. Calegari, M.W. Paixão, A.L. Braga, J.B.T. Rocha, Effects on age on orofacial dyskinesia reserpine-induced and possible protection of diphenyl-diselenide, *Brain Res. Bull.* 64 (2004) 339–345.
- [9] B.S. Chang, D.H. Lowenstein, *Epilepsy, N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 1257–1266.
- [10] J.J. Chisolm Jr., Poisoning due to heavy metals, *Pediatr. Clin. N. Am.* 17 (1970) 591–615.
- [11] N.C. Coimbra, C. Castro-Souza, E.N. Segato, J.E.P. Nora, C.F.P.S. Herrero, W. Tedeschi-Filho, N. Garcia-Cairasco, Post-ictal analgesia: involvement of opioid, serotonergic and cholinergic mechanisms, *Brain Res.* 888 (2001) 314–320.
- [12] N.C. Coimbra, R.L. Freitas, M. Savoldi, C. Castro-Souza, E.N. Segato, R. Kishi, A. Weltson, Opioid neurotransmission in the post-ictal analgesia: involvement of μ₁-opioid receptor, *Brain Res.* 903 (2001) 216–221.
- [13] T.C. De Lima, G.A. Rae, Effects of cold-restraint and swim stress on convulsions induced by pentylenetetrazol and electroshock: influence of naloxone pre-treatment, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40 (1991) 297–300.
- [14] A. Ekonomou, F. Angelatou, Upregulation of NMDA receptors in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazole-induced “kindling” model of epilepsy, *Neurochem. Res.* 24 (1999) 1515–1522.
- [15] H. Eloqayli, C.B. Dahl, K.G. Götestam, G. Unsgård, H. Hadidi, U. Sonnewald, Pentylenetetrazole decreases metabolic glutamate turnover in rat brain, *J. Neurochem.* 85 (2003) 1200–1207.
- [16] H. Eloqayli, C.B. Dahl, K.G. Götestam, G. Unsgård, U. Sonnewald, Changes of glial-neuronal interaction and metabolism after a subconvulsive dose of pentylenetetrazole, *Neurochem. Int.* 45 (2004) 739–745.
- [17] T. Emanuelli, J.B.T. Rocha, M.E. Pereira, L.O. Porciúncula, V.M. Morsch, A.F. Martins, D.O. Souza, Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on aminolevulinatase dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice, *Pharmacol. Toxicol.* 79 (1996) 138–143.
- [18] L. Engman, Expedient synthesis of Ebselen and related compounds, *J. Org. Chem.* 54 (1989) 2964–2966.
- [19] V. Erakovic, G. Zupan, J. Varljen, J. Laginja, A. Simonic, Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylenetetrazol kindling and pentylenetetrazol-induced seizures, *Epilepsy Res.* 43 (2001) 165–173.
- [20] V. Eybl, J. Sykora, M. Koutenska, J. Koutenska, F. Mertl, Effect of spironolactone, thiomestron and dimercaprol on the toxicity, retention and redistribution of mercury in the mouse, *Arzneimittel-Forsch.* 23 (1973) 867–870.
- [21] B. Gabard, The excretion and distribution of inorganic mercury in rats as influenced by several chelating agents, *Arch. Toxicol.* 35 (1976) 15–24.
- [22] R.Q. Huang, C.L. Bell-Homer, M.L. Dibas, D.F. Covey, J.A. Drewe, G.H. Dillon, Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (2001) 986–995.
- [23] M.C. Jacques-Silva, C.W. Nogueira, L.C. Broch, E.M. Flores, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice, *Pharmacol. Toxicol.* 88 (2001) 119–125.
- [24] P.J. Jensen, N. Millan, K.J. Mack, Cortical NMDAR-1 gene expression is rapidly upregulated after seizure, *Mol. Brain Res.* 44 (1997) 157–162.
- [25] A.V. Kalueff, A. Minasyan, P. Tuohimaa, Anticonvulsant effects of 1,25-dihydroxyvitamin D in chemically induced seizures in mice, *Brain Res. Bull.* 67 (1/2) (2005) 156–160.
- [26] D. Kondziella, J. Hammer, O. Sletvold, U. Sonnewald, The pentylenetetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: glial-neuronal metabolic interactions, *Neurochem. Int.* 43 (2003) 629–637.
- [27] Z.P. Li, X.Y. Zhang, X. Lu, M.K. Zhong, Y.H. Ji, Dynamic release of amino acid transmitters induced by valproate in PTZ-kindled epileptic rat hippocampus, *Neurochem. Int.* 44 (2004) 263–270.
- [28] S.A. Lipton, P.A. Rosenberg, Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *N. Engl. J. Med.* 330 (1994) 613–622.

- [29] E.N. Maciel, E.M. Flores, J.B.T. Rocha, V. Folmer, Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70 (2003) 470–476.
- [30] C.W. Nogueira, F.A. Soares, R.C. Bolzan, M.C. Jacques-Silva, D.O. Souza, J.B.T. Rocha, Investigations into the mechanism of 2,3-dimercaptopropanol neurotoxicity, *Neurochem Res.* 25 (2000) 1553–1558.
- [31] C.W. Nogueira, F.C. Meotti, E. Curte, C. Pilissão, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats, *Toxicology* 183 (2003) 29–37.
- [32] C.W. Nogueira, E.B. Quinhones, E.Q. Jung, G. Zeni, J.B. Rocha, Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide, *Inflam. Res.* 52 (2003) 56–63.
- [33] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6255–6285.
- [34] O. Pagonopoulou, F. Angelatou, Time dependent and regional distribution of [³H]nitrobenzylthioinosine adenosine uptake site binding in the mouse brain after acute pentylenetetrazol-induced seizures, *J. Neurosci. Res.* 53 (1998) 433–442.
- [35] E.P. Painter, The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem, *Chem. Rev.* 28 (1941) 179–213.
- [36] V.P. Palace, J.E. Spallholz, J. Holm, K. Wautier, R.E. Evans, C.L. Baron, Metabolism of selenomethionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos can generate oxidative stress, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 58 (2004) 17–21.
- [37] N.T. Panagopoulos, E. Kazanis, E. Sotiriou, P. Papanastasiou, N.A. Matsokis, Effect of the pentylenetetrazole (PTZ) induced seizures on the gabaergic system in the mouse brain, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 48.
- [38] N. Patsoukis, G. Zervoudakis, C.D. Georgiou, F. Angelatou, N.A. Matsokis, N.T. Panagopoulos, Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex, *Epilepsy Res.* 62 (2004) 65–74.
- [39] N. Patsoukis, G. Zervoudakis, N.T. Panagopoulos, C.D. Georgiou, F. Angelatou, N.A. Matsokis, Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure, *Neurosci. Lett.* 357 (2004) 83–86.
- [40] C. Paulmier, Selenium reagents and intermediates organic synthesis, Pergamon, Oxford, 1986.
- [41] D.B. Pritchett, H. Southeimer, B.D. Shivers, S. Ymer, H. Kettenmann, P.R. Schofield, P.H. Seeburg, Importance of a novel GABA(A) receptor subunit for benzodiazepine pharmacology, *Nature* 338 (1989) 582–585.
- [42] C. Psarropoulou, N. Matsokis, F. Angelatou, G. Kostopoulos, Pentylenetetrazol-induced seizures decrease γ -aminobutyric acid-mediated recurrent inhibition and enhance adenosine-mediated depression, *Epilepsia* 35 (1994) 12–19.
- [43] R. Ramanjaneyulu, M.K. Ticku, Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxin site of the benzodiazepine–GABA receptor–ionophore complex, *Eur. J. Pharmacol.* 98 (1984) 337–345.
- [44] M.P. Rayman, The importance of selenium to human health, *The Lancet* 356 (2000) 233–241.
- [45] M. Rehavi, P. Skolnick, S.M. Paul, Effects of tetrazole derivatives on [³H]diazepam binding in vitro: correlation with convulsant potency, *Eur. J. Pharmacol.* 78 (1982) 353–356.
- [46] L. Rocha, R.F. Ackermann, J. Engel Jr., Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study, *Epilepsy Res.* 24 (1996) 65–72.
- [47] L. Rocha, M. Briones, R.F. Ackerman, B. Anton, N.T. Maidment, C.J. Evans, J. Engel Jr., Pentylenetetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems, *Epilepsy Res.* 26 (1996) 105–113.
- [48] M. Sayyah, S. Moaied, M. Kamalnejad, Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed, *J. Ethnopharmacol.* 98 (1/2) (2005) 209–211.
- [49] H. Schröder, A. Becker, B. Lössner, Glutamate binding to brain membranes is increased in pentylenetetrazol-kindled rats, *J. Neurochem.* 60 (1993) 1007–1011.
- [50] J.E. Spallholz, On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity, *Free Rad. Biol. Med.* 17 (1994) 45–64.
- [51] J.E. Spallholz, V.P. Palace, T.W. Reid, Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 547–554.
- [52] R.F. Squires, E. Saederup, J.N. Crawley, P. Skolnick, S.M. Paul, Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain, *Life Sci.* 35 (1984) 1439–1444.
- [53] J. Tchekalarova, E. Sotiriou, V. Georgiev, G. Kostopoulos, F. Angelatou, Up-regulation of adenosine A1 receptor binding in pentylenetetrazol kindling in mice: effects of angiotensin IV, *Brain Res.* 1032 (2005) 94–103.
- [54] C. Thomsen, Pentylenetetrazol-induced seizures increase [³H]-L-2-amino-4-phosphonobutyrate binding in discrete regions of the rat brain, *Neurosci. Lett.* 266 (1999) 5–8.
- [55] L.A. Walsh, M. Li, T.J. Zhao, T.H. Chiu, H.C. Rosenberg, Acute pentylenetetrazol injection reduces rat GABA_A receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with no effect on benzodiazepine binding site density, *J. Pharm. Exp. Ther.* 289 (1999) 1626–1633.
- [56] A. Wannag, J. Aaseth, The effect of immediate and delayed treatment with 2,3-dimercaptopropane-1-sulphonate on the distribution and toxicity of inorganic mercury in mice and in fetal and adult rats, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 46 (1980) 81–88.
- [57] D.M. Woodbury, G.H. Glaser, J.K. Penry, D.M. Woodbury (Eds.), Convulsant Drugs: Mechanism of Action, vol. 27, *Advances in Neurology* Raven Press, New York, 1980, pp. 249–303.

4.2. – Disseleneto de Difenila e Ditelureto de Difenila Aumentam a Latência para a Convulsão Química e Inibem a Morte Induzidas por 4-Aminopiridina em Camundongos

Artigo 2

Diphenyl Diselenide and Diphenyl Ditelluride Increase the Latency for Chemical Seizure and Inhibit the Death 4-Aminopyridine-Induced in Mice

Verônica B. Brito^a, João Batista T. Rocha^a, Fernando Erthal^a, Vanderlei Folmer^{a,b,*},
Gilson Zeni^a

Submetido à Brain Research Bulletin, agosto 2007.

Diphenyl Diselenide and Diphenyl Ditelluride Increase the Latency for Chemical Seizure and Inhibit the Death 4-Aminopyridine-Induced in Mice

Verônica B. Brito^a, João Batista T. Rocha^a, Fernando Erthal^a, Vanderlei Folmer^{a,b,*},
Gilson Zeni^a

^a*Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, CAMPUS UNIVERSITÁRIO-CAMOBÍ, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.*

^b*Centro de Ciências da Saúde de Uruguaiana - Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA/UFSM, 97500-009, Uruguaiana, RS, Brasil.*

Acknowledgements: The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

Conflict of interest statement

This work was not published and it is not intent to publish it anywhere, except in *Brain Research Bulletin* journal. All listed authors concur with the submission of the manuscript, and the final version was approved by all authors. The corresponding author states that all authors had full access to all data of the study, and had responsibility for the decision of to submit it for publication. The authors have no financial interest or personal conflicts of interest.

*Corresponding Author:

Vanderlei Folmer

Phone: 021 - 55 3411-5174

Fax: 021 - 55 3411-5174

E-mail: vandfolmer@gmail.com

Abstract

The K⁺ channels blocker, 4-aminopyridine (4-AP), is a powerful convulsant agent that induces the release of both excitatory and inhibitory neurotransmitters. The systemic or intracerebral administration of 4-AP induces generalized seizures in several species. In this study, we investigated the effect of the pre-treatment with selenium and tellurium compounds on the 4-AP-induced chemical seizure and lethality in mice. In addition, the brain lipid peroxidation level after treatment of the animals with 4-AP, as well as the effect of the pre-treatment with the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ compounds on this level, were investigated. For these purposes, mice were pretreated with diphenyl diselenide (PhSe)₂ or diphenyl ditelluride (PhTe)₂ (50, 100, or 150 μmol/kg, s.c.) 30 minutes before administration of 4-AP (12 mg/kg, i.p.). Treatment with 4-AP caused a significant incidence of seizures (clonic and tonic) and death. On the other hand, pre-treatment with (PhSe)₂ and (PhTe)₂ (50, 100, and 150 μmol/kg) significantly increased the latency for clonic and tonic seizures, and inhibited the death 4-AP-induced. Significantly, the pre-treatment of the animals with (PhSe)₂ and (PhTe)₂ caused an increase in the latency for clonic seizures in a dose-dependent manner. Additionally, it was observed a significant increase in the brain lipid peroxidation level after treatment with 4-AP, which was significantly inhibited by pre-treatment with the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ compounds. Therefore, these results demonstrate that (PhSe)₂ and (PhTe)₂ increase the latency for seizures, as well as inhibit the death 4-AP-induced. It is possible suppose that this effect results of the modulation of redox sites of NMDA receptors, and/or modulation in the Ca²⁺ channels activity with consequent alteration in the neurotransmitters release. Importantly, the study provided evidences for the anticonvulsant and antioxidant properties of the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ compounds, which point out for its neuroprotective properties in this model.

