

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

**EFEITOS DO EBSELEN E ORGANOCALCOGENETOS
SOBRE A EXCITOTOXICIDADE INDUZIDA POR
GLUTAMATO EM RETINA EMBRIONÁRIA DE PINTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Bossemeyer Centurião

Santa Maria, RS, Brasil

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS

EFEITOS DO EBSELEN E ORGANOCALCOGENETOS
SOBRE A EXCITOTOXICIDADE INDUZIDA POR
GLUTAMATO EM RETINA EMBRIONÁRIA DE PINTO

por

Fernanda Bossemeyer Centurião

Orientadora: Prof^a Dr^a. Tatiana Emanuelli
Co-orientador: Prof^o Dr. João Batista Teixeira da Rocha

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

Santa Maria, RS, Brasil

2004

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

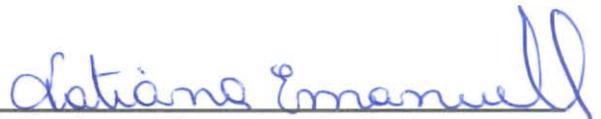
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO EBSELEN E ORGANOCALCOGENETOS SOBRE A
EXCITOTOXICIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO EM RETINA
EMBRIONÁRIA DE PINTO**

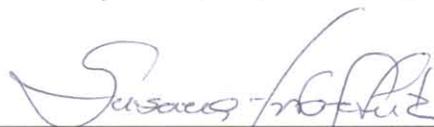
elaborada por
Fernanda Bossemeyer Centurião

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

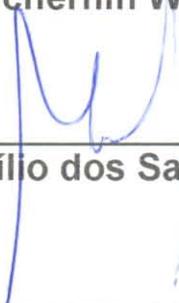
COMISSÃO EXAMINADORA:



Tatiana Emanuelli, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)



Susana Tchernin Wofchuck, Dr^a. (UFRGS)



Marcos Emílio dos Santos Frizzo, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 20 de agosto de 2004

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
APRESENTAÇÃO	IX
I-INTRODUÇÃO	01
II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
II.1-Glutamato	08
II.1.1-Metabolismo	08
II.1.2-Receptores Glutamatérgicos	08
II.1.3-Excitotoxicidade	12
II.1.4-Papel do Ca ²⁺ na excitotoxicidade	15
II.1.4-A relação entre excitotoxicidade e estresse oxidativo	20
II.2-Retina	22
II.3-Organocalcogênios	25
II.3.1-Selênio	26
II.3.1.1-Importância fisiológica	26
II.3.1.2-Ebselen	29
II. 3.2-Diorganocalcogênios	32
II.3.3-Telúrio	33
III-ARTIGO CIENTÍFICO	36
IV-DISCUSSÃO	56
V-CONCLUSÕES	60
VI-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

Dedico este trabalho aos meus avós Ilca e Ronald,
responsáveis por minha formação e caráter.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marion e Gerson, pelo amor e principalmente por serem acima de tudo os meus melhores amigos.

À minha família, Pati, Béda e Júlia, por serem meu suporte e por estarem sempre perto do meu coração.

Ao Prof^o João, por ter me apresentado o mundo da ciência, dando-me exemplo de dedicação e esforço; e força para encarar os desafios futuros da minha vida profissional.

À Prof^a Tatiana Emanuelli, minha orientadora, pela dedicação e confiança depositada em mim durante este trabalho.

À Prof^a Cristina e ao Prof^o Gilson, que estiveram sempre presentes na minha vida ao longo destes quatro anos de “bioquímica”. A vocês dois, devo especialmente dizer: muito obrigado.

Ao Jorge, por fazer minha mãe feliz.

À Lori, por reconduzir meu pai à vida.

A Cris, que dividiu comigo grande parte dos experimentos deste trabalho, e à Liz e à Ísis, por terem trabalhado comigo no decorrer destes anos.

Aos meus colegas de laboratório Diogo, Vanderlei, Verônica, Néia, Juliano, Robson, Rose, Júlio, Marilise, Vanessa, Dani, que com suas presenças tornaram meus dias de trabalho tão especiais.

Aos colegas que foram embora antes de mim, mas que são de igual importância: Luísa, Janine, Vivi, Rodrigo, Félix, Carol e Fernando.

