

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

**ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS
CONVULSÕES INDUZIDAS POR DISSELENETO DE
DIFENILA EM RATOS JOVENS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marina Prigol

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR DISSELENETO DE DIFENILA EM RATOS JOVENS

por

Marina Prigol

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

Orientadora: Prof^o. Dr. Gilson Zeni

Santa Maria, RS, Brasil

2007

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado

**ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS CONVULSÕES
INDUZIDAS POR DISSELENETO DE DIFENILA EM RATOS JOVENS**

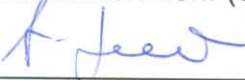
Elaborada por
Marina Prigol

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em
Bioquímica Toxicológica**

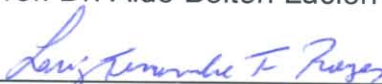
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Gilson Zeni (Orientador)



Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion (UFRGS)



Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes (UFSM)

Santa Maria, agosto de 2007.

“É melhor tentar e falhar do que se preocupar em ver a vida passar, é melhor tentar, embora em vão, do que ficar sem fazer nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar do que em dias tristes em casa me esconder, prefiro ser feliz embora louco do que em conformidade viver...”

Martin Luter King

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelos valores, ensinamentos e apoio sempre incondicional a todas as minhas decisões!

Ao meu orientador Gilson e à co-orientadora Cristina pelos ensinamentos, pelo carinho, amizade, compreensão, força, dinamismo e paciência..., por acreditarem que eu era capaz, mesmo quando nem eu acreditava! Não teria palavras para descrever o quanto contribuíram com o meu crescimento profissional e como pessoa...Muito Obrigada!

À minha família adotiva em Santa Maria: Ju, Jorge, Juli, Carlos e ao Alex por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus colegas de laboratório que são muito mais que simples colegas de trabalho, são amigos.

À minha filhota científica Ethílica. Obrigada pela dedicação, lealdade, amizade e auxílio na realização deste trabalho. E ao meu caçula científico César pela dedicação e empenho. Adoro vocês!

À Lucielli, responsável pela minha vinda para a Bioquímica. Pelos ensinamentos, ajuda e pela amizade, dentro e fora do laboratório. Obrigada por todo apoio e companheirismo.

Aos meus “pais adotivos” Sessa e Borges, pela divertida convivência, amizade, apoio e carinho. Sessa, valeu pelas dicas e por revisar minha dissertação. Obrigada de coração!

Às maninhas Larissa e Cristiane, obrigada pela parceria, amizade e descontração. Adoro vocês gurias!

À Simone, grande parceira, ao Alex, Ricardo, Fran e Eluza, pela convivência e amizade.

À nova geração do laboratório, Cristiano, Gabi, Bibi, Aninha, Simone, Carina, Lio, Raquel, Marlon, Carmine, Renata, Érico, Carine...

Aos amigos do laboratório do professor Gilson: Shumacher, Shumacherzinho, Joel, Carol, Flávia, Dani, Pati, Benhur, Juliano, Maneco, Sirilo, Zé, dentre outros.

Aos professores: Dr. Aldo Bolten Lucion, Dr. Luiz Fernando Freire Royes e Dr. Juliano Ferreira pela disponibilidade de fazer a leitura desta dissertação e compor sua comissão examinadora.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica que, de diferentes formas, contribuíram para a minha formação científica.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade e à CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

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

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR DISSELENETO DE DIFENILA EM RATOS JOVENS

AUTORA: MARINA PRIGOL
ORIENTADOR: GILSON ZENI
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 2007

As convulsões podem ocorrer em todas as idades, afetando cerca de 1-2% da população mundial, sendo mais comum em crianças do que em adultos. Convulsões prolongadas no período de desenvolvimento podem levar a sérias conseqüências na idade adulta. Neste estudo o potencial neurotóxico do disseleneto de difenila foi avaliado pela manifestação de convulsões em ratos jovens (12-14 dias de vida). Os resultados sugerem que a latência para o aparecimento de convulsões tônico-clônicas, é dependente da dose testada. O disseleneto de difenila em altas doses induziu episódios convulsivos em ratos jovens. A maior dose de disseleneto de difenila (500mg/kg) aumentou os níveis de peroxidação lipídica, atividade da catalase bem como diminuiu as atividades da δ -ALA-D (δ -aminolevulinato-desidratase) e Na^+ , K^+ -ATPase no cérebro dos ratos jovens. Nossos resultados indicam o possível envolvimento dos danos causados pelos radicais livres nas convulsões induzidas pelo disseleneto de difenila. Os dados obtidos na dose de 150 mg/kg no cérebro dos ratos que exibiram convulsão são: um aumento nos níveis de peroxidação lipídica, atividade da catalase e inibição da atividade da δ -ALA-D, suportando que a atividade desta enzima é mais sensível que os outros parâmetros analisados como um indicador do estresse oxidativo. A menor dose de disseleneto de difenila no cérebro enfatiza a relação entre o aparecimento das convulsões e a latência para o primeiro episódio convulsivo. Contudo, este trabalho pode demonstrar os efeitos neurotóxicos do disseleneto de difenila, em ratos jovens, caracterizados pelo aparecimento de convulsões, que são em parte, relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: disseleneto de difenila, selênio, estresse oxidativo, convulsão, cérebro.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS IN SEIZURES INDUCED BY DIPHENYL DISELENIDE IN RAT PUPS

AUTHOR: Marina Prigol

ADVISOR: Gilson Zeni

Date and Place of the defense: Santa Maria, 2007

Seizures can occur at any age, affecting at least 1-2% of the world population, they are far more common in children than adults. Prolonged seizures in the early developmental period can cause brain damage and lead to serious consequences later in life. In the present study the potential neurotoxicity of diphenyl diselenide, as measured by the manifestation of seizures in rat pups (postnatal day, PND, 12-14) was evaluated. The results suggest that the latency for the appearance of tonic-clonic seizures, characterized by rearing and falling of rat pups body, was dependent of the dose tested. Diphenyl diselenide at high doses induced seizure episodes in rat pups. The highest dose of diphenyl diselenide (500mg/kg) increased the levels of lipid peroxidation and catalase activity as well as decreased δ -ALA-D (δ -aminolevulinate dehydratase) and Na^+ , K^+ -ATPase activity in brain of rat pups. Our results indicate the possible involvement of free radical oxygen injury in diphenyl diselenide-induced seizures. The data obtained with the dose of 150 mg/kg in the brain of rats that exhibiting seizures are: an increase in lipid peroxidation levels; the lack of effect on catalase activity; an inhibition of δ -ALA-D activity, supporting that the enzyme activity is more sensitive than other parameters analyzed as an indicator of oxidative stress. The lowest dose of diphenyl diselenide in brain emphasizes the relationship between the appearance of seizures and the latency for the onset of the first episode. Taken together, this paper could add to our understanding of diphenyl diselenide neurotoxic effect demonstrated by the appearance of seizures which are, at least in part, related to the oxidative stress.

Keywords: diphenyl diselenide, selenium, stress oxidative, seizures, brain.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 - Estrutura do disseleneto de difenila ((PhSe)₂)..... 20

Artigo

Tabela 1 - Diphenyl diselenide-induced seizures in rat pups..... 26

FIGURA 1 -Effect of diphenyl diselenide on TBARS levels in brain of rat pups..... 27

FIGURA 2 - Effect of diphenyl diselenide on catalase activity in brain of rat pups..... 27

FIGURA 3 - Effect of diphenyl diselenide on δ -ALA-D activity in brain (a) and liver (b) of rat pups..... 27

FIGURA 4 - Effect of diphenyl diselenide on catalase activity in brain of rat pups..... 28

LISTA DE ABREVIATURAS

- (PhSe)₂** - disseleneto de difenila
- δ-ALA-D** - delta aminolevulinato desidratase ou porfobilinogênio sintase
- ALA** - ácido 5'-aminolevulínico ou ácido delta-aminolevulínico
- CAT**- catalase
- SOD** - superóxido desmutase
- ANOVA** - análise de variância
- SNC** - Sistema Nervoso Central
- EROs** - espécies reativas de oxigênio
- TBARS** - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- DNA** - ácido desoxirribonucléico
- RNA** - ácido ribonucléico
- GABA** - ácido γ-aminobutírico
- NMDA** - N-metil-D-aspartato
- AMPA** - ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- PTZ** - pentilenotetrazol
- ATP** - adenosina trifosfato
- O₂⁻** - superóxido
- OH** - radical hidroxil
- H₂O₂** - peróxido de hidrogênio
- NO** - óxido nítrico
- ONOO⁻** - peroxinitrito
- Se⁻²** - seleneto
- Se⁰** - selênio elementar
- Se⁺⁴** - selenito
- Se⁺⁶** - selenato
- S** - enxofre
- R-SeH** - selenóis
- R-SH** - tióis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Convulsões.....	13
2.1.1. Convulsões na Infância.....	15
2.2. Estresse Oxidativo.....	16
2.3. Convulsões e Estresse Oxidativo.....	17
2.4. Selênio.....	18
2.4.1. Atividade biológica.....	19
2.5. Disseleneto de difenila.....	19
2.5.1. Disseleneto de difenila e Convulsão.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
4.1. INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS IN SEIZURES INDUCED BY DIPHENYL DISELENIDE IN RAT PUPS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	35
7. PERSPECTIVAS.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Os episódios convulsivos afetam cerca de 1 - 2% da população mundial e podem ocorrer em todas as idades, sendo mais comum em crianças que em adultos. As convulsões pediátricas são únicas em relação a vários aspectos quando comparadas com a convulsão em adultos (Cowan, 2002). A incidência de convulsões é muito alta no primeiro ano de vida, diminuindo na infância e adolescência (Grunewald, 2002). O cérebro imaturo difere do cérebro adulto em resposta as drogas antiepilépticas convencionais, podendo ser refratário a drogas antiepilépticas que são potentes anticonvulsivantes em adultos. Muitas destas drogas, como a fenitoína, o fenobarbital, o diazepam, entre outras, causam neurodegeneração apoptótica difundida em cérebros de ratos, durante o período de crescimento (Bittigau et al., 2003).

O comportamento convulsivo refere-se a uma breve alteração causada pela ativação desordenada, sincrônica e rítmica de grupos de neurônios cerebrais. Deste modo, as crises convulsivas podem ser classificadas como “não epiléticas”, quando provocadas no cérebro normal por tratamentos como eletrochoque ou com convulsivantes químicos, ou “epiléticas” quando ocorrem sem um estímulo evidente (Engelborghs et al., 2000; Walker et al., 2004). Um desequilíbrio ocasionado por um aumento da transmissão excitatória glutamatérgica e/ou diminuição da resposta inibitória GABAérgica são importantes mecanismos envolvidos com a gênese da convulsão (Ribeiro et al., 2005).