Key-words: seizure, 4-aminopyridine, diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride, lipid peroxidation, selenium.

1. Introduction

Epilepsy is a collection of diverse disorders that together affects approximately 1-2% of the world population [20,34]. Although the epilepsy can manifest itself in a number of different ways, each type of epilepsy shares the common feature of the increased neuronal excitability, which manifests through seizures generation [28,33,34]. Typically, a seizure episode refers to a transient change of behaviour due to the abnormal, disordered, and at high-frequency firing of populations of neurons in the central nervous system (CNS) [28].

Actually, it is well established that the excitatory and inhibitory neurotransmission in the CNS is mediated mainly by glutamate and GABA, respectively. Any dysfunction of these neurotransmitter systems, through a decrease in GABAergic and/or an increase in glutamatergic neurotransmission, can be involved in the development of seizures [4,36]. In addition, the amplification of the neuronal unbalance that leads to the convulsive episodes, as well its subsidence, involve the interaction of GABAergic inhibitory and glutamatergic excitatory mechanisms [4].

Particularly, evidences suggest that the oxidative stress, due to an increase in the reactive oxygen species (ROS) production, is an important factor involved in the seizure-induced neuronal damage [3,10,51]. This involvement is supported, partially, by observations that the oxidation of cellular macromolecules is increased by excitotoxins that produce seizures [24,27]. Moreover, the activation of excitatory amino acid receptors can trigger the formation of ROS, resulting in the excitotoxicity process [55], which is thought to play a critical role in seizure-induced neuronal damage [10]. Of particular importance, works have demonstrated that the resultant cell death from excitotoxic processes can be prevented by certain antioxidants [30,51,61]. Indeed, the brain is a vulnerable target for oxidative processes. This fact can be attributed to its composition and metabolic conditions, such as, high oxygen consumption, high blood flow, high concentration of neurotransmitters and polyunsaturated fatty acids [8,18], which can be oxidized.

4-Aminopyridine (4-AP) is a K⁺ channels blocker and Ca²⁺ channel stimulator, both voltage-dependent gated [50,63], which has convulsant action when administered systemically or intracerebrally in a variety of species [15,58,60,67]. The convulsant effects of the 4-AP are due to stimulation of release of both excitatory and

inhibitory neurotransmitters, where glutamate has a central role [40,48]. As consequence of the augmented glutamate release, occurs an overactivation of excitatory amino acid receptors, mainly the N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type. Particularly, an enhancement of the glutamatergic neurotransmission has been linked to convulsant action of the 4-AP [62], since NMDA receptor antagonists protected against seizures induced by systemic or intracerebral injection of this drug [16,41].

In the last decades, a variety of organic forms of selenium and tellurium have been emphasized due to its interesting biological properties. Notably, utilization of the redox activity of selenium and tellurium atoms provides antioxidant properties of considerable potency, suitable as tools in free-radical biology and medicine [2,9,45]. In fact, these organochalcogens have been pointed out as possible antioxidant agents because they exhibit glutathione peroxidase-like activity. Through of this property, they can decompose H_2O_2 or a variety of hydroperoxides from lipids to H_2O or its equivalent alcohols using GSH or other synthetic reduced thiols as electron donors [25,26,45]. In addition, these organochalcogens retard the lipid peroxidation induced by a variety of oxidants [12,13,53].

In this context, it has been demonstrated that the diphenyl diselenide $(PhSe)_2$ possesses interesting biological activity. It causes minimal toxicity when administrated acutely in low doses to mice and rats, showing anti-inflammatory, anti-nociceptive, neuroprotective, chemopreventive, and antioxidant activities [9,17,43,53]. Furthermore, the $(PhSe)_2$ improves the object recognition memory of rodents, which may be related to its neuroprotective actions [52]. Contrasting with the $(PhSe)_2$, diphenyl ditelluride $(PhTe)_2$, its analogous tellurium compound, has demonstrated to be more toxic to rodents after acute or prolonged exposure [37,44,64].

In brief, the main aim of the present study was to investigate the effects of the pre-treatment with the $(PhSe)_2$ and $(PhTe)_2$ compounds on chemical seizures and lethality induced by 4-AP in mice. Additionally, the brain lipid peroxidation level after treatment of the animals with 4-AP, as well as the effect of the pre-treatment with the $(PhSe)_2$ and $(PhTe)_2$ compounds on this level, were investigated. Importantly, the achievement of this study can be of great value, in view of a possible finding of neuroprotective compounds against convulsant drugs and, also, against side effects of drugs used clinically, as is the case of the 4-AP.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

4-Aminopyridine (4-AP), sodium dodecil sulphate (SDS), thiobarbituric acid (TBA), and malondialdehyde (MDA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO., USA). Tris(hydroxymethyl)aminomethane and sodium chloride were obtained from Merck (Rio de Janeiro, Brasil). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

Diphenyl diselenide (PhSe_2) and diphenyl ditelluride (PhTe_2) were prepared in our laboratory according to literature methods [47,49]. Analysis of ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrum showed that the PhSe_2 and PhTe_2 obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structures. The chemical purity of the compounds (99.9%) was determined by GC/HPLC. These compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO).

2.2. Animals

Male mice (*Mus musculus*, ~ 3 month-old, 30-35 g body weight) from our own breeding colony (Animal House-holding, UFSM, Brazil) were maintained in separate animal's rooms, at 12h light/dark cycle (07:00–19:00 h lights on) and at a room temperature of $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. All animals were fed with a conventional ration (Labina[®], Purina, Canoas, RS, Brasil), and had free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

2.3. In vivo experiments

2.3.1. 4-AP-induced seizures

Animals were pretreated with a single injection of PhSe_2 or PhTe_2 (50, 100, or 150 $\mu\text{mol/kg}$, 2.5 ml per kg of body mass, subcutaneously (s.c.), dissolved in DMSO) or DMSO alone (vehicle). At 30 minutes after the administration of the organochalcogens, animals were treated with a single injection of 4-AP (12 mg/kg, 2.5 ml per kg of body mass, intraperitoneally (i.p.), dissolved in water), or only water (vehicle). In short, animals were divided as follows:

- Group 1 – control [DMSO + water]
- Group 2 – [DMSO + 4-AP]
- Group 3 – [50 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ or (PhTe)₂ + water]
- Group 4 – [50 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ or (PhTe)₂ + 4-AP]
- Group 5 – [100 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ or (PhTe)₂ + water]
- Group 6 – [100 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ or (PhTe)₂ + 4-AP]
- Group 7 – [150 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ or (PhTe)₂ + water]
- Group 8 – [150 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ or (PhTe)₂ + 4-AP]

Mice were placed in individual Plexiglas chambers (20x20x19cm), and after treatment with 4-AP, the behaviour was observed for 60 minutes for the appearance of seizures (clonic and tonic) and death. Appearance of seizures was quantified as previously described [31,33]. The latency for the onset of the first convulsive episode (clonic or tonic), and the latency for death were recorded as parameters of neurotoxicity or neuroprotection of the compounds.

The doses of (PhSe)₂ and (PhTe)₂ were selected in accordance with previous works where these doses did not cause convulsive effects [37,43]. In addition, the dose of 4-AP was selected in accordance with previous work, which showed a significant convulsive effect [66].

2.4. Ex vivo experiments

At final of observation period, the animals of the groups 1, 2, 7, and 8 were sacrificed under mild ether anaesthesia. Brains were quickly removed, placed on ice, and homogenized in ten volumes of cold 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). The homogenate was centrifuged at 4000 *g* at 4°C for 10 min to yield a low-speed supernatant fraction that was used for thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay. For the analysis of the lipid peroxidation levels were selected only animals pretreated with 150 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ and (PhTe)₂, in view that this dose increased the latency for seizures and inhibited death more than others.

2.4.1. Lipid peroxidation

TBARS levels were determined according to Ohkawa et al. [46] with some modifications according to Rossato et al. [54]. In short, reaction mixture contained

100 μ L 8.1% SDS, 500 μ L 1.267 mol/L acetic acid/ 270 mmol/L HCl (pH 3.5), and 500 μ L 0.8% TBA. TBARS levels were quantified by addition of 200 μ L low-speed supernatant fraction directly to the above reaction medium. Samples were incubated at 90°C for 60 min and then centrifuged at 1000 $\times g$ for 15 min. The amount of TBARS produced was measured at 532 nm, using MDA for to construct the standard curve.

2.5. Statistical analysis

Data of latency for the onset of the first clonic and tonic convulsive episode between correlated groups were analyzed by Mann-Whitney *U* test. Seizure and death incidence was analyzed by Fischer's exact test. TBARS values between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA, SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL) followed by Duncan's Multiple Range Test. Pearson's correlation coefficients were determined by linear regression analysis. Results are expressed as means \pm SEM, and differences between groups were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

Table I shows that the 4-AP (12 mg/kg) caused a significant incidence of clonic and tonic seizures, and all mice died after administration of this drug. Contrasting, the pre-treatment of the animals with (PhSe)₂, at doses of 50, 100, and 150 μ mol/kg, caused a significant increase in the latency for clonic seizures. The pre-treatment with (PhSe)₂, in all doses, completely prevented the incidence of tonic seizures, and also the death 4-AP-induced. In addition, the pre-treatment of the mice with (PhSe)₂ caused an increase in the latency for clonic seizures in a dose-dependent manner ($r = 0.880$, $p < 0.001$). Importantly, when the animals were injected only with (PhSe)₂, in all doses tested, seizures were not observed and the survival was 100%.

Table II shows that the pre-treatment with (PhTe)₂, in all doses tested, significantly increased the latency for seizures (clonic and tonic) and completely abolished the death. In addition, 150 μ mol/kg (PhTe)₂ completely prevented the appearance of clonic and tonic seizures. At same form that with the (PhSe)₂, the pre-

treatment of the animals with (PhTe)₂ caused an increase in the latency for clonic seizures in a dose-dependent manner ($r = 0.764$, $p < 0.001$). Particularly, when the animals were injected only with (PhTe)₂, in all doses tested, seizures were not observed and the survival was 100%.

Furthermore, involvement of the oxidative stress in this model of seizure 4-AP-induced was investigated. For this purpose, the brain lipid peroxidation level of the groups 1, 2, 7, and 8 was investigated. **Figure 1** shows that the administration of 4-AP caused a significant increase in TBARS level, which was significantly prevented by the pre-treatment with 150 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ and (PhTe)₂.

4. Discussion

Our data showed that the administration of (PhSe)₂ and (PhTe)₂ previously to the treatment with the convulsant 4-AP significantly increased the latency for seizures and inhibited the death in mice. In addition, the pre-treatment of the animals with (PhSe)₂ and (PhTe)₂ caused an increase in the latency for clonic seizures in a dose-dependent manner. Importantly, our data demonstrated that the pre-treatment of mice with 150 $\mu\text{mol/kg}$ (PhSe)₂ and (PhTe)₂ significantly inhibited the increase in TBARS levels caused by administration of 4-AP. Considerably, this study demonstrated, for the first time, an antioxidant effect of the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ compounds on 4-AP-induced oxidative damage in brain mice, in addition to a marked anticonvulsant effect.

4-AP is one of the most commonly used K⁺ channel inhibitors [50,63]. Its mechanism of action occurs through a K⁺ channel blockade at the presynaptic neuron level, mediated by its entry into the channel pore in the open, closed, or intermediate state. Thereby, the efflux of intracellular K⁺ is suppressed and the calcium influx is enhanced, leading to an increase in the release of neurotransmitters and, therefore, to an increase in the nervous signal [39]. Particularly, this is also the characteristic responsible by the therapeutic properties of the 4-AP. In fact, in the last decades, 4-AP has been indicated for the treatment of diverse neuromuscular disorders, including myasthenia gravis, Lambert-Eaton syndrome, and botulism [29,32,59]. More recently, clinical trials demonstrated an efficient role of the 4-AP in conduction signal enhancement after spinal cord trauma [19,21,22,23], as well in the demyelinating diseases, as the multiple sclerosis [11]. Nevertheless, the clinical use

of the 4-AP is still limited by its narrow therapeutic range and by the risk of seizures and toxicity to the CNS.

Indeed, 4-AP is used experimentally for induction of seizures in several species [15,58,60,67]. Our results are in close agreement with the literature data, showing that all mice developed seizures after systemic administration of 12 mg/kg 4-AP. Particularly, studies have demonstrated that when this drug is perfused in the striatum or hippocampus, generates behavioural and electroencephalographic seizures associated with an increase in the extracellular concentration of glutamate [40,48]. Really, it has been established that the convulsant effects of the 4-AP are due to preferential glutamate release from synaptic terminals [40]. In addition, evidences have shown that the enhancement of the glutamatergic neurotransmission is involved in the excitotoxic mechanisms of the seizures [16,41], and seems to be an important factor involved in many neurological disorders [7,36]. Taking into account these facts and the anticonvulsant actions of the $(\text{PhSe})_2$ and $(\text{PhTe})_2$ compounds showed in this work, it is possible suppose that these organochalcogens had acted through a direct interaction with glutamate receptors, particularly the NMDA receptor, modulating its redox site. Thus, decreasing the activity of NMDA receptors, these organochalcogens can cause a decrease in the glutamatergic neurotransmission, acting as possible mediators of excitotoxic processes due to seizures in the CNS. In this context, recent works demonstrated that the antinociceptive properties of the $(\text{PhSe})_2$, in several models of pain, can occur via interaction with redox modulatory sites of glutamate receptors, more specifically via interaction with the NMDA receptor [56,57].