Aos colegas do Lab. da Prof^a Cristina, especialmente Nilda, Eluza, Fran, Vanessa, Lucielli, Alexandre, Tati, Fabrício, Edu, Dionéia, Márcio e Carlos Eduardo, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos “orgânicos” Schumacher, Rodrigo, Jesus, Angélica, Joel, Fabrício, Amarelo, Diogo, Paulo, Jú, Jasquer pela parceria no trabalho e na “cerveja”.

Às minhas amigas do coração Keka, Ana Lúcia, Paula Carvalho, Márcia, Ângela e Paula Macedo, por serem as melhores amigas que alguém poderia ter.

Ao pessoal do setor de Avicultura da UFSM, especialmente Seu Alfredo e Bete, fundamentais para a realização deste trabalho.

A CAPES, por tornar este trabalho financeiramente viável.

Aos colegas, professores e funcionários de Setor de Bioquímica da UFSM, por estes anos de convívio.

RESUMO

A excitotoxicidade refere-se ao processo neurodegenerativo iniciado pela ativação excessiva de receptores do neurotransmissor glutamato. Este processo é um dos mais extensivamente estudados processos de morte celular neuronal, e tem uma participação importante em muitas doenças do sistema nervoso central (SNC), incluindo isquemia, trauma e desordens neurodegenerativas. A morte celular excitotóxica parece envolver eventos patofisiológicos como influxo excessivo de cálcio e liberação deste íon de organelas intracelulares, produção de radicais de oxigênio e morte celular programada (apoptose). Neste trabalho, avaliamos os efeitos de três diorganil calcogenetos simples (disseleneto de difenila, ditelureto de difenila e telureto de difenila) e do ebselen sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por glutamato em retinas embrionárias de pintos, assim como seus efeitos sobre o dano neuronal excitotóxico nas retinas. Nenhum dos compostos testados interferiu com o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ basal. Os compostos disseleneto de difenila e ditelureto de difenila não apresentaram nenhum efeito sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado pelo glutamato. O telureto de difenila (100-400 μM) reduziu o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por glutamato, e o ebselen bloqueou (100-400 μM) o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por glutamato ($P < 0,01$) nas retinas isoladas de pinto. A avaliação do dano neuronal foi realizada espectrofotometricamente pela quantificação de MTT (brometo 3(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) celularmente reduzido. O ebselen não teve efeito sobre a redução de MTT quando foi co-incubado com o glutamato. Contudo, quando o ebselen (100-400 μM) foi co-incubado com o glutamato, e permaneceu no meio de incubação até a avaliação do MTT (24 após o início da incubação), foi capaz de proteger as retinas contra o decréscimo na redução do MTT induzido pelo glutamato. Estes resultados indicam que apesar da sua capacidade de interagir com canais de Ca^{2+} , outros mecanismos parecem estar envolvidos na neuroproteção exercida pelo ebselen neste trabalho, possivelmente suas propriedades antioxidantes.

ABSTRACT

Excitotoxicity refers to the neurodegenerative process initiated by excessive activation of receptors for the neurotransmitter glutamate. This process is one of the most extensively studied processes of neuronal cell death, and plays an important role in many central nervous system (CNS) diseases, including CNS ischemia, trauma, and neurodegenerative disorders. Such excitotoxic cell death seems to involve excessive calcium influx and release from internal organelles, oxyradical production, apoptosis cascades. In this study, we evaluated the effects of three simple diorganyl chalcogenides (diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and diphenyl telluride) and ebselen on glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal cells, as well as their effects on the excitotoxic retina neuronal damage. None of the compounds tested interfered with basal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride had no effects on glutamate-stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx. Diphenyl telluride (100-400 μM) decreased the glutamate-stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and ebselen (100-400 μM) blocked the glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick retinal explants ($P < 0.01$). The assessment of neuronal injury was made spectrophotometrically by quantification of cellularly reduced MTT (3(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Ebselen had no effects on retinal MTT reduction when co-incubated with glutamate. However, when ebselen (100 and 400 μM) was co-incubated with glutamate and remained in the incubation media until MTT evaluation (24 h after the beginning of incubation), it protected retinas against the decrease in MTT reduction induced by glutamate. These data indicate that besides its capacity to interact with Ca^{2+} channels, other mechanisms are involved in the neuroprotection afforded by ebselen in this work; possibly its antioxidant properties.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1 – Classificação dos subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos encontrados no SNC de mamíferos. 11