Um significativo número de estudos sugerem que as espécies reativas de oxigênio (EROS) estão associadas com os episódios convulsivos, o que pode levar a morte neuronal (Erakovic, 2001; Liang et al., 2000). O estresse oxidativo ocorre em consequência a episódios convulsivos prolongados, sugerindo que isso possa desempenhar um papel importante no dano cerebral induzido pela convulsão (Kaneko et al., 2002). O cérebro é o alvo preferencial do processo peroxidativo, pois contém uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, sendo que os lipídios de membrana, além das proteínas celulares, DNA e RNA são alvos suscetíveis ao dano oxidativo (Halliwell and Gutteridge, 1989; Liang et al., 2000). Entretanto, existem diferentes defesas antioxidantes no cérebro, capazes de neutralizar as EROS, elas podem ser classificadas em enzimáticas (superóxido

dismutase, glutathiona peroxidase e catalase), não enzimáticas (glutathiona e ácido úrico) e antioxidantes provenientes da dieta (vitaminas A, E e C, β caroteno e flavonóides) (Bielski et al., 1983).

O selênio é um elemento traço essencial para o crescimento e desenvolvimento do organismo. Dentre os compostos de selênio que possuem ação farmacológica está o disseleneto de difenila (PhSe)₂ (Nogueira et al., 2004). O (PhSe)₂ é um composto organocalcogênio que causa mínima toxicidade quando administrado agudamente em ratos e camundongos, possuindo atividade anti-úlceras (Savegnago et al., 2006), antioxidante (Rossato et al., 2002; Meotti et al., 2004), neuroprotetora (Ghisleni et al., 2003), hepatoprotetora (Borges et al., 2005), anti-inflamatória e antinociceptiva (Nogueira et al., 2003a; Savegnago et al., 2007) e anti-hiperglicêmica (Barbosa et al., 2006). Além dessas propriedades farmacológicas, o (PhSe)₂ causa efeitos tóxicos quando administrado em altas doses (Nogueira et al., 2003b). O cérebro é um dos órgãos alvo deste composto, pois devido a sua lipofilicidade, tem a capacidade de ultrapassar a barreira cérebro-sangue afetando um grande número de processos neuronais (Jacques-Silva et al., 2001; Maciel et al., 2003) que podem ocasionar convulsões (Nogueira et al., 2003b).

Considerando que as convulsões no período de desenvolvimento podem causar danos cerebrais, levando a sérias conseqüências na idade adulta, e que isto pode estar associado ao aumento na produção de EROS e variações nos níveis de várias defesas antioxidantes, este trabalho visa verificar o envolvimento do estresse oxidativo nas convulsões induzidas por (PhSe)₂ em ratos jovens.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Convulsões

A epilepsia é uma das muitas desordens cerebrais, que afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo todo (Scheuer and Pedley, 1990). É uma doença neurológica crônica, caracterizada por espontâneas e recorrentes convulsões (Treiman, 1995).

As convulsões se caracterizam por descargas anormais em um grupo de neurônios cerebrais, levando a uma alteração da atividade cerebral caracterizada por manifestações motoras, sensitivas, sensoriais, psíquicas ou neurodegenerativas. Fundamentalmente se dividem em dois grandes grupos: parciais e generalizadas (Commission, 1981; Loscher, 1997).

As crises parciais são descargas elétricas anormais, provenientes de um foco epileptogênico, limitadas a uma região mais ou menos circunscrita do córtex cerebral, podendo ser: parciais simples: não provocam alteração da consciência e manifestam-se como eventos visuais, motores, autonômicos ou sensoriais, podendo confundir com outros fenômenos transitórios; parciais complexas: caracterizam-se por uma mudança de consciência, definida como incapacidade de responder normalmente a estímulos externos, podendo ocorrer em graus variáveis e associar-se a diversos eventos, como quedas abruptas e movimentos inconscientes e involuntários (automatismos) (Commission, 1989; Loscher, 1997).

Nas crises generalizadas, as descargas neuronais são bilaterais e envolvem simultaneamente amplas áreas de ambos os hemisférios cerebrais. A consciência é quase sempre comprometida, e as manifestações motoras afetam os dois lados do corpo. As crises podem ser convulsivas (com fenômenos motores) ou não. No primeiro caso, são classificadas como: tônicas, quando o corpo fica rígido; clônicas, quando há contrações ritmadas seguidas de relaxamento em rápida sucessão; tônico-clônicas, se os dois sintomas estiverem presentes e mioclônicas, caso haja contrações não ritmadas e erráticas de apenas um ou alguns grupos de músculos definidos. Caso não haja fenômenos motores, como os anteriormente descritos, as crises são denominadas atônicas (perda do tônus muscular, sem rigidez do corpo) ou de ausência (perda do contato com o meio) (Commission, 1989; Loscher, 1997).

A epilepsia é uma desordem de causa idiopática. Entre as possíveis causas da epilepsia estão lesões cerebrais decorrentes de traumatismos na cabeça, tumores, distúrbios cerebrais degenerativos, infecções (meningite, por exemplo), abuso de bebidas alcoólicas ou de drogas e complicações durante o parto, porém, a maior parte dos casos não tem uma origem clara, ou seja, as convulsões não são determinadas por uma lesão, mas sim por fatores genéticos (Loscher, 1997; Holmes, 2005). Na ausência de um fator etiológico específico, na maioria dos casos a terapia se faz necessária para controlar os sintomas.

Vários trabalhos sugerem que os principais mecanismos envolvidos na gênese da convulsão estão relacionados a um desequilíbrio ocasionado por um aumento da transmissão excitatória glutamatérgica e/ou diminuição da resposta inibitória GABAérgica (Ribeiro et al., 2005).

O aminoácido L-glutamato é considerado o maior mediador de sinais excitatórios no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e está envolvido em muitos aspectos da função normal do SNC, incluindo cognição, memória e aprendizagem (Fonnum, 1984; Ottersen and Storm-Mathisen, 1984; Headley and Grillner, 1990). Simultaneamente, o glutamato desempenha um importante papel no desenvolvimento do SNC, como indução sináptica, migração, diferenciação e morte celular (Johnston, 1995; Vallano, 1998).

O glutamato exerce seu papel por ativação dos receptores glutamatérgicos. Estes receptores estão localizados nas membranas pré e pós-sinápticas, bem como nas membranas das células gliais (Meldrum et al., 1999). Desta forma, a concentração de glutamato no fluido extracelular é que determina a extensão da estimulação dos receptores (Danbolt, 2000). Três diferentes famílias de receptores glutamatérgicos são conhecidas: Receptores ativados pelo N-metil-D-aspartato (NMDA), outra ativada pelo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e pelo cainato. A terceira família consiste de receptores acoplados a proteína G, também denominados receptores metabotrópicos (Cotmann et al., 1995; Pin and Duvoisin, 1995). Os receptores NMDA, AMPA/cainato são canais iônicos que, ao serem ativados, abrem seus canais e conduzem somente Na^+ ou ambos Na^+ e Ca^{2+} , devido a isso, são coletivamente denominados como receptores glutamatérgicos ionotrópicos (Danbolt, 2000). Portanto a sua ativação provoca a despolarização da membrana sináptica e desencadeia uma resposta excitatória. Um excesso de glutamato na fenda sináptica poderá induzir uma excessiva ativação de

receptores de glutamato, causando excitotoxicidade (Olney, 1981). Por isso a descoberta de antagonistas glutamatérgicos tem efeitos benéficos em modelos de desordens neurológicas, tais como epilepsia.

A neurotransmissão sináptica inibitória no SNC de mamíferos é mediada principalmente pelo ácido γ -aminobutírico (GABA). Este neurotransmissor é encontrado em altas concentrações no SNC de adultos (Paul, 1995; Olsen and De Lorey, 1999). Assim como o glutamato, o GABA é armazenado em vesículas sinápticas e liberado para o meio extracelular de maneira dependente de Ca^{2+} , onde ativa seus receptores. Os receptores GABAérgicos estão divididos em três classes, de acordo com propriedades farmacológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas: GABA_A e GABA_C (receptores ionotrópicos) e GABA_B (receptores metabotrópicos) (Cooper et al., 1996; Olsen and De Lorey, 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.

Além do sítio para a ligação do GABA, os receptores GABA_A possuem sítios de ligação para os benzodiazepínicos e barbitúricos, dentre outros, os quais atuam como agonistas da neurotransmissão inibitória do GABA, sendo fármacos comumente usados no tratamento de convulsões (Mehta and Tcku, 1999; Raol et al., 2005).

2.1.1. Convulsões na Infância

Pacientes com epilepsia apresentam um grande risco de desenvolverem alterações cognitivas e anormalidades comportamentais. Existem muitas evidências que demonstram que as convulsões podem causar danos cerebrais que podem ser responsáveis por um declínio cognitivo (Elger et al., 2004).

Crianças apresentam um alto risco de desenvolver convulsões, quando comparadas a adultos, e este risco é aumentado nos primeiros meses de vida. Durante o nascimento, os bebês podem sofrer insultos como trauma, hipóxia-

isquemia, infecções perinatais, hemorragias intracranial, distúrbios metabólicos e febre, o que pode resultar em convulsão (Holmes, 2005).

Diversos estudos utilizando modelos animais demonstram que o cérebro imaturo é mais vulnerável ao desenvolvimento de convulsões quando comparado ao cérebro adulto. Neurônios imaturos tendem a gerar periódicas descargas e essas facilitam a geração de oscilações patológicas, além disto, o sistema GABAérgico exerce uma ação paradoxalmente excitatória em grande parte das estruturas cerebrais neste período (Khazipov et al., 2004).

A longo prazo as convulsões podem induzir alterações celulares e metabólicas, levando a perda neuronal, neurogênese, reorganização sináptica e com isso aumentando a susceptibilidade de deficiências comportamentais e cognitivas (Sutura et al., 2002; 2003).

2.2. Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são capazes de gerar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes e reação com os constituintes celulares (Josephy, 1997; Timbrell, 2000). Estas são geradas por uma variedade de processos, podendo atacar uma diversidade de biomoléculas alvo, tais como, DNA, lipídeos e proteínas.

As membranas biológicas apresentam uma estrutura geral comum. Estas são constituídas de uma bicamada lipídica as quais estão associadas a proteínas. As proteínas presentes na membrana celular são responsáveis pelo transporte de moléculas específicas através da bicamada lipídica. Além disso, essas proteínas podem agir como catalisadoras de reações associadas às membranas, como a síntese de ATP (Alberts et al., 1994).