In the last decades, there was an increasing interest in the biochemical and pharmacological effects of the organoselenium and organotellurium compounds. This fact can be due to findings of a variety of compounds that possess interesting biological activity. For instance, it can be cited for the organoselenium compounds antioxidant, enzyme inhibitor, neuroprotector, chemopreventive, anti-inflammatory, anti-nociceptive, anti-infectious, cytokine inducer, and immunomodulator properties [9,17,43,45,52,53]. Similarly, organotellurium compounds are readily oxidized from the divalent to the tetravalent state. Consequently, this property makes the tellurides attractive as scavengers of reactive oxidizing agents (such as the hydrogen peroxide, hypochloride, and peroxy radicals) and as inhibitors of the lipid peroxidation in

chemical and biological systems [1,2]. In this way, authors have described high antioxidant activity for the organotellurium compounds [12,14,63].

In this context, an increase in the brain lipid peroxidation levels was observed after treatment with 4-AP, which was significantly inhibited by the pre-treatment with (PhSe)₂ and (PhTe)₂. Thus, these results confirm the antioxidant properties of the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ compounds and show, at first hand, an antioxidant effect of these organochalcogens against 4-AP-induced oxidative damage in brain mice. These effects are in accordance with previous studies of our group, showing that both (PhSe)₂ and (PhTe)₂ are effective antioxidants against the production of TBARS in brain rodents, induced by different pro-oxidant agents *in vitro* and *in vivo* [5,6,38,53]. Furthermore, our results indicate an important involvement of the brain lipid peroxidation in the seizure process, and is in close agreement with literature data, indicating that the oxidative stress and the resultant excitotoxicity process are important factors involved in the seizure-induced neuronal damage [3,10,55].

In spite of these new results, our data still are insufficient to point an exact mechanism of action for these organochalcogens. However, we thought that, besides the interaction with the redox modulatory sites of glutamatergic NMDA receptors, (PhSe)₂ and (PhTe)₂ may be interacting with Ca²⁺ channels activity in mice brain. Thereby, through an inhibition of the Ca²⁺ influx at the presynaptic neuron level, these compounds can modify the neurotransmitters release and the conduction signals. In this way, these organochalcogens may also act as possible modulators of the excitotoxicity in the CNS. In fact, previous study of our group showed that, under depolarizing conditions through 4-AP, organochalcogens compounds inhibited ⁴⁵Ca²⁺ influx into rat brain synaptosomes [42].

Therefore, our results provided evidences for the anticonvulsant and antioxidant properties of the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ compounds. These data point out for its neuroprotective characteristics in the model of 4-AP-induced neurotoxicity in mice. However, we cannot extrapolate our findings for humans and further studies are necessary for to elucidate the precise protective mechanism(s) of the (PhSe)₂ and (PhTe)₂ against 4-AP-induced neurotoxicity.

5. References

- [1] C.M. Andersson, R. Brattsand, A. Hallberg, L. Engman, J. Persson, P. Moldeus, I. Cotgreave, Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Radical Res.* 20 (1994) 401-410.
- [2] C.M. Andersson, A. Hallberg, R. Brattsand, I.A. Cotgreave, L. Engman, J. Persson, Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3 (1993) 2553-2558.
- [3] W.M. Armstead, R. Mirro, C.W. Leffler, D.W. Busija, Cerebral superoxide anion generation during seizures in new born pigs. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9 (1989) 175–179.
- [4] H.F. Bradford, Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 47 (1995) 477-511.
- [5] M. Burger, R. Fachinetto, L. Calegari, M.W. Paixão, A.L. Braga, J.B.T. Rocha, Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. *Brain Res. Bull.* 64 (2004) 339-345.
- [6] M.E. Burger, R. Fachinetto, C. Wagner, J. Perottoni, R.P. Pereira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Effects of diphenyl–diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. *Brain Res. Bull.* 70 (2006) 165-170.
- [7] D.W. Choi, Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1 (1988) 623–634.
- [8] J.A. Clemens, J.A. Penetta, Free radicals in central nervous systems diseases. In: D. Blake, P.G. Winyard (eds). *Immunopharmacology of free radical species.* Academic Press, San Diego (1995) 73-83.
- [9] J.N. Commandeur, M. Rooseboom, N.P. Vermeulen, Chemistry and biological activity of novel selenium-containing compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.* 500 (2001) 105-112.
- [10] J.T. Coyle, P. Puttfarcken, Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262 (1993) 689–695.
- [11] F.A. Davis, D. Stefoski, C.L. Schauf, Orally administered 4-aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 27 (1990) 186–192.
- [12] L. Engman, J. Persson, K. Vessman, M. Ekstrom, M. Berglund, C.M. Andersson, Organotellurium compounds as efficient retards of lipid peroxidation in methanol. *Free Rad. Biol. Med.* 19 (1995) 441–452.

- [13] L. Engman, D. Stern, I.A. Cotgreave, C.M. Andersson, Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a HNMR method. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 9737–9743.
- [14] L. Engman, D. Stern, M. Pelcman, C.M. Andersson, Thiol Peroxidase Activity of Diorganyl Tellurides. *M. J. Org. Chem.* 59 (1994) 1973-1979.
- [15] J. Fragoso-Veloz, L. Massieu, R. Alvarado, R. Tapia, Seizures and wet dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their potentiation by nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* 178 (1990) 275–284.
- [16] J. Fragoso-Veloz, R. Tapia, NMDA receptor antagonists protect against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 221 (1992) 275-280.
- [17] G. Ghisleni, L.O. Porciúncula, H. Cimarostia, J.B.T. Rocha, C.G. Salbego, D.O. Souza, Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoccontent. *Brain Res.* 986 (2003) 196–199.
- [18] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and diseases. *Biochem. J.* 219 (1984) 1–14.
- [19] J.A. Halter, A.R. Blight, W.H. Donovan, O. Calvillo, Intrathecal administration of 4-aminopyridine in chronic spinal injured patients. *Spinal Cord* 38 (2000) 728–732.
- [20] W.A Hauser, D.C Hesdorffer, *Epilepsy: Frequency, Causes and Consequences.* Demos, New York 1990.
- [21] K.C. Hayes, 4-Aminopyridine and spinal cord injury: a review. *Restor. Neurol. Neurosci.* 6 (1994) 259-270.
- [22] K.C. Hayes, P.J. Potter, D.L. Wolfe, J.T.C. Hsieh, G.A. Delaney, A.R. Blight, 4-Aminopyridine-sensitive neurologic deficits in patients with spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 11 (1994) 433–446.
- [23] J.M. Jensen, R. Shi, Effects of 4-aminopyridine on stretched mammalian spinal cord: the role of potassium channels in axonal conduction. *J. Neurophysiol.* 90 (2003) 2334-2340.
- [24] K. Kaneko, K. Itoh, L.J. Berliner, K. Miyasaka, D.H. Fujii, Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. *Magn. Reson. Med.* 48 (2002) 1051–1056.

- [25] L.O. Klotz, K.D. Kroncke, D.P. Buchczyk, H. Sies, Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* 1333 (2003) 1448S–1451S.
- [26] L. Klotz, H. Sies, Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol. Lett.* 140 (2003) 125-132.
- [27] L.P. Liang, Y.S. Ho, M. Patel, Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience* 101 (2000) 563–570.
- [28] E.W. Lothman, E.H. Bertram III, J.L. Stringer, Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog. Neurobiol.* 37 (1991) 1-82.
- [29] H. Lundh, O. Nilsson, I. Rosen, Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 42 (1979) 171–175.
- [30] D.G. MacGregor, M.J. Higgins, P.A. Jones, W.L. Maxwell, M.W. Watson, D.I. Graham, T.W. Stone, Ascorbate attenuates the systemic kainate-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *Brain Res.* 727 (1996) 133–144.
- [31] R. Maggio, F. Fumagalli, E. Donati, P. Barbier, G. Racagni, G.U. Corsini, M. Riva, Inhibition of nitric oxide synthase dramatically potentiates seizures induced by kainic acid and pilocarpine in rats. *Brain Res.* 679 (1995) 184-187.
- [32] K.M. McEvoy, A.J. Windebank, N.J.R. Daube, P.A. Low, 3-4-Diaminopyridine in the treatment of Lambert–Eaton myasthenic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 321 (1989) 1567–1571.
- [33] J.O. Mcnamara, Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. Neurosci.* 6 (1994) 3413-3425.
- [34] J.O. Mcnamara, Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 399 (1999) A15-A22.
- [35] B. Meldrum, Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res.* 10 (1991) 55–61.
- [36] B. Meldrum, Neurotransmission in epilepsy. *Epilepsy* 36 (1995) S30–S35.
- [37] F.C. Meotti, V.C. Borges, G. Zeni, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. *Toxicol. Lett.* 143 (2003) 9–16.
- [38] F.C. Meotti, E.C. Stangherlin, G. Zeni, C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.* 94 (2004) 276–282.

- [39] J. Molgó, M. Lemeignan, F. Peradejordi, P. Lechat, Effects presynaptiques des aminopyridines a la juntion neuromusculaire de vertébrés. *J. Pharmacol.* 16 (1985) 109–144.
- [40] A. Morales-Villagrán, R. Tapia, Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem. Int.* 28 (1996) 35–40.
- [41] A. Morales-Villagrán, M. Ureña-Guerrero, R. Tapia, Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 305 (1996) 87–93.
- [42] M.B. Moretto, J.I. Rossato, C.W. Nogueira, C.W. Zeni, J.B.T. Rocha, Voltage-dependent ebselen and diorganochalcogenides inhibition of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into brain synaptosomes. *J. Biochem. Mol. Tox.* 17 (2003) 154–160.
- [43] C.W. Nogueira, E.B. Quinhones, E.A.C. Jung, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Evidence for anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52 (2003) 56–63.
- [44] C.W. Nogueira, L.N. Rotta, M.L. Perry, D.O. Souza, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.* 906 (2001) 157–163.
- [45] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104 (2004) 255–285.
- [46] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351–358.
- [47] C. Paulmier, Selenoorganic functional groups. Selenium reagents and intermediates in organic synthesis, Oxford: Pergamon Press (1986) 25–51.
- [48] F. Peña, R. Tapia, Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J. Neurochem.* 72 (1999) 2006–2014.
- [49] N. Petragnani, Tellurium in Organic Synthesis. London: Academic Press (1994) 9–88.
- [50] M.A. Rogawski, J.L. Barker, Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain Res.* 280 (1983) 180–185.

- [51] Y. Rong, S.R. Doctrow, G. Tocco, M. Baudry, EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. *PNAS* 96 (1999) 9897–9902.
- [52] R.M. Rosa, D.G. Flores, H.R. Appelt, A.L. Braga, J.A. Henriques, R. Roesler, Facilitation of long-term object recognition memory by pre-training administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci. Lett.* 341 (2003) 217–220.
- [53] J.I. Rossato, L.A. Ketzer, F.B. Centurião, S.J.N. Silva, D.S. Lüdtke, G. Zeni, A.L. Braga, M.A. Rubin, J.B.T. Rocha, Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* 3 (2002) 297–303.
- [54] J.I. Rossato, G. Zeni, C.F. Mello, M.A. Rubin, J.B.T. Rocha, Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioural alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci. Lett.* 318 (2002) 137–140.
- [55] S.J. Said, H. Pakbaz, H.I. Berisha, S. Raza, NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 28 (2000) 1300–1302.
- [56] L. Savegnago, L.G. Pinto, C.R. Jesse, D. Alves, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, G. Zeni, Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 555 (2007) 129–138.
- [57] L. Savegnago, L.G. Pinto, C.R. Jesse, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, G. Zeni, Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide. *Brain. Res.* 1162 (2007) 32–37.
- [58] E.W. Schafer Jr., R.B. Brunton, D.J. Cunningham, A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26 (1973) 532–538.
- [59] L.C. Sellin, The action of botulinum toxin at the neuromuscular junction. *Med. Biol.* 59 (1981) 11–20.
- [60] D.A. Spyker, C. Lynch, J. Shabanowitz, J.A. Sinn, Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin. Toxicol.* 16 (1980) 487–497.
- [61] D. Tan, L.C. Manchester, R.J. Reiter, W. Qi, S.J. Kim, G.H. El-Sokkary, Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid-induced damage in mice. *J. Neurosci. Res.* 54 (1998) 382–389.

- [62] R. Tapia, L. Medina-Ceja, F. Peña, On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem. Int.* 34 (1999) 23–31.
- [63] S. Thesleff, Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5 (1980) 1413–1419.
- [64] E. Widy-Tyszewicz, A. Piechal, B. Gajkowska, M. Smialek, Tellurium-induced cognitive deficits in rats are related to neuropathological changes in the central nervous system. *Toxicol. Lett.* 131 (2002) 203–214.
- [65] E. Wieslander, L. Engman, E. Svensjö, M. Erlansson, U. Johansson, M. Linden, C.M. Andersson, R. Brattsand, Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems. *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 573–584.
- [66] J.Y.F. Wong, S.A. Ross, C. McColl, J.S. Massalas, E. Powney, D.I. Finkelstein, M. Clark, M.K. Horne, S.F. Berkovic, J. Drago, Proconvulsant-induced seizures in α_4 nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice. *Neuropharmacology* 43 (2002) 55–64.
- [67] S. Yamaguchi, M.A. Rogawski, Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 11 (1992) 9–16.

Figures and Legends

Figure 1: Effects of the pre-treatment with 150 $\mu\text{mol/kg}$ $(\text{PhSe})_2$ and $(\text{PhTe})_2$, and treatment with 4-AP (12 mg/kg) on TBARS production in mice brain. Data are means \pm SEM; n=6-8. **(a)** Indicates significant difference from DMSO ($P < 0.05$), and **(b)** indicates significant difference from DMSO + 4-AP ($P < 0.05$).