Quadro 2 - Classificação e características dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos encontrados no SNC de mamíferos. 12

Quadro 3 – Padrões de excitotoxicidade em neurônios corticais. 14

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Estrutura do ebselen.	4
Figura 2 – Estrutura do disseleneto de difenila.	5
Figura 3 – Estrutura do ditelureto de difenila.	5
Figura 4 – Estrutura do telureto de difenila.	5

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 5 - Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos.	9
Figura 6 - Estrutura geral do olho.	23
Figura 7 - Anatomia funcional da retina.	24
Figura 8 - Reação enzimática cíclica da glutathione peroxidase.	30

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura A.1 - $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal cells as a function of glutamate concentration.	51
Figura A. 2 - Influence of ebselen on basal and glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal cells.	52
Figura A. 3 - Influence of diphenyl telluride on basal and glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal cells.	52
Figura A. 4 - Influence of diphenyl diselenide on basal and glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal cells.	53
Figura A. 5 - Influence of diphenyl ditelluride on basal and glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal cells.	53
Figura A. 6 - Effect of glutamate on neuronal injury in isolated chick embryo retina.	54
Figura A. 7 - Effect of ebselen on neuronal injury in isolated chick embryo retina.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA**- ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- AMP_c**- adenosina 3'-5'-monofosfato cíclica
- 2-AP5**- ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
- 2-AP7**- ácido D-2-amino-7-fosfonopentanóico
- APDC**- 2R, 4R-4-aminopirrolidina-2,4-dicarboxilato
- ATP**- adenosina trifosfato
- [Ca²⁺]_i** – concentração intracelular de cálcio
- CGS19755**- ácido [[[\pm]-2-carboxipiperidin-4-il]metil-4-il]-fosfônico
- CNQX**- 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
- CPP**- ácido[3-[\pm]-carboxipiperazina-4-il]-fosfônico
- DCG-IV**- (2S, 1'R, 2'R, 3'R)-2-(2,3-dicarboxiciclopropil) glicina
- DMSO**- dimetilsulfóxido
- DNQX**- 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
- EROs**- espécies reativas de oxigênio
- GABA**- ácido γ -aminobutírico
- GLT-1**- transportador de glutamato
- GSH**- glutationa
- GSSG**- glutationa oxidada
- I_{CA}**- correntes de cálcio
- I_K**- correntes de potássio
- IP₃**- inositol trifosfato
- KA**- ácido caínico
- KBSS**- solução salina do tipo Krebs
- mGLuRs**- receptores glutamatérgicos ionotrópicos
- MK-801**-(+)-5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina
- MTT**- brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium
- NMDA**- N-metil-D-aspartato
- NO**- Óxido nítrico
- PHGpx**- enzima fosfolípido hidroperóxido glutationa peroxidase
- SNC**- sistema nervoso central

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta os resultados sob forma de artigo submetido à publicação. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no artigo e representam a íntegra deste trabalho.

O capítulo IV. DISCUSSÃO apresenta comentários gerais a respeito dos resultados obtidos neste trabalho.

No capítulo V. CONCLUSÕES são apresentadas às conclusões do manuscrito.

No capítulo VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS constam apenas às citações que aparecem nos capítulos Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I-INTRODUÇÃO

As principais vias excitatórias do sistema nervoso central (SNC) utilizam glutamato como neurotransmissor (Ozawa et al, 1998; Meldrum et al., 1999). O glutamato pode ser encontrado, no cérebro de mamíferos, em altas concentrações e participa de funções metabólicas idênticas às exercidas em outros tecidos (Meldrum et al., 1999). Está envolvido em uma variedade de processos fisiológicos, tais como aprendizado, memória e formação de redes neuronais durante o desenvolvimento (Ozawa et al, 1998; Simeone et al., 2004).

O glutamato, como mediador de sinapses excitatórias, exerce papel importante em funções essenciais do SNC; entretanto, uma ativação excessiva do sistema glutamatérgico pode provocar dano ou até mesmo morte neuronal (Olney, 1978; Lipton & Rosenberg, 1994; Price, 1999). A excitotoxicidade é um processo neurodegenerativo, iniciado devido a uma excessiva ativação de receptores do neurotransmissor glutamato (Olney, 1978). Existem muitas evidências sugerindo que mecanismos excitotóxicos estão envolvidos na neuropatologia do choque isquêmico, epilepsia e outras desordens psiquiátricas e neurodegenerativas (Lipton & Rosenberg, 1994; Sattler & Tymianski, 2001).