As 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, podendo uma das caudas apresentar uma ou mais ligações duplas (insaturações) (Alberts et al., 1994; Halliwell & Gutteridge, 1989). Quando os radicais livres reagem com esses ácidos graxos insaturados, modificam os lipídeos e a membrana perde suas características

arquitetônicas, tornando-se menos firme e menos flexível, criando-se verdadeiras fendas iônicas que alteram sua semipermeabilidade, o que favorece a entrada e saída indiscriminada de metabólitos e detritos da célula, provocando sua ruptura e lise com necrose (Josephy, 1997; Timbrell, 2000).

As principais EROs vinculadas ao estresse oxidativo são: o radical ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($\cdot OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Estes por sua vez são neutralizados por um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído de enzimas tais como a catalase, a superóxido dismutase, a glutathiona peroxidase, além de inúmeros sistemas de defesas não-enzimáticas incluindo as vitaminas A, E e C, flavonóides, ubiquinonas e o conteúdo de glutathiona reduzida (Alexi et al., 1998; Gianni et al., 2004). Neste contexto o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs quanto da redução da capacidade antioxidante celular total. (Dawson & Dawson, 1996; Halliwell, 1992).

Estudos bioquímicos sugerem que reações de oxidação podem ser importantes em patologias cerebrais (Ames et al., 1993), e estão associadas com um desequilíbrio da regulação redox no SNC (Weber, 1999).

2.3. Convulsões e Estresse Oxidativo

A prolongada excitação dos neurônios durante as convulsões pode levar a injúria e morte celular, resultante de mecanismos bioquímicos desconhecidos e que não são bem entendidos. Um plausível mecanismo de injúria celular envolve a formação de uma quantidade excessiva de radicais livres (Floyd, 1990; Reiter et al., 1997) levando a alterações estruturais em proteínas celulares, membranas lipídicas, DNA e RNA (estresse oxidativo) (Beni and Moretti, 1995). Em modelos epiléticos em roedores, mostrou-se que o estresse oxidativo contribuiu em grande parte na morte de células neuronais e gliais (Arnaiz et al., 1998).

O cérebro é um alvo preferencial do processo peroxidativo, pois apresenta uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. Pesquisas sugerem que o aumento na quantidade de radicais livres e/ou a diminuição na atividade das defesas antioxidantes podem ser reportados durante os processos convulsivos (Berg et al., 1995; Naffah-Mazzacoratti et al., 2001).

Vários estudos relacionam o envolvimento do estresse oxidativo ao processo convulsivo. Recentes trabalhos demonstraram um aumento em diversos marcadores de formação de espécies reativas, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Bashkatova et al., 2003; Patsoukis et al., 2004) e proteína carbonila (Patsoukis et al., 2004; Oliveira et al. 2004), assim como uma redução na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase (Oliveira et al., 2004) em modelos de convulsão induzidos por pentilenotetrazol (PTZ), o que sugere que a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estariam relacionadas com os efeitos convulsivantes e neurotóxicos do PTZ (Bashkatova et al., 2003). Do mesmo modo, o tratamento com antioxidantes foi capaz de atenuar as convulsões induzidas por esse composto e/ou o dano induzido pelas espécies reativas (Kabuto et al., 1998; Bashkatova et al., 2003).

Pesquisas também relacionam a administração intraestriatal de metilmalonato à indução de convulsões, formação de EROs e inibição da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase em estriado de ratos (de Mello et al., 1996; Figuera et al., 1999; 2003; Marisco et al., 2003; Wyse et al., 2000; Royes et al., 2005) sendo que estas convulsões são atenuadas pelo uso de ascorbato e α -tocoferol, ambos, agentes antioxidantes (Fighera et al., 1999; 2003) e são induzidas por amônia, um agente pró-oxidante (Marisco et al., 2003), o que mais uma vez enfatiza a relação entre a geração de estresse oxidativo e o aparecimento de convulsões.

2.4. Selênio

O selênio (Se) foi descoberto em 1817, pelo químico sueco J. J. Berzelius. O Se é um elemento do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

O Se compartilha propriedades químicas e físicas com o enxofre (S). Esta similaridade permite que o Se substitua o S, promovendo interações Se-S nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre Se e S constituem a base de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980).

Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), onde ocorre a substituição do átomo de S pelo átomo de Se (Klayman & Günther, 1973).

2.4.1. Atividade biológica

O Se é um elemento traço, cuja essencialidade nutricional foi demonstrada em 1957 por Schwartz & Foltz (1957).

Nos últimos anos, tem sido descrito que baixos níveis de Se podem levar à pré-disposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose, doença cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000). Neste contexto, a suplementação de dietas com Se, tanto para animais quanto para humanos, tem sido aceita pela comunidade científica. A Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50-200 μg de Se, a qual é considerada segura para indivíduos adultos (Food and Nutrition Board, 1989).

O Se apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante como um antioxidante. Já é conhecido que o Se está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas glutathione peroxidase (Flohé et al., 1973), tioredoxina redutase (Holmgren, 1985), 5'-deiodinase (Behné and Kyriakopoulos, 1990) e selenoproteína P (Ursini et al., 1990). A atividade redox do Se tem fundamental importância para o sítio catalítico dessas enzimas. Além disso, vários relatos demonstraram que compostos de Se mimetizam a atividade da enzima glutathione peroxidase.

2.5. Disseleneto de difenila

A partir da década de 30, os organocalcogênios têm sido alvos de interesse para os químicos orgânicos em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas (Comasseto, 1983), suas propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham & Graf, 1991; Kanda et al., 1999; Nogueira et al., 2004).

O disseleneto de difenila [(PhSe)₂]– figura 1] é um composto orgânico que contém Se, portanto um organocalcogênio, largamente utilizado como intermediário em reações de síntese orgânica (Paulmier, 1986; Braga e cols., 1996).

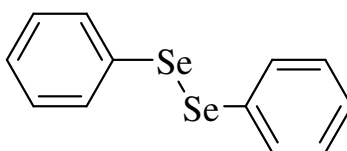


Figura 1. Estrutura química do Disseleneto de Difenila

Nosso grupo de estudo tem demonstrado que o (PhSe)₂ possui inúmeras propriedades farmacológicas, tais como antioxidante (Rossato et al., 2002; Meotti et al., 2004), anti-úlceras (Savegnago et al., 2006), neuroprotector (Ghisleni et al., 2003), hepatoprotetor (Borges et al., 2005), anti-inflamatório e antinociceptivo (Nogueira et al., 2003a; Savegnago et al., 2007) e anti-hiperglicêmico (Barbosa et al., 2006).

Além das propriedades farmacológicas, os compostos orgânicos de Se, incluindo o (PhSe)₂, são conhecidos por induzir toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

Dados do nosso laboratório têm mostrado que formas orgânicas de Se podem ser neurotóxicas (Nogueira et al., 2003b; Moretto et al., 2003), causar toxicidade renal (Meotti et al., 2003) para roedores adultos, ou ser nocivas para proteínas ou enzimas de vários tecidos de mamíferos, tais como a enzima δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2001; Farina et al., 2001; Bolzan et al., 2002; Nogueira et al., 2003c) e Na⁺, K⁺-ATPase (Borges et al., 2005).

Estudos prévios demonstraram que a exposição ao (PhSe)₂ causa modificações na funcionalidade do sistema glutamatérgico *in vivo* e *in vitro* (Nogueira et al., 2001), além de ocasionar convulsões (Nogueira et al., 2003). A modulação de grupos tiólicos de transportadores e receptores de glutamato no tecido cerebral pode representar a causa da toxicidade provocada por organocalcogênios em ratos (Nogueira et al., 2001; 2004).

2.5.1. Disseleneto de difenila e Convulsão

Estudo prévio de nosso grupo demonstrou que o disseleneto de difenila pode induzir convulsões e que estas dependem da via de administração (intraperitoneal, subcutânea ou intracerebroventricular) e da espécie animal considerada (ratos ou camundongos) (Nogueira et al., 2003b). O $(\text{PhSe})_2$ não causa convulsões e nem morte em camundongos quando administrado pela via subcutânea e intracerebroventricular, porém, quando administrado pela via intraperitoneal, este composto causa convulsão em camundongos, mas, não em ratos adultos, demonstrando ser mais neurotóxico nessa espécie (Nogueira et al., 2003b).

Mudanças na estrutura dos disselenetos, como a introdução de grupos funcionais (doadores ou retiradores de elétrons) reduzem ou abolem o aparecimento de episódios convulsivos. Além disso, disselenetos dialquílicos são mais tóxicos em comparação a disselenetos diarílicos, em ratos e camundongos, causando episódios convulsivos em camundongos. A latência para o aparecimento destes episódios convulsivos aumenta com o aumento no número de carbonos da cadeia ligados ao disseleneto (Nogueira et al., 2003b).

Demonstrou-se também que moduladores alostéricos GABAérgicos (diazepan, fenobarbital e muscimol) e antagonistas muscarínicos competitivos são hábeis em abolir ou reduzir as convulsões induzidas pelo disseleneto de difenila, sugerindo que ocorra modulação de mais de um sistema de neurotransmissão nas convulsões induzidas por este composto (Nogueira et al., 2003b).