Table 1: Influence of the pre-treatment with (PhSe)₂ on latency to seizures (clonic and tonic) and death, in the model of 4-AP-induced seizure in mice.

Pre-treatment + Treatment	Clonic seizure	Latency for clonic seizure (min)	Tonic seizure	Latency for tonic seizure (min)	Survival	Latency for death (min)
DMSO	0/8	60.00 ± 0.00	0/8	60.00 ± 0.00	8/8	60.00 ± 0.00
DMSO + 4-AP 12 mg/kg	8/8 [@]	9.13 ± 1.19 ^a	8/8 [@]	18.13 ± 3.68 ^a	0/8 [@]	32.13 ± 6.42 ^a
(PhSe)₂ 50 µmol/kg	0/5	60.00 ± 0.00	0/5	60.00 ± 0.00	5/5	60.00 ± 0.00
(PhSe)₂ 50 µmol/kg + 4-AP 12 mg/kg	6/6	20.17 ± 1.76 ^b	0/6 [#]	60.00 ± 0.00 ^b	6/6 [#]	60.00 ± 0.00 ^b
(PhSe)₂ 100 µmol/kg	0/5	60.00 ± 0.00	0/5	60.00 ± 0.00	5/5	60.00 ± 0.00
(PhSe)₂ 100 µmol/kg + 4-AP 12 mg/kg	2/7	50.14 ± 6.36 ^b	0/7 [#]	60.00 ± 0.00 ^b	7/7 [#]	60.00 ± 0.00 ^b
(PhSe)₂ 150 µmol/kg	0/6	60.00 ± 0.00	0/6	60.00 ± 0.00	6/6	60.00 ± 0.00
(PhSe)₂ 150 µmol/kg + 4-AP 12 mg/kg	1/8	56.38 ± 3.63 ^b	0/8 [#]	60.00 ± 0.00 ^b	8/8 [#]	60.00 ± 0.00 ^b

After 30 min of pre-treatment with 50, 100, or 150 µmol/kg (PhSe)₂, or DMSO, mice were injected with 4-AP (12 mg/kg) or vehicle. After treatment with 4-AP, mice behaviour was observed for 60 min.

(a) Significantly different from DMSO, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test.

(b) Significantly different from DMSO + 4-AP, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test.

(@) Significantly different from DMSO, $p < 0.05$ by Fisher exact test.

(#) Significantly different from DMSO + 4-AP, $p < 0.05$ by Fisher exact test.

Table 2: Influence of the pre-treatment with (PhTe)₂ on latency to seizures (clonic and tonic) and death, in the model of 4-AP-induced seizure in mice.

<i>Pre-treatment + Treatment</i>	<i>Clonic seizure</i>	<i>Latency for clonic seizure (min)</i>	<i>Tonic seizure</i>	<i>Latency for tonic seizure (min)</i>	<i>Survival</i>	<i>Latency for death (min)</i>
DMSO	0/8	60.00 ± 0.00	0/8	60.00 ± 0.00	8/8	60.00 ± 0.00
DMSO + 4-AP 12 mg/kg	8/8 [@]	9.13 ± 1.19 ^a	8/8 [@]	18.13 ± 3.68 ^a	0/8 [@]	32.13 ± 6.42 ^a
(PhTe)₂ 50 µmol/kg	0/5	60.00 ± 0.00	0/5	60.00 ± 0.00	5/5	60.00 ± 0.00
(PhTe)₂ 50 µmol/kg + 4-AP 12 mg/kg	2/6	43.67 ± 10.45 ^b	1/6	51.67 ± 8.33 ^b	6/6 [#]	60.00 ± 0.00 ^b
(PhTe)₂ 100 µmol/kg	0/5	60.00 ± 0.00	0/5	60.00 ± 0.00	5/5	60.00 ± 0.00
(PhTe)₂ 100 µmol/kg + 4-AP 12 mg/kg	2/6	46.50 ± 8.88 ^b	1/6	58.33 ± 1.67 ^b	6/6 [#]	60.00 ± 0.00 ^b
(PhTe)₂ 150 µmol/kg	0/8	60.00 ± 0.00	0/8	60.00 ± 0.00	8/8	60.00 ± 0.00
(PhTe)₂ 150 µmol/kg + 4-AP 12 mg/kg	0/8 [#]	60.00 ± 0.00 ^b	0/8 [#]	60.00 ± 0.00 ^b	8/8 [#]	60.00 ± 0.00 ^b

After 30 min of pre-treatment with 50, 100, or 150 µmol/kg (PhTe)₂, or DMSO, mice were injected with 4-AP (12 mg/kg) or vehicle. After treatment with 4-AP, mice behaviour was observed for 60 min.

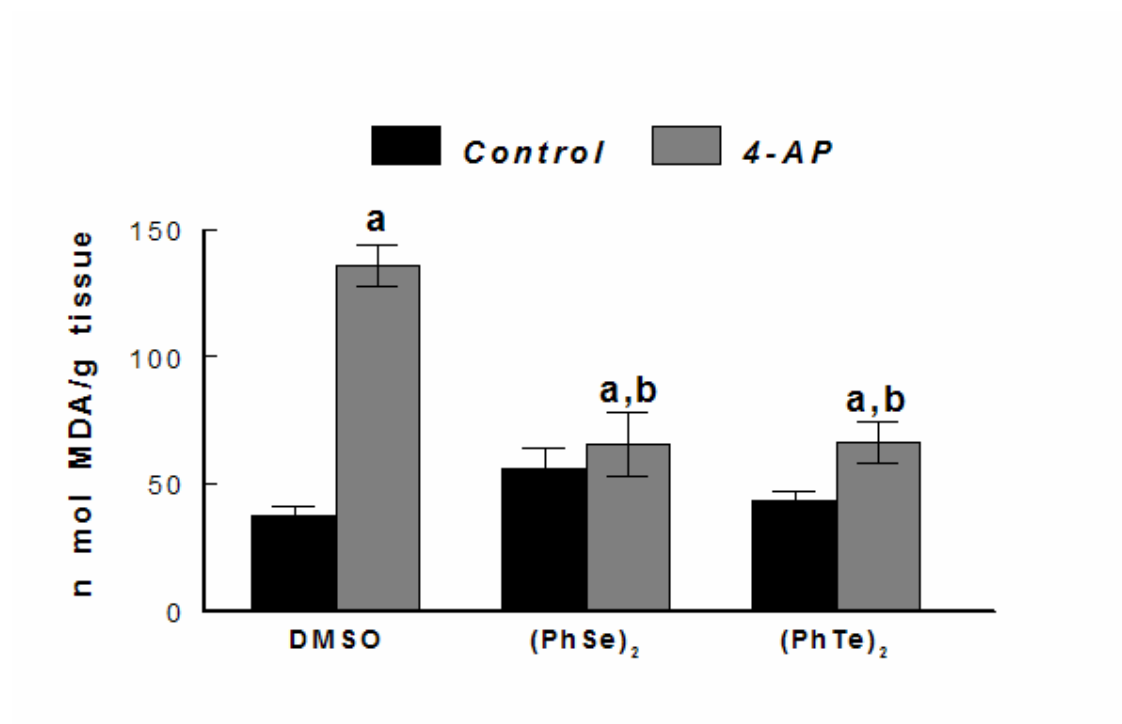
(a) Significantly different from DMSO, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test.

(b) Significantly different from DMSO + 4-AP, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test.

(@) Significantly different from DMSO, $p < 0.05$ by Fisher exact test.

(#) Significantly different from DMSO + 4-AP, $p < 0.05$ by Fisher exact test.

Figure 1



5. DISCUSSÃO

A epilepsia é uma desordem neurológica crônica que atinge aproximadamente 1-2% da população mundial (LOTHMAN e cols., 2001). Como fator agravante, as drogas antiepilépticas são efetivas em somente 60-80% dos pacientes, demonstrando as limitações existentes na terapia com os agentes anticonvulsivos atuais (BAULAC, 2003). Conseqüentemente, nos casos não-responsivos ao tratamento medicamentoso, a epilepsia é responsável por um elevado número de intervenções médicas, causando significativa perda na qualidade de vida de milhares de pessoas.

A epilepsia pode manifestar-se por várias vias diferentes, entretanto, cada tipo de epilepsia possui como característica comum o aumento na excitabilidade neuronal, manifestando-se através da geração de convulsões (MCNAMARA, 1994, 1999). Neste sentido, as convulsões têm sido o grande objeto de estudo em cérebros normais, com vistas ao encontro de evidências acerca do mecanismo causador de episódios convulsivos espontâneos.

O estudo da convulsão em modelos animais tem representado uma grande fonte de estratégias no tratamento contra a epilepsia. Além disso, muitas das drogas anticonvulsivas descobertas através da pesquisa em modelos experimentais são comumente prescritas atualmente (PUTNAM & MERRITT, 1937). Logo, a indução de convulsões parciais ou generalizadas em modelos experimentais é um método eficiente para avaliar tanto a susceptibilidade às convulsões quanto investigar novos agentes anticonvulsivantes.

Neste contexto, consideramos importante a investigação dos efeitos dos organocalcogêneos $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$, e também do composto quelante ditiólico BAL, em modelos de convulsão química induzida por PTZ e 4-AP, os quais são agentes freqüentemente utilizados em modelos experimentais para a indução de convulsões (SCHAFER, 1973; WALLENSTEIN, 1983). Além disso, o PTZ é o químico convulsivante mais utilizado na pesquisa de drogas anti-epilépticas (PORTER e cols., 1984). De fato, devido aos seus conhecidos mecanismos de ação, a utilização de modelos de convulsão por PTZ e 4-AP facilita o estudo comparativo e mecanístico de novos agentes, muitos dos quais poderão revelar-se futuros agentes anticonvulsivantes.

Por outro lado, o interesse nos organocalcogêneos $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$ surgiu devido as suas aplicações sintéticas e propriedades biológicas interessantes, destacando-se, dentre outras, a sua atividade tiol peroxidase (ENGMAN e cols., 1992; KANDA e cols., 1999; COMMANDEUR e cols., 2001). Quanto ao composto tiólico BAL, efeitos adversos sobre o SNC, tais como encefalopatia e convulsões, têm sido demonstrados após a administração de doses elevadas deste (PEPPIN e cols., 1995; NOGUEIRA e cols., 2000); entretanto, sem um exato mecanismo.

Portanto, em nosso primeiro trabalho (Artigo 1), investigamos os efeitos da pré-administração de $(\text{PhSe})_2$ (150 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) e BAL (250, 500 ou 1000 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) no modelo de convulsão química induzida por PTZ em camundongos. Os resultados deste estudo demonstraram que a administração de $(\text{PhSe})_2$ anteriormente ao tratamento com PTZ, resultou em um aumento na neurotoxicidade. Este efeito foi demonstrado pela significativa diminuição na latência para as convulsões e morte induzidas por PTZ. Logo, a pré-administração do organocalcogêneo atuou em sinergismo com o PTZ na obtenção do efeito convulsivo e letal. Efeito similar ao do $(\text{PhSe})_2$ foi obtido quando os camundongos foram pré-tratados com BAL, verificando-se uma significativa redução na latência para as convulsões e morte, e portanto, aumento na neurotoxicidade.

Nossos resultados concordam com a literatura (WALLENSTEIN, 1983; DE LIMA & RAE, 1991) ao demonstrar o desenvolvimento de convulsões clônico-tônicas após a administração sistêmica de PTZ. Contudo, os efeitos sobre o SNC e o comportamento são dependentes da dose de PTZ utilizada. Dados da literatura demonstram que doses de PTZ abaixo de 40 mg/kg não produzem convulsões, enquanto doses acima de 50 mg/kg exercem efeitos convulsivos (EKONOMOU & ANGELATOU, 1999; ERAKOVIC e cols., 2001; ELOQAYLI e cols., 2003, 2004). As doses de PTZ de 40 e 50 mg/kg, geralmente produzem efeitos sensibilizatórios para a convulsão. Este efeito também foi visualizado em nossos resultados, os quais demonstraram que poucos animais convulsionaram quando injetados com 40 e 50 mg/kg de PTZ. Além disso, as doses de 40 e 50 mg/kg, devido a toxicidade moderada com pequena incidência de convulsões, permitiram a melhor caracterização dos efeitos do $(\text{PhSe})_2$ e BAL.

A administração de PTZ, através do bloqueio seletivo do canal de Cl^- no complexo do receptor GABA_A , conduz a um decréscimo na função GABA_A érgica (CORDA e cols., 1992; PANAGOPOULOS e cols., 1998; KALUEFF e cols., 2005;

SAYYAH e cols, 2005). Entretanto, este bloqueio tem amplas consequências, ocorrendo além de uma diminuição na neurotransmissão GABAérgica, a modificação da densidade e sensibilidade de diferentes subtipos de receptores de glutamato (SCHROEDER e cols., 1993, 1994, 1998). De fato, estudos têm demonstrado que a administração sistêmica de PTZ exerce efeitos sobre os sistemas purinérgico (OSES e cols., 2004; TCHEKALAROVA e cols., 2005), catecolaminérgico (KAMINSKI e cols., 2005) e histaminérgico (NISHIDA e cols., 2007; ZHU e cols., 2007), além dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico (SCHROEDER e cols., 1993, 1994, 1998; JENSEN e cols., 1997; EKONOMOU & ANGELATOU, 1999). Particularmente, pesquisas recentes também demonstraram que a administração sistêmica de um agonista seletivo de receptor opióide protegeu contra as convulsões induzidas por PTZ (KAMINSKI e cols., 2007).