Os efeitos tóxicos do glutamato na retina foram descritos em 1957 (Lucas & Newhouse, 1957), e desde então muitos estudos indicam que um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} nas células neuronais pode causar a morte destas células (Ferreira et al., 1996). Condições que provocam a liberação de glutamato endógeno, aumentam a concentração intracelular de Ca^{2+} , o que ativa um grande número de processos dependentes de Ca^{2+} causando dano neuronal. Estes eventos levam a um aumento adicional na liberação de glutamato e redução na sua captação (Ferreira et al., 1996). Os mecanismos responsáveis pela excitotoxicidade ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, além do já citado aumento de Ca^{2+} intracelular, a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica nas membranas celulares, parece ter papel importante (Choi, 1992; Price, 1999; Mattson, 2003).

Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados de acordo com estudos farmacológicos em dois grandes grupos: receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Dichter & Wilcox, 1997; Ozawa et al., 1998, Simeone et al., 2004). Os receptores ionotrópicos são canais iônicos que permeiam cátions através da membrana neuronal, e podem ser subdivididos em N-metil-D-aspartato (NMDA);

ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e cainato (KA), com base na sua sensibilidade a agonistas específicos. Os receptores metabotrópicos estão associados a sistemas de segundos mensageiros intracelulares (Conn & Pinn, 1997; Conn, 2003; Simeone et al., 2004).

O modelo de retina embriônica isolada de pinto é muito sensível a todos os agonistas glutamatérgicos, e moderadamente mais sensível ao cainato e AMPA (agonistas não-NMDA), que ao NMDA. Segundo Romano e colaboradores (1995), dois tipos de morte celular excitotóxica já foram descritas neste modelo: morte celular aguda e retardada (ou tardia). Estes dois tipos de degeneração podem ser distinguidos pelo tempo de exposição ao agonista glutamatérgico e dependência iônica (Coyle & Puttfarcken, 1993). A neurotoxicidade aguda é caracterizada pelo inchaço neuronal na presença do agonista, ocasionando a lise osmótica das células neuronais; e pode ser prevenida pela eliminação de Na^+ e Cl^- do meio de cultura. Estes dois íons são responsáveis pelo influxo massivo de água que ocorre quando os canais catiônicos acoplados aos receptores do glutamato são abertos. Já a neurodegeneração retardada (ou tardia) é dependente de Ca^{2+} e manifesta-se várias horas após exposição breve a altas concentrações de agonista ou exposição prolongada a baixas concentrações de agonista.

O processo excitotóxico têm sido extensivamente estudado tanto em sistemas neuronais isolados, quanto intactos. A necessidade de um modelo experimental para o estudo da ativação de receptores de aminoácidos excitatórios (como o glutamato), assim como para o desenvolvimento e avaliação de possíveis antagonistas com potencial neuroprotetor, propiciou o uso da preparação de retina embrionária de pinto *ex vivo*. Este modelo caracteriza-se pela sensibilidade a concentrações anormais de glutamato extracelular e seus análogos (Burgos et al., 2000). Por estas razões, e também devido ao fato de constituir um método simples e barato, este foi o modelo experimental de escolha para avaliar a habilidade dos compostos organocalcogênios em antagonizar as ações tóxicas do glutamato.

Desde a década de 30, compostos organocalcogênios têm sido alvo de interesse de estudo, devido às suas aplicações sintéticas na química orgânica e suas propriedades biológicas (Comasseto, 1983; Parnham & Graf, 1991; Kanda et al., 1999). Existe uma tentativa crescente de desenvolvimento de compostos organocalcogênios que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas

(Parnham & Graf, 1991), e organocalcogênios com propriedades antioxidantes, sob este ponto de vista, têm chamado bastante atenção.