3. OBJETIVOS

Considerando que as convulsões no período de desenvolvimento podem causar danos cerebrais levando a sérias conseqüências na idade adulta, e que isto pode estar associado ao aumento na produção de EROs e variações nos níveis de várias defesas antioxidantes, os objetivos deste trabalho foram: (i) investigar a toxicidade aguda induzida pela administração oral de $(\text{PhSe})_2$ em ratos jovens; (ii) avaliar se o $(\text{PhSe})_2$ causa comportamento convulsivo em ratos jovens, já que o mesmo não causa convulsão em ratos adultos e (iii) examinar se o estresse oxidativo está envolvido nas convulsões induzidas pelo $(\text{PhSe})_2$ em ratos jovens, através da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica, defesas antioxidantes e enzimas sensíveis as condições oxidativas.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi publicado na Revista *Brain Research*.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o artigo, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados ao artigo deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

4.1. INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS IN SEIZURES INDUCED BY DIPHENYL DISELENIDE IN RAT PUPS

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Involvement of oxidative stress in seizures induced by diphenyl diselenide in rat pups

Marina Prigol, Ethel A. Wilhelm, Caroline C. Schneider, Joao B.T. Rocha, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 30 January 2007

Available online 4 February 2007

Keywords:

Diphenyl diselenide

Selenium

Stress oxidative

Seizures

Brain

ABSTRACT

In the present study the potential neurotoxicity of diphenyl diselenide, as measured by the manifestation of seizures in rat pups (postnatal days, PND, 12–14) was evaluated. The results suggest that the latency for the appearance of tonic–clonic seizures, characterized by rearing and falling of rat pups body, was dependent of the dose tested. Diphenyl diselenide at high doses induced seizure episodes in rat pups. The highest dose of diphenyl diselenide (500 mg/kg) increased the levels of lipid peroxidation and catalase activity as well as decreased δ -ALA-D (δ -aminolevulinic acid dehydratase) and Na^+ , K^+ ATPase activity in the brain of rat pups. Our results indicate the possible involvement of free radical oxygen injury in diphenyl diselenide-induced seizures. The data obtained with the dose of 150 mg/kg in the brain of rats that exhibited seizures are: an increase in lipid peroxidation levels; the lack of effect on catalase activity; an inhibition of δ -ALA-D activity, supporting that the enzyme activity is more sensitive than other parameters analyzed as an indicator of oxidative stress. The lowest dose of diphenyl diselenide emphasizes the relationship between the appearance of seizures and the latency for the onset of the first episode. Taken together, this paper could add to our understanding of diphenyl diselenide neurotoxic effect demonstrated by the appearance of seizures which are, at least in part, related to the oxidative stress.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a major health problem, affecting 0.5–1.0% of the world's population (Hauser et al., 1996). This condition is characterized by prolonged or repetitive epileptic discharges, resulting clinically in persistent alterations of the normal brain function and cognitive state (Treiman, 1995). While seizures can occur at any age, they are far more common in children than adults, seizure incidence is highest in the first year of life, and decreases with age throughout childhood and adolescence (Cowan, 2002). Prolonged seizures in the early

developmental period can cause brain damage and lead to serious consequences later in life (Meldrum, 2002).

There are points of evidences suggesting that oxidative stress is important in brain tissue damage following seizure induction (Kaneko et al., 2002) and the activation of excitatory amino acid receptor can also trigger the formation of reactive oxygen species (ROS) (Said et al., 2000). The brain is a preferential target for the peroxidative process because it has a high content of polyunsaturated fatty acids (Halliwell and Gutteridge, 1984). Many cerebral enzymes which contain sulfhydryl groups, such as δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) and Na^+ , K^+ ATPase,

* Corresponding author. Fax: +55 55 3220 8978.

E-mail address: gzeni@quimica.ufsm.br (G. Zeni).

are sensitive to oxidizing agents (Borges et al., 2005) and to situations associated with oxidative stress (Demasi et al., 1996). To circumvent the oxidative stress organisms have systems that prevent hazardous effects of free radicals such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Accordingly, differences have been reported in free radical scavenging enzyme levels during the convulsive process (Freitas et al., 2004).

Diphenyl diselenide is an organoselenium compound, highly lipophilic, with many pharmacological properties such as antiulcer (Savegnago et al., 2006) anti-inflammatory and anti-nociceptive (Savegnago et al., 2007), neuroprotector (Ghisleni et al., 2003), anti-hyperglycemic (Barbosa et al., 2006) and antioxidant (Meotti et al., 2003). On the other hand, studies performed by our group demonstrated that prolonged exposure to high doses of diphenyl diselenide increased three times the total selenium content in the brain. There is also evidence that diphenyl diselenide crosses the blood barrier and brain selenium levels increase in mice after acute and chronic exposure to diphenyl diselenide (Maciel et al., 2003).

It is important to mention that this compound when administered by i.p. route induced seizure and death in mice, but did not display any overt sign of neurotoxicity in adult rats (Nogueira et al., 2003), probably because species differences in toxicity are often related to differences in the liver metabolism and disposition of a compound (Caldwell, 1982). In addition, a direct injection of diphenyl diselenide, at high doses (1000 μ mol), into the brain of rodents did not cause any overt sign of neurotoxicity (Nogueira et al., 2003) indicating that this compound must be first metabolized to cause seizures in mice, and that the site for entry into the body of a toxic compound is important in determining the final toxic effect (Timbrell, 2000). Reinforcing this idea are the data on oral administration of diphenyl diselenide which demonstrated that this organoselenium compound, at high doses (312 mg/kg), did not induce toxicological effects in rats and mice (Savegnago et al., 2007). Therefore, these results have supported the hypothesis that the brain is a potential target for the toxicity of diphenyl diselenide and possibly for its pharmacological and therapeutic actions.

Based on the considerations above, the aims of the present study were: (a) to investigate the acute toxicity induced by diphenyl diselenide in rat pups using oral route of administration with the purpose of offering safety in the possible therapeutic use of this compound; (b) to evaluate the appearance of seizure behavior in rat pups since diphenyl diselenide does not induce this neurotoxic effect in adult rats, this is an important topic from an academic point of view; and (c) to examine if oxidative stress, investigated by measuring lipid peroxidation, antioxidant enzymes and enzymes sensitive to oxidative conditions, is involved in seizures induced by diphenyl diselenide in rat pups.

2. Results

2.1. Diphenyl diselenide-induced seizures

The convulsion behavior was classified as generalized seizures (tonic-clonic) or stage 5 seizures. As shown in Table 1 diphenyl diselenide at 500 mg/kg induced seizures in 100% of rat pups, showing the latency for the first episode of 19 min.

Diphenyl diselenide at 50 and 150 mg/kg induced seizure episodes in 30% and 66% of rat pups, respectively. Therefore, the appearance of seizures and the latency for the first episode were dependent on the dose used. At the lowest dose (5 mg/kg), diphenyl diselenide did not cause seizures in rat pups.

2.1.1. Lipid peroxidation

One-way ANOVA of TBARS demonstrated that diphenyl diselenide at 500 mg/kg increased lipid peroxidation in brain of pups. TBARS levels were also increased in rat pups which had seizure episodes induced by 150 mg/kg diphenyl diselenide. Diphenyl diselenide did not alter lipid peroxidation at all other doses tested (Fig. 1).

In the liver of rat pups, TBARS levels were not changed by diphenyl diselenide (data not shown).

2.1.2. Antioxidant defenses

One-way ANOVA of CAT activity revealed that diphenyl diselenide at 50 mg/kg inhibited enzyme activity in the brain of pups which had seizure episodes. The highest dose of diphenyl diselenide stimulated catalase activity in the brain of pups. CAT activity was not altered in all other groups (Fig. 2).

There was no change of catalase activity in the liver of rat pups (data not shown). SOD activity and ascorbic acid levels were also unaltered by diphenyl diselenide in liver and brain of rat pups (data not shown).

2.1.3. δ -ALA-D activity

δ -ALA-D activity was significantly inhibited in the brain of pups which had seizure episodes independent of the dose of diphenyl diselenide administered. The enzyme activity was not altered in the brain of rat pups which did not have seizures (Fig. 3a).

In the liver, diphenyl diselenide at the highest dose inhibited δ -ALA-D activity. Hepatic δ -ALA-D activity was inhibited in rat pups which received diphenyl diselenide at 150 mg/kg and did not have seizures. All other groups had the enzyme activity unaltered (Fig. 3b).

Table 1 – Diphenyl diselenide-induced seizures in rat pups

Groups (PhSe) ₂ (mg/kg)	Appearance of seizures ^a	Latency ^b (min)
Control	0/8	ns
5	0/9	ns
50	6/20*	44.97 \pm 0.68**
150	12/15**	33.81 \pm 9.50**
500	9/9**	19.09 \pm 2.30**

*ns—Animals which did not present seizure. Data are reported as mean \pm SEM. **Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (χ^2 method and Fischer's Exact Probability Test). *Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan).

**Denoted $p < 0.05$ as compared to the other groups (one-way ANOVA/Duncan).

^a Number of animals which presented seizures/Number of animals per group.

^b Time to the appearance for the first seizure episode.

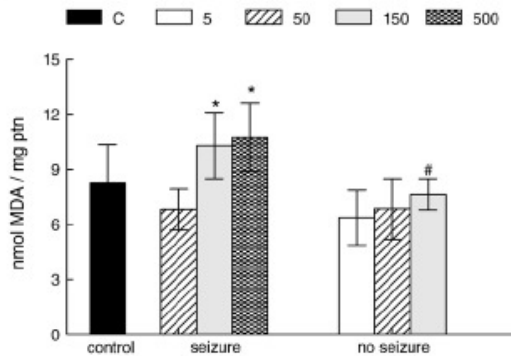


Fig. 1 – Effect of diphenyl diselenide on TBARS levels in brain of rat pups. Data are reported as mean \pm SEM of six to fourteen animals per group and expressed as nmol MDA (malondialdehyde)/mg ptn. *Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan). Abbreviations: C—control; diphenyl diselenide at the dose of: 5—5 mg/kg; 50—50 mg/kg; 150—150 mg/kg; 500—500 mg/kg.

2.1.4. Na^+ , K^+ ATPase activity

One-way ANOVA of Na^+ , K^+ ATPase activity revealed that diphenyl diselenide at 500 mg/kg significantly inhibited the enzyme activity in the brain of pups. Na^+ , K^+ ATPase activity was also significantly reduced in rat pups which received diphenyl diselenide (50 mg/kg) and had seizure episodes (Fig. 4).

3. Discussion

In the present study we have demonstrated that diphenyl diselenide administered at high doses induced seizure episodes in rat pups. The latency for the appearance of tonic-

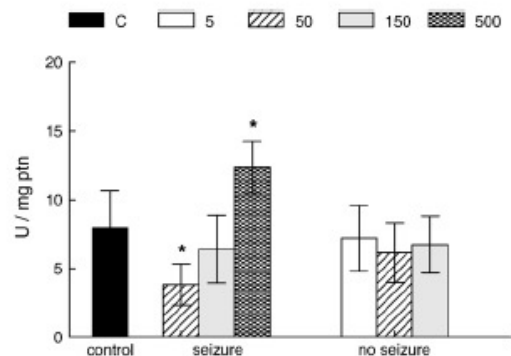


Fig. 2 – Effect of diphenyl diselenide on catalase activity in the brain of rat pups. Data are reported as mean \pm SEM of six to fourteen animals per group and express U/mg ptn. *Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan). Abbreviations: C—control; diphenyl diselenide at the dose of: 5—5 mg/kg; 50—50 mg/kg; 150—150 mg/kg; 500—500 mg/kg.