Neste contexto, em nosso modelo de convulsão induzida por PTZ, várias vias de neurotransmissão podem ter contribuído para os efeitos pró-convulsivos dos compostos (PhSe)₂ e BAL. Entretanto, tendo em vista a significativa diminuição na latência para a convulsão e o conseqüente sinergismo com o PTZ na obtenção do efeito excitatório, é provável que estes compostos tenham interagido principalmente com o sistema GABAérgico causando efeitos modulatórios. Particularmente, uma interação direta com o estado redox dos receptores GABAérgicos é possível. De fato, a atividade dos receptores GABA_A pode ser aumentada ou diminuída por agentes redutores, tais como o DTT, ou oxidantes, como o DTNB, respectivamente (AMATO e cols., 1999). Esta hipótese é válida para o composto (PhSe)₂, o qual pode ter causado uma oxidação do sítio redox do receptor GABA_A com conseqüente diminuição na sua atividade.

Com relação ao BAL, seus efeitos pró-convulsivos podem estar relacionados com o aumento dos grupos sulfidrílicos (-SH) não-protéicos no cérebro (MADONIA & PALAZZOADRIANO, 1965; NOGUEIRA e cols., 2000). Além disso, o BAL é um composto sulfidrílico que possui alta afinidade por zinco (EMANUELLI e cols., 1998), o qual é um antagonista não competitivo do receptor NMDA (WESTBROOK & MAYER, 1987). Desta forma, ao quelar zinco, o BAL pode deixar o receptor mais ativado. Portanto, o sinergismo entre BAL e PTZ pode envolver ambos os sistemas GABAérgico e glutamatérgico. Através de uma ativação do receptor NMDA, o BAL pode estar atuando sinergicamente com o PTZ (através do bloqueio do canal de Cl⁻ do receptor GABA_A) na produção de respostas excitatórias. Entretanto, uma ação

direta do BAL sobre o receptor GABA_A é provável. O BAL é um composto ditiólico que em meio aquoso é oxidado rapidamente à forma dissulfeto (EMANUELLI e cols., 1996), formando uma molécula com grande potencial oxidante, e podendo então reagir com sítios redox do receptor GABA_A, diminuindo sua atividade.

É importante salientar que, assim como o BAL, para o qual foram descritos efeitos adversos sobre o SNC (PEPPIN e cols., 1995; NOGUEIRA e cols., 2000), compostos orgânicos de selênio também têm demonstrado efeitos neurotóxicos em roedores. Esta toxicidade depende, além da forma química e quantidade do elemento administrado, de uma variedade de outros fatores incluindo, espécie, idade e rota de administração (NOGUEIRA e cols., 2003a, NOGUEIRA e cols., 2004).

O (PhSe)₂ é um dos compostos orgânicos de selênio que, apesar das propriedades biológicas importantes, causa efeitos tóxicos a roedores quando administrado em altas doses e cronicamente (NOGUEIRA e cols, 2003a). Particularmente, quando administrado pela via subcutânea, e em doses abaixo de 500 µmol/kg, não produz efeitos convulsivos ou morte em camundongos (NOGUEIRA e cols, 2003a). Por outro lado, através da via intraperitoneal, convulsões e morte são observadas quando administrado em doses acima de 150 µmol/kg (NOGUEIRA e cols, 2003a). Logo, nossos resultados estão de acordo com estes dados, e demonstram ausência de efeito convulsivante e letal *per se* quando os camundongos foram administrados com 150 µmol/kg, i.p., de (PhSe)₂.

Particularmente, NOGUEIRA e colaboradores (2000, 2003a) demonstraram que as convulsões induzidas em camundongos por (PhSe)₂ e BAL podem ser inibidas pelo pré-tratamento dos animais com diazepam e fenobarbital, dois moduladores alostéricos clássicos do sistema GABérgico. Estes trabalhos corroboram nossos dados, e complementando-se, ambos apontam para uma modulação no sistema GABérgico como parte do mecanismo convulsivante dos compostos (PhSe)₂ e BAL. Esta parcialidade é necessária, tendo em vista que o decréscimo na latência para as convulsões através do pré-tratamento com (PhSe)₂ e BAL, pode ter iniciado-se pela interação com os receptores GABA_A, entretanto adicionais sistemas de neurotransmissores podem estar envolvidos. Neste contexto, é amplamente aceito o papel dos aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, na inicialização e propagação do processo convulsivo.

Particularmente, tem-se dado muita atenção aos receptores de glutamato do tipo NMDA, os quais possuem um importante papel na patofisiologia da epilepsia e

de muitas outras desordens neurológicas (CULL-CANDY e cols., 2001). Além disso, a expressão de uma variedade de tipos de convulsão depende da ativação de receptores NMDA (RICE & DELORENZO, 1998), tendo em vista que a utilização de antagonistas deste receptor suprime as convulsões numa variedade de modelos, dentre os quais por PTZ (O'Neill & Bolger, 1989).

Um envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos neurotóxicos induzidos por (PhSe)₂ e BAL também pode ser considerado. Embora estes compostos possam ter agido, em um primeiro momento, através de uma diminuição na neurotransmissão GABAérgica, este processo pode trazer como consequência um aumento na sensibilidade e atividade de diferentes receptores de glutamato (SCHROEDER e cols., 1993, 1994, 1998). Contribuem para esta hipótese estudos prévios os quais demonstraram um envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos neurotóxicos do (PhSe)₂ e BAL. Especialmente, NOGUEIRA e colaboradores (2000) demonstraram que o pré-tratamento de camundongos com 0.5 mg/kg do antagonista NMDA - MK801 aumentou a latência para o início das convulsões e diminuiu a mortalidade induzida por BAL, apontando para o envolvimento dos receptores glutamatérgicos nas convulsões induzidas por este quelante.

Efeitos modulatórios do (PhSe)₂ sobre o sistema glutamatérgico foram também documentados após experimentos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (NOGUEIRA e cols., 2001), demonstrando que este organocalcogênio inibe a união específica de [H³]glutamato e [H³]MK801 em membranas sinápticas de cérebro de ratos. Além disso, estudos recentes demonstraram que a antinocicepção produzida pelo (PhSe)₂ em diversos modelos de dor, ocorre através da interação com vias glutamatérgicas, principalmente com sítios redox modulatórios de receptores NMDA (SAVEGNAGO e cols., 2007a,b).

Portanto, nosso primeiro estudo demonstra os efeitos neurotóxicos dos compostos (PhSe)₂ e BAL. Através da diminuição na latência para os episódios convulsivos gerados pelo bloqueador GABAérgico PTZ, estes compostos admitem um mecanismo sinérgico com o PTZ no desenvolvimento da convulsão. É possível que o aumento dos níveis de (PhSe)₂ no SNC, possa estar interferindo com sítios redox de receptores GABA_A, diminuindo sua atividade. Por outro lado, considerando que a ativação de receptores NMDA está freqüentemente envolvida na geração de muitos processos convulsivos, é possível que uma alteração do equilíbrio tiol-

dissulfeto deste receptor esteja envolvida na potencialização por BAL das convulsões induzidas por PTZ.

Notavelmente, evidências têm demonstrado que as EROs e o estresse oxidativo podem contribuir para o desenvolvimento de processos convulsivos, tendo sido relacionadas com a neurodegeneração associada à epilepsia (SINGH e cols., 1990). Além disso, a prevenção do estresse oxidativo durante o processo convulsivo pode tornar-se um alvo terapêutico adicional na luta contra a epilepsia, apontando para os possíveis benefícios da prescrição de antioxidantes a pacientes epiléticos.

Neste sentido, nosso segundo trabalho (Artigo 2) demonstrou importantes propriedades antioxidantes e, portanto neuroprotetoras dos compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ contra as convulsões induzidas por 4-AP em camundongos. Neste trabalho, foram utilizadas as doses de 50, 100 e 150 µmol/kg dos compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂, administrados subcutaneamente. Similarmente ao observado com o PTZ, a administração de 4-AP (12 mg/kg) causou o desenvolvimento de convulsões, concordando com a literatura (SCHAFFER, 1973; SPYKER e cols., 1980; YAMAGUCHI & ROGAWSKI, 1992; WONG e cols., 2002) e servindo como modelo eficiente para o estudo de episódios convulsivos. Os resultados deste segundo trabalho demonstraram que a administração dos compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂, previamente à administração de 4-AP, aumentou significativamente a latência para as convulsões (clônicas e tônicas) e impediu a morte induzida por 4-AP. Desta forma, atuaram como compostos anticonvulsivantes e, portanto, neuroprotetores. Além de impedirem a morte causada por 4-AP, a pré-administração dos organocalcogêneos aumentou a latência para a convulsão clônica de uma maneira dependente da dose do composto.

Particularmente, bloqueando canais de K⁺ e estimulando canais de Ca²⁺, a 4-AP causa um aumento no influxo de Ca²⁺ com conseqüente aumento na liberação de neurotransmissores, preferencialmente o glutamato (MORALES-VILLAGRÁN & TAPIA, 1996) e, portanto, um aumento no impulso nervoso (MOLGÓ e cols., 1985). Além disso, evidências têm demonstrado que um aumento na concentração extracelular de glutamato, está envolvido nos mecanismos excitotóxicos das convulsões (FRAGOSO-VELOZ & TAPIA, 1992; MORALES-VILLAGRÁN e cols., 1996). Neste contexto, é possível que a ação anticonvulsiva dos compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ tenha ocorrido através de uma alteração na permeabilidade de canais de Ca²⁺ nos terminais pré-sinápticos. Desta forma, estes organocalcogêneos podem

estar inibindo ou alterando um influxo excessivo de cálcio, impedindo a liberação anormal de glutamato e, conseqüentemente as convulsões. Corrobora esta hipótese um estudo prévio de MORETTO e colaboradores (2003), o qual demonstrou que, sob condições despolarizantes através do uso de 4-AP, compostos organocalcogêneos, dentre os quais o $(\text{PhSe})_2$ e o $(\text{PhTe})_2$, inibem o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em sinaptossomas de cérebro de ratos.

É importante salientar, entretanto, que algumas diferenças foram visualizadas com relação aos efeitos isolados dos compostos $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$. Neste sentido, o $(\text{PhSe})_2$ impediu completamente o aparecimento de convulsões tônicas (Tabela 1), efeito que não foi observado com a pré-administração de $(\text{PhTe})_2$ (Tabela 2). Por outro lado, este composto causou um aumento maior na latência para a convulsão clônica que o $(\text{PhSe})_2$ numa dose equivalente. Estes resultados demonstram que a neuroproteção oferecida pelo $(\text{PhTe})_2$ tem o início e também declínio em doses mais baixas que o $(\text{PhSe})_2$. Neste contexto, trabalhos têm demonstrado que os compostos orgânicos de telúrio são mais tóxicos que seus análogos de selênio (NOGUEIRA e cols., 2001; MEOTTI e cols., 2003), e geralmente, doses menores de $(\text{PhTe})_2$, comparadas às de $(\text{PhSe})_2$, produzem efeitos tóxicos, assim como efeitos antioxidantes (ROSSATO e cols. 2002a; MEOTTI e cols., 2003; BORGES e cols., 2005). De fato, os compostos orgânicos de telúrio tendem a ser mais reativos que seus correspondentes análogos estruturais de selênio. Esta diferença comportamental pode ser explicada pelo fato de que a clivagem heterolítica da ligação enxofre-telúrio em direção aos rearranjos nucleofílicos é mais fácil do que a clivagem da ligação enxofre-selênio. Esta característica deve-se a um maior volume atômico do átomo de telúrio associado com uma maior eletronegatividade em relação ao carbono (COMASSETO e cols., 1997; MORO e cols., 2005). Portanto, estas características tornam o $(\text{PhTe})_2$ mais reativo que o $(\text{PhSe})_2$, tornando possíveis os efeitos positivos e negativos em doses mais baixas do que as de seu análogo estrutural.

Este trabalho demonstrou ainda um aumento da peroxidação lipídica no cérebro dos camundongos tratados com 4-AP, sendo que estes valores foram significativamente inibidos quando os animais foram pré-tratados com os compostos $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$. Estes dados concordam com a literatura (ARMSTEAD e cols., 1989; KANEKO e cols., 2002) e apontam para o importante envolvimento do

estresse oxidativo no dano ao tecido cerebral seguindo o desenvolvimento de processos convulsivos.

De importância particular, nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento dos animais com os compostos orgânicos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ inibiu significativamente o aumento na peroxidação lipídica cerebral, demonstrando em primeira mão, efeitos antioxidantes e neuroprotetores destes organocalcogêneos no modelo de convulsão induzida por 4-AP. Este efeito é justificado por suas propriedades antioxidantes, que os torna atrativos como compostos neutralizadores de agentes oxidantes reativos. Além disso, estes resultados concordam com estudos prévios de nosso grupo demonstrando que os compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ são antioxidantes efetivos contra a produção de TBARS em tecido cerebral induzido por uma variedade de oxidantes (ROSSATO e cols., 2002a; MEOTTI e cols., 2004; BURGER e cols., 2004, 2006). Neste contexto, os compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂, dentre outros compostos orgânicos de selênio e telúrio, têm apresentado a importante propriedade de decompor peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou uma variedade de hidroperóxidos lipídicos formando água ou seus alcoóis equivalentes, utilizando GSH ou outros tióis sintéticos reduzidos como doadores de elétrons (ENGMAN e cols., 1992; KANDA e cols., 1999; KLOTZ e cols., 2003), como demonstrado pela reação: **H₂O₂/ROOH + 2 GSH → ROH + GSSG + H₂O**.