A glutathiona peroxidase, primeira selenoproteína caracterizada no ano de 1973, constitui um dos principais sistemas antioxidantes do organismo. Juntamente com as enzimas catalase, superóxido dismutase e antioxidantes não-enzimáticos, como as vitaminas E e C, a glutathiona peroxidase atua eliminando espécies reativas de oxigênio do organismo (Rossato et al., . A eficiente remoção destas espécies mantém a integridade das membranas, reduz o risco de câncer, reduz o processo de envelhecimento e doenças degenerativas (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000). Com a descoberta do papel do selênio no centro ativo da enzima glutathiona peroxidase (Rotruck et al., 1981) e com o aumento do entendimento do papel fisiológico do selênio na regulação do dano oxidativo (Cadenas & Sies, 1985; Ursini & Bindoli, 1987) houve um aumento no interesse pela síntese de compostos contendo selênio que possuam propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham & Graf, 1991).

O ebselen ou PZ 51 (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona) (Figura 1), um composto orgânico de selênio, exibe atividade mimética da enzima glutathiona peroxidase. O Ebselen tem sido testado como antioxidante (Rossato et al., 2002b), como neuroprotetor em cultura de neurônios (Porciúncula et al., 2003), no tratamento clínico de pacientes com isquemia aguda (Yamaguchi et al., 1998; Kondoh et al., 1999) e como antiinflamatório (Parnham & Graf, 1991). Devido aos diversos indicativos clínicos de redução dos danos cerebrais após aneurisma, este composto é apontado como promissor agente neuroprotetor (Saito et al., 1998).

Estudos recentes têm demonstrado que o disseleneto de difenila (Figura 2) apresenta maior atividade do tipo tiol peroxidase, quando comparado ao ebselen (Engman et al., 1992), o que poderá motivar o uso terapêutico deste composto.

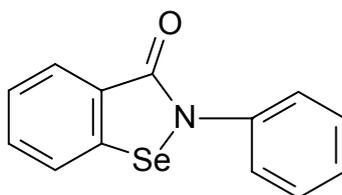


Figura 1- Estrutura do ebselen

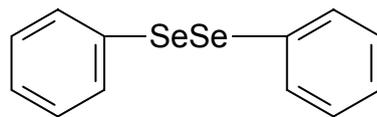


Figura 2 – Estrutura do disseleneto de difenila

Assim como o Ebselen, diorgano diteluretos e diorgano teluretos, tais como o ditelureto de difenila e o telureto de difenila (Figuras 3 e 4), podem apresentar atividade do tipo tiol peroxidase (Engman et al., 1992; Kanda et al., 1999) o que poderá ocasionar o seu emprego farmacológico.

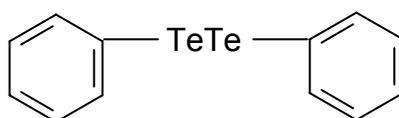


Figura 3 – Estrutura do ditelureto de difenila

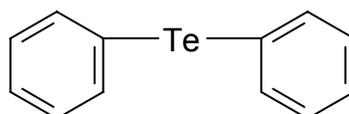


Figura 4 – Estrutura do telureto de difenila

Assim, o objetivo geral deste trabalho é avaliar os efeitos de compostos orgânicos de selênio e telúrio sobre a excitotoxicidade induzida pelo glutamato, tendo como principal parâmetro bioquímico de neurotoxicidade o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, em retinas isoladas de pinto.

Os objetivos específicos são:

1. Analisar as alterações induzidas pelo glutamato no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em retinas isoladas de pinto.
2. Avaliar os efeitos de compostos orgânicos de selênio (ebselen e disseleneto de difenila) sobre as alterações induzidas pelo glutamato no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em retinas isoladas de pinto.
3. Avaliar os efeitos de compostos orgânicos de telúrio (ditelureto de difenila e telureto de difenila) sobre as alterações induzidas pelo glutamato no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em retinas isoladas de pinto.

4. Analisar os efeitos tóxicos retardados (ou tardios) do glutamato em retinas isoladas de pinto, através da avaliação da injúria neuronal pelo método colorimétrico do MTT.
5. Avaliar os efeitos do ebselen sobre a toxicidade retardada (ou tardia) do glutamato em retinas isoladas de pinto, através da avaliação da injúria neuronal pelo método colorimétrico do MTT.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1-Glutamato

II.1.1-Metabolismo no SNC

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, e como tal, possui papel fundamental na maioria das funções do sistema nervoso, incluindo o controle dos movimentos corporais, aprendizado e memória, emoções e percepção sensorial (Lee et al., 2002; Simeone et al., 2004). Por ser um aminoácido não-essencial incapaz de atravessar a barreira sangue-cérebro, o glutamato é sintetizado localmente a partir de glicose (Dingledine & McBain, 1994).