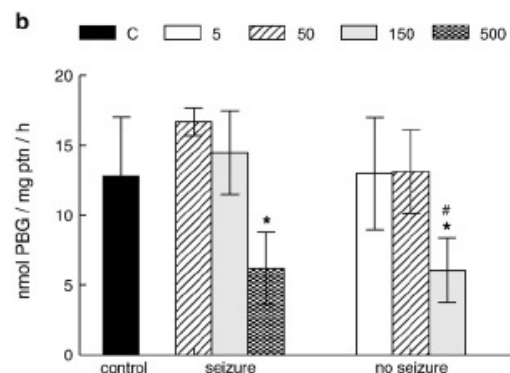
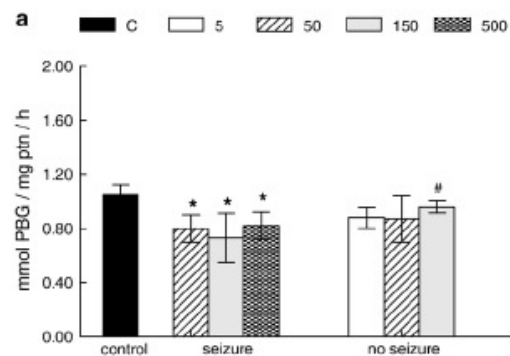


Fig. 3 – Effect of diphenyl diselenide on δ -ALA-D activity in brain (a) and liver (b) of rat pups. Data are reported as mean \pm SEM of six to fourteen animals per group and expressed as nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan). #Denoted $p < 0.05$ as compared to the 150 mg/kg (with seizure) group (one-way ANOVA/Duncan). Abbreviations: C—control; diphenyl diselenide at the dose of: 5—5 mg/kg; 50—50 mg/kg; 150—150 mg/kg; 500—500 mg/kg.

clonic seizures characterized by rearing and falling of rat pup body was dependent on the dose tested. This work is the first evidence indicating that diphenyl diselenide is capable of inducing seizures in pups when administered by oral route. It is important to point out that diphenyl diselenide did not display any overt sign of neurotoxicity when administered by i.p., s.c., oral and i.c.v. routes in adult rats (Nogueira et al., 2003; Savegnago et al., 2007). In addition, the doses of diphenyl diselenide which induced seizures in rat pups are about 10 times higher than the doses that have pharmacological properties (Meotti et al., 2003; Ghisleni et al., 2003; Nogueira et al., 2003; Savegnago et al., 2007).

Several authors have reported that the oxidative stress has been associated with seizure-induced neuronal death (Walz et al., 2000). In accordance, all pups treated with the highest dose of diphenyl diselenide (500 mg/kg) had seizures and the parameters evaluated in the brain of pups support the involvement of oxidative stress in this neurotoxic effect.

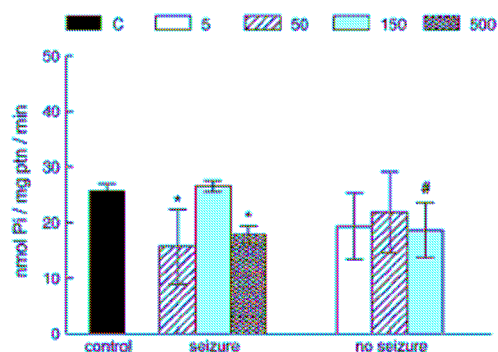


Fig. 4 – Effect of diphenyl diselenide on Na⁺, K⁺ ATPase activity in brain of rat pups. Data are reported as mean ± SEM of six to fourteen animals per group and express nmol Pi/mg ptn/min. *Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan). #Denoted $p < 0.05$ as compared to the 150 mg/kg (with seizure) group. Abbreviations: C—control; diphenyl diselenide at the dose of: 5—5 mg/kg; 50—50 mg/kg; 150—150 mg/kg; 500—500 mg/kg.

Consistent with this hypothesis are the observations that diphenyl diselenide: (1) increased lipid peroxidation, a marker of oxidative stress; (2) increased catalase activity, confirming the defensive role of catalase and indicating a cellular response to increased reactive oxygen species; (3) reduced the activity of δ -ALA-D and Na⁺, K⁺ ATPase, sulfhydryl containing enzymes, which are sensitive to oxidizing agents (Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2004; Borges et al., 2005). The inhibition of sulfhydryl enzymes could also be attributed to the ability of organoselenium in oxidizing SH groups (Spallholz et al., 2001). Moreover, compounds that oxidize -SH groups have long been known as potent δ -ALA-D inhibitors (Pappas et al., 1995). SOD activity and ascorbic acid levels were not altered by diphenyl diselenide, suggesting that these markers of oxidative stress are not related to neurotoxic effects induced by diphenyl diselenide. Regarding the data obtained in the liver, only δ -ALA-D activity was altered by the highest dose of diphenyl diselenide. In fact, diphenyl diselenide inhibited hepatic δ -ALA-D activity, which is consistent with the site of xenobiotic metabolism. The fact that none of the other parameters evaluated were changed in the liver reinforces δ -ALA-D as an enzyme very sensitive to diphenyl diselenide.

The results obtained in brain with the two medium doses (50 and 150 mg/kg) also emphasize the relationship between the appearance of seizures and the latency for the onset of the first convulsive episode. Regarding the parameters evaluated, different effects occurred between rat pups exhibiting seizures and those not seizing and these effects were dependent of the dose of diphenyl diselenide. In fact, there is a significant difference between rat pups with and without seizures after 150 mg/kg of diphenyl diselenide in TBARS levels, δ -ALA-D and Na⁺, K⁺ activity. Conversely, there is no difference between rat pups with and without seizures after 50 mg/kg of diphenyl diselenide in the same parameters evaluated. These results allow us to suggest that oxidative stress, in the

brain, is related to the dose of diphenyl diselenide administered to rat pups and at least in part to the seizure episode.

Taking these data together the oxidative stress in brain seems to be directly related to the dose of diphenyl diselenide administered. In addition, the inhibition of catalase activity on rat pups after 50 mg/kg diphenyl diselenide suggests that the time to onset for the first seizure episode (about 45 min) allowed that catalase act against reactive oxygen species, demonstrated by the lack of alteration in lipid peroxidation. Similar to the data obtained with the highest dose of diphenyl diselenide, SOD activity and ascorbic acid levels were not altered by the medium doses.

Another finding of this study is that diphenyl diselenide, at doses which induced seizures in rat pups, inhibited brain δ -ALA-D activity. The significant difference between rat pups with and without seizures in δ -ALA-D activity after the dose of 150 mg/kg but the lack of significance after 50 mg/kg, could reflect that δ -ALA-D activity is only, in part, related to the seizure episode induced by diphenyl diselenide. The fact that the dose of diphenyl diselenide is an important factor to δ -ALA-D inhibition is another interpretation that emerges from this comparison. Accordingly, a number of evidence suggest the direct involvement of δ -ALA, the substrate of δ -ALA-D, in neurological manifestations such as seizures (Kappas et al., 1995). Important, ALA accumulation has been reported in tissues of animals and patients which δ -ALA-D activity is inhibited (Juknat et al., 1995). ALA can undergo autooxidation generating reactive oxygen species and the ALA enoyl radical (Bechara et al., 1993). These reactive species increased lipid peroxidation (Emanuelli et al., 2003), induced oxidative damage and increased activity of antioxidant enzymes (Demasi et al., 1996). Therefore, the inhibition of δ -ALA-D activity is probably a consequence of oxidative stress induced by seizure episodes.

Na⁺, K⁺ ATPase activity in rats presenting seizures revealed distinct effects dependent on the dose of diphenyl diselenide administered and the time to onset for the first seizure episode. The lowest (50 mg/kg) and the highest (500 mg/kg) doses decreased the ATPase activity, but at 150 mg/kg enzyme activity was not altered. These results are very hard to explain but tentatively could be related to the latency for the onset for the first seizure episode (~45 and 30 min) for 50 and 150 mg/kg, respectively. Since Na⁺, K⁺ ATPase is sensitive to oxidizing agents (Borges et al., 2005), the enzyme inhibition after the highest dose could be explained by the very high dose of diphenyl diselenide administered.

Concerning hepatic tissue, some controversial results which are dependent on the dose studied were found. Oxidative parameters were unaltered by 50 mg/kg of diphenyl diselenide independent of seizing or not. Conversely, δ -ALA-D was inhibited in rat pups after 150 mg/kg diphenyl diselenide, which did not induce seizing. δ -ALA-D inhibition could be explained by the fact that these animals were sacrificed after 60 min of diphenyl diselenide administration, allowing that the organoselenium compound remained in the liver and by oxidizing sulfhydryl groups inhibited enzyme activity.

In conclusion, this paper could add to our understanding of diphenyl diselenide neurotoxic effect demonstrated by the appearance of seizures which are, at least in part, related to the oxidative stress. Our data provide interesting indications,

since diphenyl diselenide has pharmacological properties, mainly when administered by oral route, and can be a useful compound for therapeutic use in a near future.

4. Experimental procedure

4.1. Chemicals

δ -Aminolevulinic acid (δ -ALA), *p*-dimethylaminobenzaldehyde, epinephrine, ATP and ouabain were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Diphenyl diselenide was prepared in our laboratory according to literature methods Paulmier (1986). Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectro showed that $(\text{PhSe})_2$ obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of compound (99.9%) was determined by GC/HPLC. This drug was dissolved in canola oil, which was obtained from a standard commercial supplier. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

4.2. Animals

Young Wistar rats (postnatal days, PND, 12–14) of both sexes were obtained from a local breeding colony. Postnatal days 12–14 was chosen based on Mikulecká et al. (2004). The animals were kept in separate animal rooms, on a 12-h light/12-h dark cycle, in an air-conditioned room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Commercial diet (GUABI, RS, Brazil) and tap water were supplied ad libitum. The dams were allowed to deliver and wean their pups until postnatal days (PND) 12–14. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil.

4.3. In vivo experiments

4.3.1. Diphenyl diselenide-induced seizures

Experimenters were blind to the drug given to rat pups. Diphenyl diselenide was administered per oral route (*p.o.*, 10 ml/kg) and the animals were immediately observed. Rats were divided into groups as follows: Group 1—control (canola oil, *p.o.*), Group 2— $(\text{PhSe})_2$ (5 mg/kg, *p.o.*), Group 3— $(\text{PhSe})_2$ (50 mg/kg, *p.o.*), Group 4— $(\text{PhSe})_2$ (150 mg/kg, *p.o.*) and Group 5— $(\text{PhSe})_2$ (500 mg/kg, *p.o.*).

Appearance of seizures was quantified as previously described by Racine (1972) and Sperk et al. (1985) as follows: Stage 0: no changes; Stage 0.5: wet dog shakes; Stage 1: mouth and facial movements; Stage 2: head nodding; Stage 3: forelimb clonus; Stage 4: rearing; Stage 5: rearing and falling. The animals were observed for 1 h in Plexiglas chambers for the appearance of tonic-clonic seizures lasting more than 5 s. The latency for the onset of the first tonic-clonic seizure episode was also recorded.