Relembrando que a ativação de receptores NMDA, ocupa um papel de destaque no desenvolvimento de processos excitotóxicos (SAID e cols., 2000), e que está freqüentemente envolvida na geração de muitos processos convulsivos, este receptor também pode ter sido um alvo para a ação dos compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂. Considerando-se que os receptores NMDA podem sofrer modulação redox (AIZENMAN e cols., 1990; REYNOLDS e cols., 1990), é possível que além da alteração na permeabilidade de canais de Ca²⁺, os organocalcogêneos tenham exercido seus efeitos anticonvulsivos e antioxidantes por meio de uma interação direta com os receptores NMDA. De fato, a modulação deste subtipo de receptor poderia estar ocorrendo através da alteração de seu estado redox. Desta forma, diminuindo a atividade do receptor NMDA, eles podem ter levado a uma diminuição na neurotransmissão glutamatérgica, tornando-se possíveis mediadores da excitotoxicidade devido às convulsões no SNC. Portanto, estes resultados são bastante relevantes, tendo em vista uma prevenção do estresse oxidativo durante o processo convulsivo como alvo terapêutico adicional na luta contra a epilepsia.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- Os compostos (PhSe)₂ (150 µmol/kg, i.p.) e BAL atuam em sinergismo com o PTZ na geração de convulsões. Considerando o mecanismo predominante de ação do PTZ, estes efeitos parecem ocorrer através de uma modulação do sistema GABAérgico. Entretanto, uma participação do sistema glutamatérgico, via NMDA, nos efeitos neurotóxicos do BAL não pode ser descartada;
- Os compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂ (50, 100 e 150 µmol/kg, s.c.) aumentam a latência para a convulsão e inibem a morte induzida por 4-AP. Este efeito pode estar ligado a uma alteração na permeabilidade de canais de Ca²⁺ e/ou uma modulação de sítios redox de receptores NMDA;
- As convulsões induzidas por 4-AP estão relacionadas com um aumento na peroxidação lipídica cerebral em camundongos;
- Os compostos (PhSe)₂ e (PhTe)₂, na dose de 150 µmol/kg, inibem o aumento da peroxidação lipídica cerebral associado à administração de 4-AP, potencialmente através da neutralização de espécies reativas geradas neste modelo.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados nesta dissertação, faz-se ainda necessário investigar, nas mesmas doses utilizadas, e em camundongos:

1. No modelo de convulsão induzida por PTZ:

- Os efeitos dos compostos $(\text{PhSe})_2$ e BAL, *ex vivo*, sobre a liberação, união específica e captação dos neurotransmissores $[\text{H}^3]\text{GABA}$ e $[\text{H}^3]\text{glutamato}$;
- Considerando o efeito do BAL como quelante, investigar seu efeito sobre a formação do complexo BAL-magnésio, como um possível mecanismo de neurotoxicidade induzida pelo composto;
- O envolvimento da peroxidação lipídica nos processos convulsivos.

2. No modelo de convulsão induzida por 4-AP:

- Os efeitos dos compostos $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$, *ex vivo*, sobre o influxo de cálcio em sinaptossomas e em fatias de tecido cerebral;
- O envolvimento da peroxidação lipídica nos processos convulsivos por métodos adicionais, tais como, fluorescência;
- Os efeitos dos compostos $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{PhTe})_2$, *ex vivo*, sobre a liberação, união específica e captação de $[\text{H}^3]\text{glutamato}$.

8. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E MESTRADO

- Verônica B. Brito, Vanderlei Folmer, Júlio C.M. Soares, Ilson D. Silveira, João B.T. Rocha. Long-term sucrose and glucose consumption decrease the delta-aminolevulinate dehydratase activity in mice. **Nutrition**, xx (2007): xxx-xxx.
- Verônica B. Brito, Vanderlei Folmer, João B.T. Rocha. Inhibition of δ -Aminolevulinate Dehydratase and Sulfhydryl Groups Depletion in Alloxan-Induced Diabetes. **Chemico-Biological Interactions**, Submetido (em revisão), 2007.
- Verônica B. Brito, Vanderlei Folmer, João B.T. Rocha. Kinetics of Alloxan-Induced Inhibition of Delta-Aminolevulinate Dehydratase in vitro. **Toxicology In Vitro**, Submetido, 2007.
- Caroline Wagner, Roselei Fachinetto, Cristiane L.D. Corte, Verônica B. Brito, Diego Severo, Gilvan O.C.D. Oliveira, Ademir F. Morel, Cristina W. Nogueira, João B.T. Rocha. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. **Brain Research**, 2006; 1107: 192-198.
- Roselei Fachinetto, Marilise E. Burger, Caroline Wagner, Daniele C. Wondracek, Verônica B. Brito, Cristina W. Nogueira, Juliano Ferreira, João B.T. Rocha. High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2005; 81: 585-592.
- Vanderlei Folmer, Francielli W. Santos, Lucielli Savegnago, Verônica B. Brito, Cristina W. Nogueira, João B.T. da Rocha. High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na⁺/K⁺-ATPase but not on Delta-aminolevulinate dehydratase in mice. **Toxicology Letters**, 2004; 153: 333-341.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASETH J. Recent advance in the therapy of metal poisonings with chelating agents. *Hum Toxicol* 1983; 2: 257-272.

AGNEW WF. Transplacental uptake of ¹²⁷ tellurium studied by whole-body autoradiography. *Teratology* 1972; 6: 331-338.

AIZENMAN E, LIPTON SA, LORING RH. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 1990; 2: 257-263.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing, New York & London 1994.

ALEXI T, HUGHES PE, FAULL RLM, WILLIAMS CE. 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration. *Neuro Report* 1998; 9: R57-R64.

AMATO A, CONNOLLY, MOSS SJ, SMART TG. Modulation of neuronal and recombinant GABA_A receptors by redox reagents. *J Physiol* 1999; 517: 35-50.

AMES BN, SHIGENAGA MK, HAGEN TM. Oxidants, antioxidants, and the neurodegenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-7922.

ANDERSEN O. Oral cadmium exposure in mice: Toxicokinetics and efficiency of chelating agents. *Toxicology* 1989; 20: 83-112.

APOSHIAN HV, MAIORINO RM, GONZALES-RAMIREZ D, ZUNIGA-CHARLES M, XU Z, HURBULT KM, JNCO-MUNOZ J, DART RC, APOSHIAN MM. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. *Toxicology* 1995; 97: 23-28.

ARMSTEAD WM, MIRRO R, LEFFLER CW, BUSIJA DW. Cerebral superoxide anion generation during seizures in new born pigs. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9: 175-179.

- AYALA G, TAPIA R. Late N-methyl-d-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 3067-3076.
- BAULAC M. Rational conversion from antiepileptic polytherapy to monotherapy. *Epileptic Disord* 2005; 5: 125–132.
- BEAL MF. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 1996; 6: 661-666.
- BEM-ARI Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985; 14: 375-403.
- BENNETT MR, BALCAR VJ. Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochem Int* 1999; 35: 269-280.
- BLISS TVP, COLLINGRIDGE GL. A synaptic model of memory long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31-39.
- BORGES VC, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats. *Toxicology* 2005; 215: 191–197.
- BOWERY NG. GABA_B receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 109-147.
- BRADFORD HF. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol* 1995; 47: 477-511.
- BRIVIBA K, TAMLER R, KLOTZ LO, ENGMAN L, COTGRAVE IA, SIES H. Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 817-823.
- BURGER M, FACHINETTO R, CALEGARI L, PAIXÃO MW, BRAGA AL, ROCHA JBT. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. *Brain Res Bull* 2004; 64: 339-345.
- BURGER ME, FACHINETTO R, WAGNER C, PEROTTONI J, PEREIRA RP, ZENI G, ROCHA JBT. Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. *Brain Res Bull* 2006; 70: 165-170.

- CADENAS E, SIES H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enz Regul* 1985; 23: 217-237.
- CENTURIÃO FB, CORTE CL, PAIXÃO MW, BRAGA AL, ZENI G, EMANUELLI T, ROCHA JBT. Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. *Brain Res* 2005; 1039: 146–152.
- CHAPPUIS P, POUPON J. Le rôle du sélénium dans la défense du stress oxidatif. *Cah Nutr Diet* 1991; 26: 295-297.
- CHEN C, TONEGAWA S. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Ann Rev Neurosci* 1997; 20: 157-184.
- CHISOLM JJr. Poisoning due to heavy metals. *Pediat Clin North Amer* 1970; 17: 591-615.
- CHOI DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 1985; 58: 293–297.
- CHOI DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987; 7: 369–379.
- CHOI DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; 1: 623–634.
- CHOI DW. Excitotoxicity and cell death. *J Neurobiol* 1992; 23: 1261-1276.
- CHOI DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 1995; 18: 58–60.
- CLEMENS JA, PENETTA JA. Free radicals in central nervous systems diseases. In: Blake D, Winyard PG (eds). *Immunopharmacology of free radical species*. Academic Press, San Diego 1995; 73-83.
- COMASSETO JV, LO WL, PETRAGNANI N, STEFANI HA. Vinylic selenides and tellurides – preparations, reactivity and synthetic applications. *Synthesis* 1997; 373.

- COMASSETO JV. Vinylic selenides. *J Organomet Chem* 1983; 253: 131-181.
- COMMANDEUR JN, ROOSEBOOM M, VERMEULEN NP. Chemistry and biological activity of novel selenium-containing compounds. *Adv Exp Med Biol* 2001; 500: 105-112.
- CONN PJ, PIN JP. Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 205-237.
- COOPER JR, BLOOM FE, ROTH RH (eds). Amino acid transmitters Em: The biochemical basis of neuropharmacology. Ed. Oxford University Press, New York 1996; 127-193.
- CORDA MG, ORLANDI M, LECCA D, GIORGI O. Decrease in GABAergic function induced by pentylentetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262: 792-800.
- COTMANN CW, KAHLE JS, MILLER SE, ULAS J, BRIDGES RJ. Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacol The Fourth Generation of Progress*, Floyd EB, David JK (eds). Raven Press, New York 1995.
- CULL-CANDY S, BRICKLEY S, FARRANT M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 327-335.
- D'GREGORIO REP, MILLER RK. Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. *Teratology* 1988; 37: 307-316.
- DALHAMN T, FRIBERG F. Dimercaprol (2,3 dimercaptopropanol) in chronic cadmium poisoning. *Acta Pharmacol* 1955; 11: 68.
- DAVIDSON M, ZEMISHLANY Z, MOHS RC, HORVATH TB, POWCHIK P, BLASS JP, DAVIS LK. 4-Aminopyridine in the treatment of Alzheimer's disease. *J Biol Psychiatry* 1988; 23: 485-490.
- DAVIS FA, STEFOSKI D, SCHAUF CL. Orally administered 4-aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1990; 27: 186-192.
- DAWSON VL, DAWSON TM. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death and Differentiation* 1996; 3:71-78.

- DE LIMA TC, RAE GA. Effects of cold-restraint and swim stress on convulsions induced by pentylenetetrazol and electroshock: influence of naloxone pretreatment. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40: 297–300.
- DICHTER MA, WILCOX KS. Excitatory synaptic transmission. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Engel JJr, Pedley TA (eds). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997.
- DINGLEDINE R, MCBAIN CJ, MCNAMARA JO. Excitatory amino acid receptors in epilepsy therapy. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 11: 49–53.
- DREW CA, JOHNSTON GAR, WEATHERBY RP. Bicuculline-insensitive GABA receptors studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci Lett* 1984; 52: 317–321.
- EDMONDS B, GIBB AJ, COLQUHOUN D. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 495-519.
- EKONOMOU A, ANGELATOU F. Upregulation of NMDA receptors in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazole-induced “kindling” model of epilepsy. *Neurochem Res* 1999; 24: 1515–1522.
- ELOQAYLI H, DAHL CB, GOTESTAM KG, UNSGARD G, HADIDI H, SONNEWALD U. Pentylenetetrazole decreases metabolic glutamate turnover in rat brain. *J Neurochem* 2003; 85: 1200–1207.
- ELOQAYLI H, DAHL CB, GÖTESTAM KG, UNSGARD G, SONNEWALD U. Changes of glial–neuronal interaction and metabolism after a subconvulsive dose of pentylenetetrazole. *Neurochem Int* 2004; 45: 739-745.
- EMANUELLI T, ROCHA JBT, PEREIRA ME, PORCIÚNCULA LO, MORSCH VM, MARTINS AF, SOUZA DO. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on aminolevulinatase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol Toxicol* 1996; 79: 138-143.
- EMANUELLI T, ROCHA JBT, PEREIRA ME, SOUZA DOG, BEBER FA. Aminolevulinatase dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state. *Pharmacol & Toxicol* 1998; 83: 95–103.

- ENGEL J. Experimental animal models of epilepsy: classification and relevance to human epileptic phenomena. *Epilepsy Res Suppl* 1992; 8: 9–20.
- ENGMAN L, PERSSON J, VESSMAN K, EKSTROM M, BERGLUND M, ANDERSSON CM. organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 441-452.
- ENGMAN L, STERN D, COTGREAVE IA, ANDERSSON C.M. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ^1H NMR method. *J Am Chem Soc* 1992; 114: 9737-9743.
- ENNA SJ, BOWERY NG (eds). *The GABA Receptors*. Clifton, NJ: Humana Press 1997.
- ERAKOVIC V, ZUPAN G, VARLJEN J, LAGINJA J, SIMONIC A. Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylenetetrazol kindling and pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 2001; 43: 165-173.
- ESTERBAUER H. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MV, Slater TF (eds). *Free Radicals in Liver Injury*, Arlington Press, Virginia 1985; 29-47.
- EULER GV, LIU Y. Glutamate and glycine decrease the affinity of [^3H] MK-801 binding in presence of Mg^{2+} . *Eur J Pharmacol* 1993; 245: 233-239.
- EYBL V, SYKORA J, KOUTENSKA M, KOUTENSKA J, MERTL F. Effect of spironolactone, thiomestronone and dimercaprol on the toxicity, retention and redistribution of mercury in the mouse. *Arzneim-Forsch* 1973; 23: 867.
- FAIRHILL LT. Tellurium. In: *Industrial Toxicology*. Hafner Publishing Co., New York 1969; 120.
- FLOHÉ L, GUNZLER WA, SCHOCK HH. Glutathione peroxidase: A selenium enzyme. *FEBS Lett* 1989; 32: 132-134.
- FRAGOSO-VELOZ J, TAPIA R. NMDA receptor antagonists protect against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol* 1992; 221: 275-280.

GABARD B. The excretion and distribution of inorganic mercury in rats as influenced by several chelating agents. *Arch Toxicol* 1976; 35: 15-24.

GHISLENI G, PORCIUNCULA LO, CIMAROSTIA H, ROCHA JBT, SALBEGO CG, SOUZA DO. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res* 2003; 986: 196–199.

GIANNI P, JAN KJ, DOUGLAS MJ, STUART PM, TARNOPOLSKY MA. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol* 2004; 39: 1391-1400.

GMELIN CHR. Versuche über die Wirkungem des Baryts, Strontians, u.s.w auf den thierischen organismus. Tübingen 1824; 43. (Citated by Challenger, Frederick: Biological methylation. *Chem Rev* 1945; 36: 315.

GOZLAN H, BEM-ARI Y. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? *TIPS* 1995; 16: 368-375.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, New York 1989.

HANSEN H. Versuch über die Wirkung des tellurs auf den lebeden organismus. *Liebigs Annale Chem Pharm* 1853; 86: 208. (Cited by *Toxicity of Industrial Metals* 1969).

HAUSER WA, HESDORFFER DC. *Epilepsy: Frequency, causes and consequences*. Demos, New York 1990.

HAYES KC, POTTER PJ, WOLFE DL, HSIEH JTC, DELANEY GA, BLIGHT AR. 4-Aminopyridine-sensitive neurologic deficits in patients with spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1994; 11: 433–446.

HEINEMANN U, JONES RSG. Neurophysiology. In: Dam M, Gram L (eds). *Comprehensive epileptology*, Raven Press, New York 1990; 17–42.

HOLTZ GG, RANE SG, DUNLAP K. GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1986; 319: 670-672.

- HUANG RQ, BELL-HORNER CL, DIBAS ML, COVEY DF, DREWE JA, DILLON GH. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 986–995.
- HUANG SH, DUKE RK, CHEBIB M, SASAKI K, WADA K, JOHNSTON GAR. Mixed antagonistic effects of bilobalide at ρ_1 GABA_C receptor. *Neuroscience* 2006; 137: 607-617.
- JACQUES-SILVA MC, NOGUEIRA CW, BROCH LC, FLORES EM, ROCHA JBT. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88: 119-125.
- JENSEN PJ, MILLAN N, MACK KJ. Cortical NMDAR-1 gene expression is rapidly upregulated after seizure. *Mol Brain Res* 1997; 44: 157–162.
- JENSEN M, SHI R. Effects of 4-aminopyridine on stretched mammalian spinal cord: the role of potassium channels in axonal conduction. *J Neurophysiol* 2003; 90: 2334-2340.
- JI LL, FU R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* 1992; 72: 549-554.
- JOSEPHY PD. *Molecular Toxicology*. Oxford University Press, New York 1997.
- KACZMAREK L, KOSSUT M, SKANGIEL-KRAMSKA J. Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. *Physiol Rev* 1997; 77: 217-255.
- KALUEFF AV, MINASYAN A, TUOHIMAA P. Anticonvulsant effects of 1,25-dihydroxyvitamin D in chemically induced seizures in mice. *Brain Res Bull* 2005; 67: 156-160.
- KAMINSKI RM, SHIPPENBERG TS, WITKIN JM, ROCHA BA. Genetic deletion of the norepinephrine transporter decreases vulnerability to seizures. *Neurosci Lett* 2005; 382: 51–55.
- KAMINSKI RM, WITKIN JM, SHIPPENBERG TS. Pharmacological and genetic manipulation of kappa opioid receptors: Effects on cocaine- and pentylentetrazol-induced convulsions and seizure kindling. *Neuropharmacology* 2007; 52: 895-903.

- KANDA T, ENGMAN L, COTGREAVE IA, POWIS G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. *J Org Chem* 1999; 64: 8161-8169.
- KANEKO K, ITOH K, BERLINER LJ, MIYASAKA K, FUJII H. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. *Magn Reson Med* 2002; 48: 1051–1056.
- KIYOZUMI M, SHIMADA H, HONDA T, KOJIMA S. Studies on poisonous metals. XIX. Comparative effects of chelating agents on distribution and excretion of inorganic mercury in rats. *Chem Pharm Bull* 1988; 36: 2599-2606.
- KLAASSEN CD. Heavy metals and heavy-metals antagonists. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds). Pergamon Press, New York 1990; 1592-1614.
- KLAASSEN CD. Heavy metals and heavy-metals antagonists. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Wonsiewicz MJ, McCurdy P (eds). McGraw-Hill, New York 1996; 1649-1671.
- KLAYMAN DL. In: Klayman DL, Günther WH (eds). *Organic selenium compounds: their chemistry and biology*. John Wiley and sons, New York 1973; 68-157.
- KLEINROK Z, TURSKI WA, CZUCZWAR SJ. Excitatory amino acid antagonists and the anticonvulsive activity of conventional antiepileptic drugs. *Pol J Pharmacol* 1995; 47: 247–252.
- KLOTZ LO, KRONCKE KD, BUCHCZYK DP, SIES H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr* 2003; 1333: 1448S–1451S.
- KOJIMA S, SHIMADA H, KIYOZUMI M. Comparative effects of chelating agents on distribution, excretion and renal toxicity of inorganic mercury in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989; 64: 471-484.
- KOWALTOWSKI A, CASTILHO RF, VERCESI AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* 2001; 495: 12-15.
- KVAMME E. Synthesis of glutamate and its regulation. *Progr Brain Res* 1998; 116: 73-85.

- LACASSE Y, RICHTER C. Toxicité du sélénium et de ses dérivés. Union Med Canada 1976; 1192-1199.
- LIPTON SA, ROSENBERG PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. New Eng J Med 1994; 330: 613-622.
- LONGCOPE WT, LUETSCHER JA, WINTROBE MM, JUGER V. The treatment of arsenical dermatitis with preparations of BAL. J Clin Invest 1946; 25: 528-533.
- LOTHMAN EW, BERTRAM III EH, STRINGER JL. Functional anatomy of hippocampal seizures. Prog Neurobiol 1991; 37: 1-82.
- LUNDH H, NILSSON O, ROSEN I. Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1979; 42: 171-175.
- MACDONALD RL, BARKER JL. Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: a common mode of convulsant action. Neurology 1978; 28: 325-330.
- MACDONALD RL. Inhibitory synaptic transmission. Em: Epilepsy: a comprehensive textbook. Engel J, Pedley TA (eds). Lippincott-Raven, Philadelphia 1997; 265-275.
- MACIEL EN, BOLZAN RC, BRAGA AL, ROCHA JBT. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. J Biochem Mol Toxicol 2000; 14: 310-319.
- MACIEL EN, FLORES EM, ROCHA JBT, FOLMER V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. Bull Environ Contam Toxicol 2003; 70: 470-476.
- MAILLY F, MARIN P, ISRAEL M, GLOWINSKI J, PRÉMONT J. Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H₂O₂ – induced neuronal apoptosis. J Neurochem 1999; 736: 1181-1188.
- MADONIA P, PALLAZZOADRIANO M. Eccitazione centrale da molecole a struttura tiolica. Bollettino della società italiana di biologia sperimentale. 1965; 6: 295-297.

- MARTIN DC, PLAGENHOEF M, ABRAHAM J, DENNISON RL, ARONSTAM RS. Volatile anesthetics and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 809-817.
- MCEVOY KM, WINDEBANK AJ, DAUBE NJR, LOW PA. 3-4-Diaminopyridine in the treatment of Lambert–Eaton myasthenic syndrome. *N Engl J Med* 1989; 321: 1567–1571.
- MCGEER PL, MCGEER EG. Amino acid neurotransmitters. In: Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P (eds). *Basic Neurochemistry*, Raven Press, New York 1989; 311-332.
- MCKEOWN MJ, MCNAMARA JO. When Do Epileptic Seizures Really Begin? *Neuron* 2001; 30: 1–9.
- MCNAMARA JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 1994; 6: 3413-3425.
- MCNAMARA JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 1999; 399: A15-22.
- MEDEIROS MHG, LOUREIRO AMP, CARVALHO VM. Lesões em DNA produzidas por produtos secundários da peroxidação lipídica. *Rev Med São Paulo* 1996; 75: 16-25.
- MEHTA AK, TICKU MK. An update on GABA_A receptors. *Brain Res Rev* 1999; 29: 196-217.
- MELDRUM B. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* 1991, 10: 55–61.
- MELDRUM B. Epilepsy - Taking up GABA again. *Nature* 1995; 376: 122-123.
- MELDRUM BS, AKBAR MT, CHAPMAN AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res* 1999; 36: 189-204.
- MELDRUM BS, GARTHWAITE J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 379-387.

- MEOTTI FC, BORGES VC, ZENI G, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* 2003; 143: 9–16.
- MEOTTI FC, STANGHERLIN EC, ZENI G, NOGUEIRA CW, ROCHA JBT. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 2004; 94: 276–282.
- MIEYAL JJ, SRINIVASAN V, STARKE DW. Glutathionyl specificity of thioltransferases: mechanistic and physiological implications. In: *Biothiols in Health and Disease*. Parker L, Cadenas E, Marcel D (eds), New York, 1995; 305–372.
- MIN L. *NMDA Receptor Protocols*. Humana Press, Totowa 1999.
- MODY I, MACDONALD JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 356-359.
- MOLGÓ J, LEMEIGNAN M, PERADEJORDI F, LECHAT P. Effects presynaptiques des aminopyridines a la jonction neuromusculaire de vertébrés. *J Pharmacol* 1985; 16: 109–144.
- MONAGHAN DT, COTMAN CW. The distribution of [^3H] kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res* 1982; 52: 91-100.
- MORALES-VILLAGRÁN A, TAPIA R. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem Int* 1996; 28: 35–40.
- MORALES-VILLAGRÁN A, UREÑA-GUERRERO M, TAPIA R. Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol* 1996; 305: 87–93.
- MORO AV, NOGUEIRA CW, BARBOSA NBV, MENEZES PH, ROCHA JBT, ZENI G. Highly stereoselective one pot procedure to prepare bis- and tris-chalcogenide alkenes via addition of disulfide and diselenides to terminal alkynes. *J Org Chem* 2005; 70: 5257–5268.
- MORTENSEN ME, WALSON PD. Chelation therapy for childhood lead poisoning. *Clin Pediatr (Phila)* 1993; 32: 284–291.

- MUCKTER H, LIEBL B, REICHL FX, HUNDER G, WALTHER U, FICHTL B. Are we ready to replace dimercaprol (BAL) as an arsenic antidote? *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 460-465.
- MÜLLER R, ZSCHIESCHE W, STEFFEN HM, SCHALLER KH. Tellurium intoxication. *Kiln Wocherschr* 1989; 67: 1152-1155.
- MURATRA Y, WOODWARD RM, MILEDI R, OVERMAN LE. The first selective antagonist for a GABA_C receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 1996; 6: 2071–2076.
- NA L, BIN L, DEAN ED, YI J. Protective effects of ginsenoside Rg₂ against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 458-463.
- NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ-MARTINEZ MC. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Tot Environ* 2000; 249: 347-371.
- NEVE J, HENRY M, PERETZ A, MARESCHI JP. L'importance nutritionnelle du sélénium. *Cah Nutr Diet* 1987; 22: 145-162.
- NICOLETTI F, BRUNO V, COPANI A, CASABONA G, KNOPFEL F. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* 1996; 19: 267-272.
- NISHIDA N, HUANG ZL, MIKUNI N, MIURA Y, URADE Y, HASHIMOTO N. Deep brain stimulation of the posterior hypothalamus activates the histaminergic system to exert antiepileptic effect in rat pentylenetetrazol model. *Experim Neurol* 2007; 205: 132–144.
- NOGUEIRA CW, MEOTTI FC, CURTE E, PILISSÃO C, ZENI G, ROCHA JBT. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 2003a; 183: 29–37.
- NOGUEIRA CW, QUINHONES EB, JUNG EAC, ZENI G, ROCHA JBT. Evidence for anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 2003b; 52: 56–63.

- NOGUEIRA CW, ROTTA LN, PERRY ML, SOUZA DO, ROCHA JBT. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res* 2001; 906: 157–163.
- NOGUEIRA CW, SOARES FA, BOLZAN RC, JACQUES-SILVA MC, SOUZA DO, ROCHA JBT. Investigations into the mechanism of 2,3-dimercaptopropanol neurotoxicity. *Neurochem Res* 2000; 25: 1553-1558.
- NOGUEIRA CW, ZENI G, ROCHA JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104: 255–285.
- OBRENOVITCH TP. High extracellular glutamate and neuronal death in neurological disorders. Cause, contribution or consequence? *Ann NY Acad Sci* 1999; 890: 273-299.
- OBRENOVITCH TP, URENJAK J, ZILKHA E, JAY TM. Excitotoxicity in neurological disorders-the glutamate paradox. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18: 281-287.
- OLNEY JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. Em: Kainic acid as a tool in neurobiology. McGee EG, Olney JW, McGee PL (eds). Raven Press, New York 1978; 95-121.
- OLNEY JW. Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1981; 27: 375-384.
- OLNEY JW, HO OL. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 1970; 227: 609-611.
- OLSEN RW, DELOREY TM. GABA and glycine Em: Basic Neurochemistry. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (eds). Lippincott-Raven, New York 1999; 335-346.
- O'NEILL SK, BOLGER GT. Anticonvulsant activity of MK-801 and nimodipine alone and in combination against pentylentetrazol and strychnine. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 32: 595–600.
- OSSES JP, LEKE R, PORTELA LV, LARA DR, SCHMIDT AP, CASALI EA, WOFCHUK S, SOUZA DO, SARKIS JF. Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylentetrazol. *Brain Res Bull* 2004; 64: 237–242.