Subsequently to the seizure episode, rat pups were decapitated. Animals which did not display seizures were considered protected and sacrificed 1 h after the compound administration. The liver and whole brain of all animals were removed and used for ex vivo assays.

4.4. Ex vivo experiments

The samples of liver and whole brain were homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v) or (1/5, w/v), respectively, and centrifuged at $2400 \times g$ for 15 min.

4.4.1. Lipid peroxidation

The reaction product was determined using an aliquot (200 μl) of homogenized tissue, 500 μl thiobarbituric acid (0.8%), 200 μl SDS (sodium dodecyl sulfate, 8.1%) and 500 μl acetic acid and 500 μl TBA (thiobarbituric acid 0.8%), the mixture was incubated at 95°C for 2 h. TBARS (thiobarbituric acid reactive species) were determined as described by Ohkawa et al. (1979).

4.4.2. Ascorbic acid determination

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). Proteins were precipitated in 10 volumes of a cold 4% trichloroacetic acid solution. An aliquot of the sample at a final volume of 1 ml of the solution was incubated for 3 h at 38°C then 1 ml H_2SO_4 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using a color reagent containing 4.5 mg/ml dinitrophenyl hydrazine and CuSO_4 (0.075 mg/ml) at 520 nm. The content of ascorbic acid is related to tissue amount (μmol ascorbic acid/g wet tissue).

4.4.3. δ -Aminolevulinic dehydratase (δ -ALA-D) activity

δ -ALA-D activity was assayed according to the method described by Sassa (1982) by measuring the rate of product porphobilinogen (PBG) formation except that 45 mM sodium phosphate buffer and 2.2 mM δ -ALA were used. An aliquot of 200 μl of the homogenized tissue was incubated for 1 h at 37°C (liver) and for 3 h at 37°C (brain). Enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (δ -ALA) to a final concentration of 2.2 mM in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. The incubation was stopped by adding trichloroacetic acid solution (10% TCA) with 10 mM HgCl_2 . The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm. The reaction was linear in relation to protein and time of incubation.

4.4.4. Superoxide dismutase (SOD) activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed spectrophotometrically as described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the capacity of SOD to inhibit autooxidation of epinephrine to adrenochrome. Enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot (20–60 μl) of the homogenized tissue and the substrate (epinephrine) to a concentration of 60 mM in a medium containing 50 mM glycine buffer, pH 10.3. The color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autooxidation by 50% at 26°C .

4.4.5. Catalase activity

Catalase activity was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H_2O_2 in the homogenate presence at 240 nm. Enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot

of 20 ml of the homogenized tissue and the substrate (H_2O_2) to a concentration of 0.3 mM in a medium containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. The enzymatic activity was expressed in units (1 U decomposes 1 μ mol of H_2O_2 per minute at pH 7 at 25 °C).

4.4.6. Na^+ , K^+ ATPase activity

The homogenate was centrifuged at 4000 \times g at 4 °C for 10 min and supernatant was used for assay of protein Na^+ , K^+ ATPase. The reaction mixture for Na^+ , K^+ ATPase activity assay contained 3 mM MgCl₂, 125 mM NaCl, 20 mM KCl and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, in a final volume of 500 μ l. The reaction was initiated by the addition of ATP to a final concentration of 3.0 mM. Control samples were carried out under the same conditions with the addition of 0.1 mM ouabain. The samples were incubated for 30 min at 37 °C, the incubation was stopped by adding trichloroacetic acid solution (10% TCA) with 10 mM HgCl₂. Na^+ , K^+ ATPase activity was calculated by the difference between the two assays. Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Fiske and Subbarow (1925).

4.4.7. Protein quantification

Protein concentration was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard.

4.5. Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test when appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Seizure incidence was analyzed statistically by the χ^2 method and Fisher's Exact Test.

Acknowledgments

The financial support by UFSM (FIPE), FAPERGS, CAPES and CNPQ is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Wondracek, D.C., Perotoni, J., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2006. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* 163, 230–238.
- Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Costa, C.A., Abdalla, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.M.A., Di Mascio, P., 1993. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quím. Nova* 16, 391–685.
- Borges, V.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen on cerebral Na^+ K^+ -ATPase activity in rats. *Toxicology* 215, 191–197.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Caldwell, J., 1982. Conjugation reactions in foreign compound metabolism: definition, consequences and species variations. *Drug Metab. Rev.* 13, 745–777.
- Cowan, L.D., 2002. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8, 171–181.
- Demasi, M., Penatti, C.A.A., De Lucia, R., Bechara, E.J.H., 1996. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. *Free Radical Biol. Med.* 20, 291–299.
- Emanuelli, T., Pagel, F.W., Porciúncula, L.O., Souza, D.O., 2003. Effects of 5-aminolevulinic acid in the glutamatergic neurotransmission. *Neurochem. Int.* 42, 115–121.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y.J., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Biol. Chem.* 66, 375–381.
- Freitas, R.M., Souza, F.C.F., Vasconcelos, S.M.M., Viana, G.S.B., Fonteles, M.M.F., 2004. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation levels, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 327–332.
- Ghisleni, G., Porciúncula, L.O., Cimarosti, H., Rocha, J.B.T., Salbego, C.G., Souza, D.O., 2003. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoccontent. *Brain Res.* 986, 196–199.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and diseases. *Biochem. J.* 219, 1–14.
- Hauser, W.A., Annegers, J.F., Rocca, W.A., 1996. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin. Proc.* 71, 576–586.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119–125.
- Juknat, A.A., Kotler, M.L., Batlle, A.M.C., 1995. High δ -aminolevulinic acid uptake in rat cerebral cortex: effect on porphyrin biosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 111C, 143–150.
- Kaneko, K., Itoh, K., Berliner, L.J., Miyasaka, K., Fujii, H., 2002. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. *Magn. Reson. Med.* 48, 1051–1056.
- Kappas, A., Sassa, S., Galbraith, R.A., Nordmann, Y., 1995. The porphyrias. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic Bases of Inherited*, 7th ed. McGraw Hill, New York, pp. 2103–2160.
- Maciel, E.N., Flores, E.M., Rocha, J.B.T., Folmer, V., 2003. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 470–476.
- Meldrum, B.S., 2002. Concept of activity-induced cell death in epilepsy: historical and contemporary perspectives. *Prog. Brain Res.* 135, 3–11.
- Meotti, F.C., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2003. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol. Lett.* 143, 9–16.
- Mikulecká, Anna, Kubová, Hana, Mares, Pavel, 2004. Lamotrigine does not impair motor performance and spontaneous behavior in developing rats. *Epilepsy Behav.* 5, 464–471.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Nogueira, C.W., Meotti, F.C., Curte, E., Pilissão, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183, 29–37.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104, 6255–6286.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.

- Pappas, J.B., Ahlquist, J.T., Allen, E.M., Banner, J.W., 1995. Oral dimercaptosuccinic acid and ongoing exposure to lead: effects on heme synthesis and lead distribution in a rat model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 121–129.
- Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, 1st ed. Pergamon Press, Oxford, England, pp. 25–51.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizures activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 281–294.
- Said, S.J., Pakbaz, H., Berisha, H.I., Raza, S., 2000. NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Radical Biol. Med.* 28, 1300–1302.
- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133–145.
- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2006. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 86–92.
- Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2007. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 555, 129–138.
- Spallholz, J.E., Shriver, J.E., Reid, T.W., 2001. Dimethyldiselenide and methylselenide acid generates superoxide in an in vitro chemiluminescence assay in the presence of glutathione: implications for the anticarcinogenic activity of L-selenomethionine and L-Se-methylselenocysteine. *Nutr. Cancer* 40, 34–41.
- Sperk, G.H., Lassmann, H., Baran, H., Seitelberger, F., Hornykiewicz, O., 1985. Kainic acid-induced seizures: dose-relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes. *Brain Res.* 338, 289–295.
- Treiman, D.M., 1995. Electroclinical features of status epilepticus. *J. Clin. Neurophysiol.* 12, 343–362.
- Timbrell, J., 2000. Factors affecting toxic responses: disposition. In: Timbrell, J. (Ed.), *Principles of Biochemical Toxicology*, 3rd ed. Taylor and Francis Ltd., Philadelphia, USA, pp. 25–62.
- Walz, R., Moreira, J.C.F., Benfato, M.S., Quevedo, J., Schorer, N., Vianna, M.M.R., 2000. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine of kainic acid in Wistar rats. *Neurosci. Lett.* 291, 179–182.

5. DISCUSSÃO

O disseleneto de difenila (PhSe_2) é um composto de Se amplamente utilizado como intermediário em reações de síntese orgânica (Zeni e cols., 2001). Além disso, existem diversos estudos demonstrando que este composto possui importantes propriedades farmacológicas, tornando interessante a avaliação de seus efeitos toxicológicos (Nogueira et al., 2004).

Estudos prévios utilizando ratos e camundongos adultos demonstraram que dentre os efeitos tóxicos do (PhSe_2) está a característica deste composto em produzir convulsões, o que sugere o envolvimento do mesmo com importantes processos neurológicos (Nogueira et al., 2003b).

As convulsões se caracterizam por crises espontâneas, podendo ser resultado de descargas paroxísticas, excessivas e sincrônicas de uma população neuronal (Engelborghs et al., 2000; Walker et al., 2004). A prolongada excitação neuronal durante as convulsões pode levar a injúria e morte celular. Um dos mecanismos propostos, o qual leva a neurodegeneração induzida pelo processo convulsivo é a geração de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente o estresse oxidativo (Gluck et al., 1999).

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez que o (PhSe_2), administrado pela via oral, causa convulsão em ratos jovens. Sabe-se que as convulsões são mais predominantes em crianças do que em adultos, e que em virtude de nos primeiros anos de vida o cérebro estar em desenvolvimento, as convulsões nesta faixa etária podem desencadear sérios prejuízos neurológicos, os quais podem se refletir na idade adulta (Vingerhoets, 2006). Do mesmo modo, verificou-se que os efeitos causados pela administração do (PhSe_2) são dose dependente, sendo que a dose do composto a qual induz convulsão é cerca de 10 vezes superior a dose que possui propriedades farmacológicas (Nogueira et al., 2004; Savegnago et al., 2007).

De fato, a administração do (PhSe_2) em doses elevadas (500 mg/kg) causou convulsão em 100% dos animais. As análises bioquímicas realizadas no cérebro dos animais após o episódio convulsivo demonstraram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e um aumento da atividade da enzima catalase, sugerindo que o estresse oxidativo pode estar associado às convulsões induzidas pelo (PhSe_2), podendo ocasionar um dano neuronal.