- OZAWA S, KAMIYA H, TSUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998; 54: 581-618.
- PALFREYMAN MG, REYNOLDS IJ. Direct and Allosteric Control of Glutamate Receptors. *Handbooks in Pharmacology and Toxicology*, vol 12, 1994.
- PANAGOPOULOS NT, KAZANIS E, SOTIRIOU E, PAPANASTASIOU P, MATSOKIS NA. Effect of the pentylenetetrazole (PTZ) induced seizures on the gabaergic system in the mouse brain. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 48.
- PARNHAM MJ, GRAF E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog Drug Res* 1991; 36: 10-47.
- PAUL SM. GABA and glycine Em: Psychopharmacology: The fourth generation of progress. Bloom FE, Kupfer DJ (eds). Raven Press, New York, 1995; 87-94.
- PAULMIER C. Selenium Reagents and Intermediates in: *Organic Synthesis*, Pergamon, Oxford 1986.
- PAZ MJD. Espécies acetilênicas vinílicas e alquílicas contendo telúrio. Tese de doutoramento, Universidade de São Paulo, USP 1989.
- PEÑA F, TAPIA R. Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem* 1999; 72: 2006–2014.
- PEPPIN J, MILORD F, KHONDE NA, NIYONSENGA T, LOKO L, MPIA B, DEWALS P. Risk-factors for encephalopathy and mortality during melarsoprol treatment of Trypanosoma-Brucei-Gambiense sleeping sickness. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 89: 92-97.
- PETERS RA, STOKEN LA. British anti-Lewisite (BAL). *Nature* 1945; 24: 616-619.
- PETRAGNANI N, RODRIGUES R, COMASSETO JV. *Organomet Chem* 1976; 114-281.
- PETRAGNANI N. In: *Comprehensive Organometallic Chemistry II*. Mckillop A (ed). Pergamon Press, Exeter, UK 1995.

- PIGGOTT MA, PERRY EK, SAHGAL A, PERRY RH. Examination of parameters influencing [³H] MK-801 binding in post-mortem human cortex. *J Neurochem* 1992; 58: 1001-1008.
- PIN JP, DUVOISIN R. The metabotropic glutamate receptors: structure and function. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1-26.
- PORCIÚNCULA LO, ROCHA JBT, BOECK CR, VENDITE D, SOUZA DO. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 2001; 299: 217-220.
- PORRU S, ALESSIO L. The use of chelating agents in occupational lead poisoning. *Occup Med* 1996; 46: 41-48.
- PORTER RJ, CEREGHINO JJ, GLADDING GD, HESSIE BJ, KUPFERBERG HJ, SCOVILLE B, WHITE BG. Antiepileptic drug development program. *Cleveland Clin Q* 1984; 51: 293-305.
- PÓVOA LG, FILHO HP. Radicais Livres (generalidades). In: Filho HP. *Radicais Livres em Patologia Humana*. Imago Ed., Rio de Janeiro 1995; 163-181.
- PRICE DL. New order from neurological disorders. *Nature* 1999; 399: A3-A5.
- PRITCHETT DB, SONTHEIMER H, SHIVERS BD, YMER S, KETTENMANN H, SCHOFIELD PR, SEEBURG PH. Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 1989; 338: 582-585.
- PUTNAM TJ, MERRITT HH. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. *Science* 1937; 85: 525-526.
- QIAN H, PAN Y, ZHU Y, KHALILI P. Picrotoxin accelerates relaxation of GABA_C receptors. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 470-479.
- QIAN H, RIPPS H. The GABA_C receptors of retinal neurons. *Prog Brain Res* 2001; 131: 295-308.
- RAGOZZINO D, WOODWARD RM, MURATA F, EUSEBI F, OVERMAN LE, MILEDI R. Design and in vitro pharmacology of a selective γ -aminobutyric acid_C receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 1024-1030.

- RAMANJANEYULU R, TICKU MK. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Eur J Pharmacol* 1984; 98: 337–345.
- RAYMAN MP. The importance of selenium to human health. *The Lancet* 2000; 356: 233–241.
- REHAVI M, SKOLNICK P, PAUL SM. Effects of tetrazole derivatives on [³H]diazepam binding in vitro: correlation with convulsant potency. *Eur J Pharmacol* 1982; 78: 353–356.
- REYNOLDS IJ, RUSH EA, AIZENMAN E. Reduction of NMDA receptors with dithiotreitol increases [³H] MK-801 binding and NMDA-induced Ca²⁺ fluxes. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 178-182.
- RICE AC, DELORENZO RJ. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Res* 1998; 782: 240–247.
- ROBINSON MD, DOWD LA. Heterogeneity and functional subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv Pharmacol* 1997; 37: 69-115.
- ROCHA L, BRIONES M, ACKERMAN RF, ANTON B, MAIDMENT NT, EVANS CJ, ENGEL JJr. Pentylenetetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. *Epilepsy Res* 1996; 26: 105–113.
- ROGAWSKI MA, BARKER JL. Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain Res* 1983; 280: 180–185.
- ROSA RM, FLORES DG, APPELT HR, BRAGA AL, HENRIQUES JA, ROESLER R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett* 2003; 341: 217–220.
- ROSSATO JI, KETZER LA, CENTURIÃO FB, SILVA SJN, LÜDTKE DS, ZENI G, BRAGA AL, RUBIN MA, ROCHA JBT. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 2002a; 3: 297–303.
- ROSSATO JI, ZENI G, MELLO CF, RUBIN ME, ROCHA JBT. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does

not prevent the behavioural alterations produced by intra-striatal quinolinic-acid administration in the rat. *Neurosci Lett* 2002b; 318: 137–140.

ROTRUCK JT, POPE AL, GANTHER HE, SWANSON AB, HAFEMAN DG, HOEKSTRA WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1981; 179: 588-590.

SAID SJ, PAKBAZ H, BERISHA HI, RAZA S. NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 1300–1302.

SAVEGNAGO L, PINTO LG, JESSE CR, ALVES D, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW, ZENI G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 2007a; 555: 129–138.

SAVEGNAGO L, PINTO LG, JESSE CR, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW, ZENI G. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide. *Brain Res* 2007b; 1162: 32-37.

SAYYAH M, MOAIED S, KAMALINEJAD M. Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed. *J Ethnopharmacol* 2005; 98: 209-211.

SCANSETTI G. Exposure to metals that have recently come into use. *Sci Tot Environ* 1992; 120: 85-91.

SCATTON B. The NMDA receptor complex. *Fundam Clin Pharmacol* 1993; 7: 389-400.

SCHAFER EWJR, BRUNTON RB, CUNNINGHAM DJ. A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 26: 532-538.

SCHOEPP D, CONN PJ. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharm Sci* 1993; 14: 13-25.

SCHROEDER H, BECKER A, GRECKSCH G, SCHROEDER U, HOELLT V. The effect of pentylenetetrazol kindling on synaptic mechanisms of interacting glutamatergic and opioid system in the hippocampus of rats. *Brain Res* 1998; 811: 40–46.

- SCHRÖDER H, BECKER A, LÖSSNER B. Glutamate binding to brain membranes is increased in pentylenetetrazol-kindled rats. *J Neurochem* 1993; 60: 1007–1011.
- SCHROEDER H, SCHLICHTHAAR R, KRUG M. Specific [3H]L-glutamate binding and [3H]D-aspartate release in the hippocampus of rat after pentylenetetrazol kindling and long-term potentiation. *Neuroscience* 1994; 60: 337–342.
- SCHULZ JB, LINDENAU J, SEYFRIED J, DICHGANS J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Europ J Biochem* 2000; 267: 4904-4911.
- SCHWARTZ K, FOLTZ CM. Selenium as a integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 200-214.
- SELLIN LC. The action of botulinum toxin at the neuromuscular junction. *Med Biol* 1981; 59: 11–20.
- SHORVON SD. Epidemiologia, classificação, história natural e genética da epilepsia. In: Costa JC (ed). *Epilepsy: A Lancet review*, The Lancet, London 1990, 3-13.
- SIES H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Rad Biol Med* 1993; 14: 313-323.
- SINGER AJ, MOFENSON HC, CARACCIO TR, ILASI J. Mercury chloride poisoning due to ingestion of a stool fixative. *J Toxicol Clin Toxicol* 1994; 32: 577-582.
- SINGH R, PATHAK DN. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in FeCl₃-induced epileptogenic foci in the rat brain. *Epilepsia* 1990; 31: 15–26.
- SNODGRASS W, SULLIVAN JBJR, RUMACK BH, HASHIMOTO C. Mercury poisoning from home gold ore processing, use of penicillamine and dimercaprol. *J Am Med Assoc* 1981; 246: 1929-1931.
- SPYKER DA, LYNCH C, SHABANOWITZ J, SINN JA. Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin Toxicol* 1980; 16: 487–497.

SQUIRES RF, SAEDERUP E, CRAWLEY JN, SKOLNICK P, PAUL SM. Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with action on GABA / benzodiazepine / picrotoxin receptor complex in brain. *Life Sci* 1984; 35: 1439–1444.

SREDNI B, CASPI RR, KALECHMAN Y, DANZIGER Y, BENYA'AKOV TAMARI T, SHALIT F, ALBECK M. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. *Nature* 1987; 330: 173-176.

STADTMAN TC. Selenium-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 93-110.

STEWART NG, CROOKS RN. Long-range travel of the radioactive cloud from the accident at Windscale. *Nature* 1958; 182: 627-628.

STOCKEN LA, THOMPSON RSH. British anti-Lewisite 3. Arsenic and thiol excretion in animals after treatment of Lewisite burns. *Biochem J* 1946; 40: 548-554.

SUN X, WONG JR, SONG K, CHEN LB. Anticarcinoma activity of a novel drug , 3-ethyl-3'methyl-thiatelluracarbocyanine iodite (Te) a tellurium- containing cyanine targeted at mitochondria. *Clin Canc Res* 1996; 2: 1335-1340.

TAPIA R, MEDINA-CEJA L, PENA F. On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem Int* 1999; 34: 23–31.

TAYLOR A. Biochemisry of tellurium. *Biol Trace Elem Res* 1996; 55: 231-239.

TCHEKALAROVA J, SOTIRIOU E, GEORGIEV V, KOSTOPOULOS G, ANGELATOU F. Up-regulation of adenosine A₁ receptor binding in pentylenetetrazol kindling in mice: effects of angiotensin IV. *Brain Res* 2005; 1032: 94-103.

THESLEFF S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 1980; 5: 1413–1419.

TIMBRELL J. Principles of Biochemical Toxicology. Taylor & Francis, London 2000.

- TIZZANO JP, GRIFFEY KI, SCHOEPP DD. Receptor subtypes linked to metabotropic glutamate receptor agonist-mediated limbic seizures in mice. *Ann NY Acad Sci* 1995; 765: 230-235.
- TOEWS AD, ECKERMANN CE, ROBERSON MD, LEE SY, MORELL P. Primary demyelination induced by exposure to tellurium alters mRNA levels for nerve growth factor receptor, SCIP, 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, and myelin proteolipid protein in rat sciatic nerve. *Mol Brain Res* 1991; 11: 321-325.
- TOMOYUKI T, IAN DF, TETSUHIRO T, MARGARET BD, KAYOKO O. Presynaptic Calcium Current Modulation by a Metabotropic Glutamate Receptor. *Science* 1996; 594-597.
- TYMIANSKI M. Cytosolic calcium concentrations and cell death in vitro. *Adv Neurol* 1996; 71: 85-105.
- URSINI F, BINDOLI A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids* 1987; 44: 255-276.
- WALLENSTEIN M. Effect of morphine pretreatment on pentylentetrazol-induced seizures in the rat. *Neuropharmacology* 1983; 22: 1187-1192.
- WANG TL, HACKAM AS, GUGGINO WA, CUTTING GR. A single amino acid in γ -aminobutyric acid ρ 1 receptors affects competitive and noncompetitive components of picrotoxin inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11751-11755.
- WEBER GF. Final common pathways in the neurodegenerative diseases: regulatory role of the glutathione cycle. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23: 1079-1089.
- WESTBROOK LG, MAYER ML. Micromolar concentrations of Zn^{2+} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 1987; 328: 640-643.
- WIDY-TYSZIEWICZ E, PIECHAL A, GAJKOWSKA B, SMIALEK M. Tellurium-induced cognitive deficits in rats are related to neuropathological changes in the central nervous system. *Toxicol Lett* 2002; 131: 203-214.
- WONG JYF, ROSS SA, MCCOLL C, MASSALAS JS, POWNEY E, FINKELSTEIN DI, CLARK M, HORNE MK, BERKOVIC SF, DRAGO J. Proconvulsant-induced seizures in α_4 nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice. *Neuropharmacology* 2002; 43: 55-64.

YAMAGUCHI S, ROGAWSKI MA. Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* 1992; 11: 9–16.

ZHU Y, ZHU-GE, Z, WU D, WANG S, LIU L, OHTSU H, CHEN Z. Carnosine inhibits pentylenetetrazol-induced seizures by histaminergic mechanisms in histidine decarboxylase knock-out mice. *Neurosci Let* 2007; 416: 211-216.