A administração do $(\text{PhSe})_2$ nas doses de 50 e 150 mg/kg causou convulsão somente em parte dos animais e a latência para o primeiro episódio convulsivo foi dose-dependente. Neste estudo observou-se uma significativa diferença entre os ratos que apresentaram convulsão quando comparado aos que não apresentaram convulsão, na dose de 150 mg/kg, em relação aos níveis de TBARS, δ -ALA-D e Na^+ , K^+ -ATPase, o que sugere que o episódio convulsivo pode estar diretamente relacionado com o estresse oxidativo e injúria cerebral no modelo convulsivo induzido por $(\text{PhSe})_2$. Já na dose de 50 mg/kg os níveis de TBARS não foram alterados em ambos os grupos, com ou sem convulsão, o que pode sugerir que o estresse oxidativo pode também estar em parte relacionado com a dose do composto administrada.

Outro fato importante foi a redução da atividade das enzimas δ -ALA-D e Na^+ , K^+ -ATPase, que são enzimas sulfidrílicas e sensíveis a agentes oxidantes (Nogueira et al., 2003c; Borges et al., 2005). De fato, estudos demonstraram que a toxicidade dos compostos orgânicos de selênio está diretamente relacionada com sua capacidade de oxidar grupos SH (Spalholz et al., 2001).

A importância destes achados está no fato de que a inibição da δ -ALA-D pode levar ao acúmulo do seu substrato, o ALA (Emanuelli et al., 2001), o qual pode se auto-oxidar, dando origem às espécies reativas de oxigênio. Estas, por sua vez, são nocivas aos sistemas biológicos, uma vez que podem oxidar biomoléculas importantes, provocando injúria tecidual e morte celular (Emanuelli et al. 2003). Existem inúmeras evidências que sugerem o envolvimento do δ -ALA, substrato da δ -ALA-D, em manifestações neurológicas como convulsões (Kappas et al., 1995; Emanuelli et al., 2003).

Do mesmo modo, estudos relacionam a inibição da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase ao processo convulsivo (Figuera et al., 2006; Royes et al., 2007; Furian et al., 2007). Sabe-se que esta enzima desempenha papel primordial na manutenção do gradiente iônico, uma vez que sua inibição aumenta a excitabilidade neuronal e facilita o aparecimento da convulsão (Vasilets and Schwarz, 1993).

Além desses achados, também se observou que a administração oral do $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de inibir a atividade da enzima δ -ALA-D hepática. De fato, compostos que são absorvidos pelo trato gastrointestinal sofrem um extenso metabolismo hepático (Timbrell, 2000). Associado a isso está a capacidade dos compostos de selênio em oxidar grupos SH (Spalholz et al., 2001), tornando enzima δ -

ALA-D hepática alvo da ação destes compostos (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001)

Neste contexto pode-se inferir que o $(\text{PhSe})_2$ demonstrou efeitos neurotóxicos quando administrado pela via oral em ratos jovens. Esses efeitos foram caracterizados pelo aparecimento de convulsões e isto, pelo menos em parte, pode estar associado ao estresse oxidativo.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos inferir o seguinte:

⇒ O $(\text{PhSe})_2$, administrado de forma aguda, pela via oral, demonstrou ser tóxico em ratos jovens;

⇒ O $(\text{PhSe})_2$, administrado pela via oral, causou convulsão em ratos jovens de uma maneira dose dependente;

⇒ O estresse oxidativo está relacionado, pelo menos em parte com as convulsões induzidas por $(\text{PhSe})_2$.

7. PERSPECTIVAS

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

⇒ Verificar o possível envolvimento do sistema glutamatérgico no processo convulsivo induzido por disseleneto de difenila;

⇒ Verificar o possível envolvimento do sistema GABAérgico no processo convulsivo induzido por disseleneto de difenila;

⇒ Identificar o(s) possível(is) metabólito(s) responsáveis pela convulsão induzida por disseleneto de difenila, uma vez que estudos prévios demonstraram que seu efeito neurotóxico depende da via de administração e possível metabolismo hepático.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Molecular Biology of the cell**. 3^a ed, New York & London: Garland Publishing, 1994.

ALEXI, T., HUGHES, P. E., FAULL, R. L. M., WILLIAMS, C. E. 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration. **Neuro Report**, 9, R57-R64, 1998.

AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the neurodegenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90, 7915-7922, 1993.

ARNAIZ, S.L., TRAVACIO, M., LLESUY, S., ARNAIZ, G. Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. **Neurochem. Res.**, 23, 1477-1483, 1998.

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

BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., WONDRAČEK, D.C., PEROTTONI, J., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chem. Biol. Interact.**, 163, 230-238, 2006

BASHKATOVA, V., NARKEVICH, V., VITSKOVA, G., VANIN, A. The influence of anticonvulsivant drugs on nitric oxide levels and lipid peroxidation in the rat brain

during penthylenetetrazole-induced epileptiform model seizures. **Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 27, 487-492, 2003.

BEHNE, D., KYRIAKOPOULOS, A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 173, 1143-1149, 1990.

BENI, G., MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? **Neurobiol. Aging**, 16, 661-674, 1995.

BERG, M., BRUHN, T., FRANDBSEN, A., SCHOUSBOE, A., DIEMER, N.H. Kainic acid-induced seizures and brain damage in the rat: role of calcium homeostasis. **J. Neurosci. Res.**, 40, 641-646, 1995.

BIELSKI, B.H., ARUDI, R.L., SUTHERLAND, M.W. A study of the reactivity of HO₂-O⁻ with unsaturated fatty acids. **Jour. of Biol. Chem.**, 258, 4759-4761, 1983.

BITTIGAU, P., SIFRINGER, M., IKONOMIDOU, C. Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 993, 103-114, 2003.

BOLZAN, R.C., FOLMER, V., FARINA, M., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T., EMANUELLI, T. Aminolevulinic acid dehydratase inhibition by phenyl selenoacetilene: effects of reaction with hydrogen peroxide. **Pharmacol. Toxicol.**, 90, 214-219, 2002.

BORGES, L.P., BORGES, V.C., MORO, A.V., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, 210, 1-8, 2005.

BORGES, V.C., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats. **Toxicology**, 215, 191-197, 2005.

BRAGA, A.L., SILVEIRA, C.C., ZENI, G., SEVERO, W.A., STEFANI, H.A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J. Chem. Res.**, 206-207, 1996.

COMASSETO, J.V. Vinylic selenides. **J. Organomet. Chem.**, 253, 131-181, 1983.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY, 1981. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, 22, 489-501, 1981.

COOPER, J.R., BLOOM, F.E., ROTH, R.H. (eds) Amino acid transmitters In: **The biochemical basis of neuropharmacology**. 7^a Ed. Oxford University Press, New York, 127-193, 1996.

COTMANN, C.W., KAHLE, J.S., MILLER, S.E., ULAS, J., BRIDGES, R.J. Excitatory amino acid neurotransmission. **Psicopharmacology: The Fourth Generation of Progress**, Floyd E, Bloom and David J. Kupfer, eds. Raven Press, New York, 1995.

COWAN, L.D. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment. Retard.* **Dev Disabil. Res. Rev.**, 8, 171-181, 2002.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, 65, 1-105, 2000.

DAWSON, V., L., DAWSON, T. M. Free radicals and neuronal cell death. **Cell Death and Differentiation**, 3, 71-78, 1996.

MELLO, C.F., BEGNINI, J., JIMÉNEZ-BERNAL, R.E., RUBIN, M.A., de BASTIANI, J., da COSTA, Jr., WAJNER, M. Itrastriatal methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Res.**, 721, 120-125, 1996.

ELGER, C.E., HELMSTAEDTER, C., KURTHEN, M. Chronic epilepsy and cognition. **Lancet (Neurol)**., 3, 663-672, 2004.

EMANUELLI, T., PAGEL, F.W., ALVES, L.B., REGNER, A., SOUZA, D.O. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. **Neurochem. Int.**, 35, 213-218, 2001.

EMANUELLI, T., PAGEL, F.W., PORCIÚNCULA, L.O., SOUZA, D.O. Effects of 5-aminolevulinic acid in the glutamatergic neurotransmission. **Neurochem. Int.**, 42, 115-121, 2003.

ENGELBORGHES, R.S., D'HOOGHE, R.P.P., DE DEYN, P.P. Pathophysiology of epilepsy. **Acta Neurol. Belg.**, 100, 201-213, 2000.

ERAKOVIC, V., ZUPAN, G., VARLJEN, J., JA, J., SIMONIC, A. Altered activities of rat brain metabolic enzymes by pentylenetetrazol kindling and pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res.**, 43, 165-173, 2001.

FARINA, M., FOLMER, V., BOLZAN, R.C., ANDRADE, L.H., ZENI, G., BRAGA, A.L., ROCHA, J.B.T. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicol. Lett.**, 119, 27-37, 2001.

FIGHERA, M.R., QUEIROZ, C.M., STRACKE, M.P, NIN BAUER, M.C., GONZALES-RODRIGUES, L.L., FRUSSA-FILHO, R., WAJNER, M., De mello, c.f. Ascorbid

acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. **Neuroreport**, 10, 2039-2043, 1999.

FIGHERA, M.R., BONINI, J.S., OLIVEIRA, T.G., FRUSSA-FILHO, R., ROCHA, J.B.T., DUTRA-FILHO, M.A, MELLO, C.F. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, 35, 465-473, 2003.

FIGHERA, M.R., ROYES, L.F.F., FURIAN, A.F., OLIVEIRA, M.S., FIORENZA, N.G., FRUSSA-FILHO, R., PETRY, J.C., COELHO, R.C., MELLO, C.F. GM1 ganglioside prevent seizures, Na⁺, k⁺ ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. **Neurobiology of Disease**., 22, 611-623, 2006.

FLOHÉ, L., GUNZLER, W.A., SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. **FEBS Lett.**, 32, 132-134, 1973.

FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB. J.**, 4, 2587-2597, 1990.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J. Neurochemistry**, 42, 1-11, 1984.

FURIAN, A.F., FIGHERA, M.R., OLIVEIRA, M.S., FERREIRA, A.P.O., FIORENZA, N.G., MYSKIW, J.C., PETRY, J.C., COELHO, R.C., MELLO, C.F., ROYES, L.F.F. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. **Neurochemistry International**, 50, 164-171, 2007.

- GIANNI, P., JAN, K.J., DOUGLAS, M.J., STUART, P.M., TARNOPOLSKY, M.A. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. **Experimental Gerontology**, 39, 1391-1400, 2004.
- GHISLENI, G., PORCIÚNCULA, L.O., CIMAROSTI, H., ROCHA, J.B.T., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Research**, 986, 196-199, 2003.
- GLUCK, M.R., JAYATILLEKE, E., SHAW, S., ROWAN, J.A., HAROUTUNIAN, A. CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. **Epilepsy Res.**, 39, 63-71, 2000.
- GRUNEWALD, R. Childhood seizures and their consequences for the hippocampus. **Brain**. 125, 1935-1936, 2002.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, 59, 1609–1623, 1992.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**, 2^a ed, New York: Clarendon Press, 1989.
- HEADLEY, P.M. and GRILLNER, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends pharmacol. Sci.**, 11, 205-211, 1990.
- HOLMES, G.L. Effects of seizures on brain development: lessons from the laboratory. **Pediatr Neurol.**, 33, 1-11, 2005.
- HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu. Rev. Biochem.**, 54, 237-271, 1985.

JACQUES-SILVA, M.C., NOGUEIRA, C.W., BROCH, L.C., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. **Pharmacol. Toxicol.**, 88, 119-125, 2001.

JOHNSTON, M.V. Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. **Brain Dev.**, 17, 301-306, 1995.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**, New York: Oxford University Press, 1997.

KABUTO, H., OGAWA, N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. **Epilepsia**, 39, 237-243, 1998.

KANEKO, K., ITOH, K., BERLINER, L.J., MIYASAKA, K., FUJII, H. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. **Magn, Redon. Med.**, 48, 1051-1056, 2002.

KANDA, T., ENGMAN, L., COTGREAVE, I.A., POWIS, G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **J. Org. Chem.**, 64, 8161-8169, 1999.

KAPPAS, A., SASSA, S., GALBRAITH, R.A., NORDMANN, Y. The porphyrias. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.I., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), **The Metabolic Bases of Inherited**, 7th Edition, McGraw Hill, New York, pp. 2103-2160, 1995.

KHAZIPOV, R., KHALILOV, I., TYZIO, R., MOROZOVA, E., BEN-ARI, Y., HOLMES, G.L. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. **Eur. J. Neurosci.**, 19, 590-600, 2004.

- KLAYMAN, D.L., GÜNTHER, W.H. (eds.). Organic selenium compounds: their chemistry and biology. New York: **John Wiley and sons**, 68-157, 1973.
- KOWALTOWSKI, A., CASTILHO, R. F., VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, 495, 12-15, 2001.
- LIANG, L.P., HO, Y.S., PANTEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, 101, 563-570, 2000.
- LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **Eur. J. Pharmacol.**, 342, 1-13, 1997.
- MACIEL, E.N., BOLZAN, R.C., BRAGA, A.L., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, 14, 310-319, 2000.
- MACIEL, E.N., FLORES, E.M., ROCHA, J.B.T., FOLMER, V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney and brain of mice. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 70, 470-476, 2003.
- MARISCO, P., RIBEIRO, M.C, BONINI, J.S., LIMA, T.T., MANO, K.C., BRENER, G.M., DUTRA-FILHO, C.S., MELLO, C.F. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. **Exp. Neurol.**, 182, 455-460, 2003.
- MEOTTI, F.C., CORRALO, V.S., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**, 143, 9-16, 2003.

- MEOTTI, F.C., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W.
Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environm. Res.**, 94, 276-282, 2004.
- MEHTA, A.K. and TICKU, M.K. An update on GABA_A receptors. **Brain Res. Rev.**, 29, 196-217, 1999.
- MELDRUM, B.S., AKBAR, M.T., CHAPMAN, A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Res.**, 36, 189-204, 1999.
- MORETTO, M.B., ROSSATO, J.I., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T.
Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of ⁴⁵Ca²⁺ influx into brain synaptosomes is voltage-dependent. **J. Biochem. Mol. Toxic.**, 17, 154-160, 2003.
- NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G., CAVALHEIRO, E.A, FERREIRA, E.C., ABDALLA, D.S.P., AMADO, D., BELLISIMO, M.I. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Res.**, 46, 121-128, 2001.
- NAVARRO-ALARCÓN, M., LÓPEZ-MARTINEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Tot. Environ.**, 249, 347-371, 2000.
- NOGUEIRA, C, W., ROTTA, L. N., PERRY, M. L., SOUZA, D. O., ROCHA, J. B. T.
Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rats glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Res.**, 906, 157-163, 2001.
- NOGUEIRA, C.W., QUINHONES, E.B., JUNG., E.A.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T.
Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm. Res.**, 52, 56-63, 2003a.

- NOGUEIRA, C.W., MEOTTI, F.C., CURTE, E., PILISSÃO, C.; ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, 183, 29-37, 2003b.
- NOGUEIRA, C.W., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, 191, 169-178, 2003c.
- NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.**, 104, 6255–6286. 2004.
- OLNEY, J.W. Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.**, 27, 375-384, 1981.
- OLIVEIRA, M.S., FURIAN, A.F., ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R., MYSKIW, J.C., FIORENZA, N.G., MELLO, C.A. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience**, 128, 721-728, 2004.
- OLSEN, R.W. and DeLOREY, T.M. GABA and glycine. In: **Basic Neurochemistry**, eds: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K. and Uhler, M.D. Lippincott-Raven, new York, pp 335-346, 1999.
- OTTERSEN, O.P. and STORM-MATHISEN, J. Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In: **Handbook of Chemical Neuroanatomy**, Björklund, A., Hökfelt, T., Kuhar, M.J. (eds.). Elsevier, Amsterdam. Part II, 3, 141-246, 1984.
- PARNHAM, M.J. AND GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog. Drug Res.**, 36, 10-47, 1991.

- PATSOUKIS, N., ZERVOUDAKIS, G., PANAGOPOULOS, N.T., GEORGIU, C.D., ANGELATOU, F., MATSOKIS, N.A. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. **Neurosci. Lett.**, 357, 83-86, 2004.
- PAUL, S.M. GABA and glycine. In: **Psychopharmacology: The fourth generation of progress**, Bloom, F.E., and Kupfer, D.J (eds.). Raven Press, New York, pp 87-94, 1995.
- PAULMIER, C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), **Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis**, First ed. Pergamon Press, Oxford, England, p. 25-51, 1986.
- PIN, J.P. and DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and function. **Neuropharmacology**, 34, 1-26, 1995.
- RAOL, Y.H., LYNCH, D.R., BROOKS-KAYAL, A.R. Role of excitatory aminoacids in developmental epilepsies. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, 7, 254-260, 2001.
- REITER, R., TANG, L., GARCIA, J.J., MUNOZ-HOYOS, A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Sci.**, 60, 2255-2271, 1997.
- RIBEIRO, M.C., ÁVILA, D.S., SCHNEIDER, C.Y.M., HERMES, F.S., FURIAN, A.F., OLIVEIRA, M.S., RUBIN, M.A, LEHMANN, M., KRIEGLSTEIN, J., MELLO, C.F. α -Tocoferol protects against pentylenetetrazol and methylmalonate-induced convulsions. **Epilepsy Res.**, 66, 185-194, 2005.
- ROSSATO, J.I., KETZER, L.A., CENTURIÃO, F.B., SILVA, S.J.N., LUDTKE, D.S., ZENI, G., BRAGA, A.L., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B.T. Antioxidant properties of

new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochem. Res.**, 27, 297-303, 2002.

ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R., FURIAN, A.F., OLIVEIRA, M.S., FIORENZA, N.G., MYSKIW, J.C., FRUSSA-FILHO, R., MELLO, C.F. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of metate. **Neurosci. Lett.**, 376(2), 116-120, 2005.

ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R., FURIAN, A.F., OLIVEIRA, M.S., FIORENZA, N.G., PETRY, J.C., COELHO, R.C., MELLO, C.F. The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: An eletroencephalographic and neurochemical study. **Epilepsy Research**, 73, 228-237, 2007.

SAVEGNAGO, L., TREVISAN, M., ALVES, D., ROCHA J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Pharmacol.**, 21, 86–92, 2006.

SAVEGNAGO, L., PINTO, L.G., JESSE, C.R., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, 555, 129-38, 2007.

SCHEUER, M.L., PEDLEY, T.A. The evaluation and treatment of seizures. **N. Engl. J. Med.**, 323, 1468-1474, 1990.

SCHWARTZ, K. AND FOLTZ, C.M. Selenium as a integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.**, 79, 200-214, 1957.

- SPALLHOLZ, J. E., SHRIVER, J.E, REID, T.W. Dimethyldiselenide and methylselenide acid generates superoxide in an in vitro chemiluminescence assay in the presence of glutathione: implications for the anticarcinogenic activity of l-selenomethionine and L-Se-methylselenocysteine. **Nutr. Cancer**, 40, 34-41, 2001.
- STADTMAN, T.C. Selenium-dependent enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, 49, 93-110, 1980.
- SUTULA, T., PITKÄNEN, A. Do seizures damage the brain? **Prog Brain Res.**, 135, 1-520, 2002.
- SUTULA, T., HAGEN, J., PITKÄNEN, A. Do epileptic seizures damage the brain? **Curr Opin Neurol.**, 16, 189-195, 2003.
- TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**, 3^a ed, London: Taylor & Francis, 2000.
- TREIMAN, D. M. Electroclinical features of status epilepticus. **J Clin. Neurophysiol.**, 12, 343-362, 1995.
- URSINI, F., HEIM, S., KIESS, M., MAIORINO, M., ROVERI, A., WISSING, J., FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, 285, 1393-1396, 1990.
- VALLANO, M.L. Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit. Rev. Neurobiology**, 12, 177-204, 1998.

- VASILETS, L.A., SCHWARZ, W. Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺, K⁺-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta**, 1154, 201-222, 1993.
- VINGERHOETS, G. Cognitive effects of seizures. **Seizure**, 15, 221-226, 2006.
- WALKER, M.C., FISHER, A. Mechanisms of antiepileptic drug action. In: Shotvon, S., Perucca, E., Fish, D., Dodson E, editors. The treatment of epilepsy. **Oxford: Blackwell**, 96-119, 2004.
- WEBER, G. F. Final common pathways in the neurodegenerative diseases: regulatory role of the glutathione cycle. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23, 1079-1089, 1999.
- WYSE, A.T.S., STRECK, E.L., BARROS, S.V.T., BRUSQUE, A.M., ZUGNO, A.I., WAJNER, M. Methylmalonate administration decrease Na⁺, k⁺ ATPase activity cerebral cortex of rats. **Neuroreport**, 11, 1010-1014, 2000.
- ZENI, G., PANATIERI, R.B., LISSNER, E., MENEZES, P.H., BRAGA, A.L., STEFANI, H.A. Synthesis of polyacetylenic acids isolated from *Heisteria Acuminata*. **Org. Lett.**, 6, 819-821, 2001.