Dois processos contribuem para a síntese do glutamato nos terminais nervosos: o aminoácido pode ser formado a partir da glicose no Ciclo de Krebs e por transaminação do α -cetoglutarato, e ainda pode ser formado diretamente a partir da glutamina (Deutch & Roth, 1999). A glutamina produzida na glia é transportada para os terminais nervosos, sendo então convertida em glutamato por uma enzima glutaminase.

Dentro dos terminais nervosos, o glutamato é concentrado dentro de vesículas sinápticas por um processo dependente de Mg^{2+} e ATP (Greene & Greenamyre, 1996). O transportador vesicular do glutamato é altamente específico, não reconhecendo aminoácidos similares, tais como o aspartato. Sob condições de estímulo nervoso e conseqüente despolarização do terminal nervoso, o glutamato é liberado de maneira dependente de Ca^{2+} . Após sua liberação na fenda sináptica, o glutamato é captado pelos neurônios e glia, por um processo de alta afinidade, e dependente de Na^{2+} (Greene & Greenamyre, 1996). Dentro das células gliais, o glutamato é transaminado pela glutamina sintetase para formar glutamina, que pode se difundir até os terminais nervosos e ser novamente convertida em glutamato.

II.1.2-Receptores Glutamatérgicos

Com base em estudos farmacológicos, eletrofisiológicos e bioquímicos, os receptores glutamatérgicos podem ser divididos em dois grupos designados de receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos (Figura 5) (Nakanishi, 1992; Ozawa et al., 1998; Simeone et al., 2004). Os receptores ionotrópicos são acoplados

a canais iônicos, enquanto que os receptores metabotrópicos estão associados a proteínas G e modulam a produção de mensageiros intracelulares.

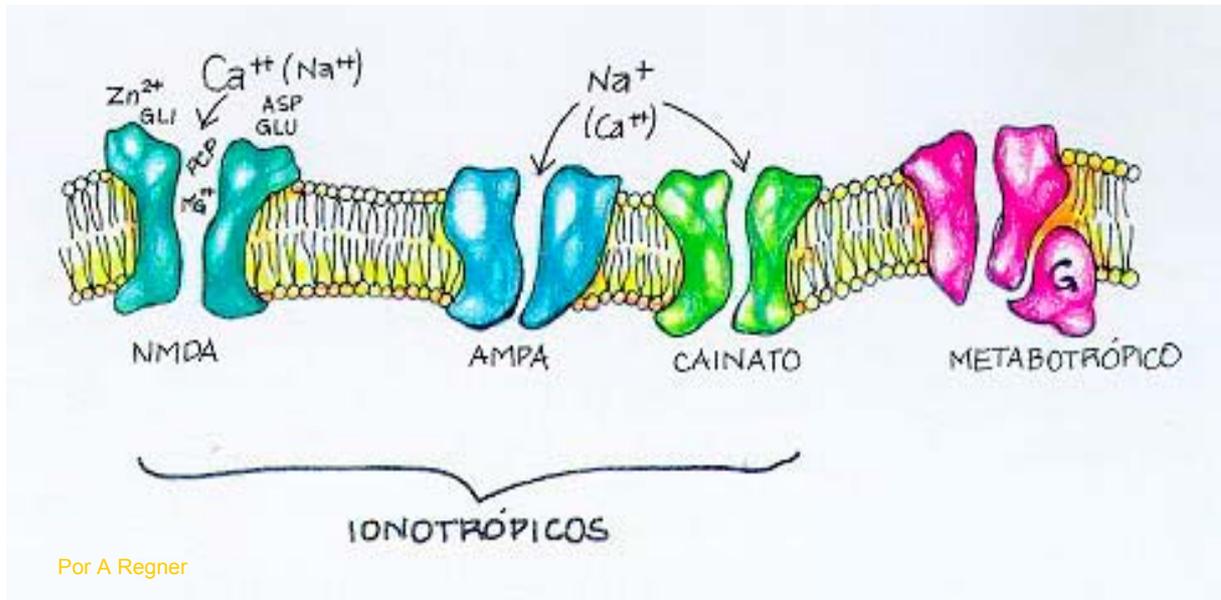


Figura 5: Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos.

Quando ativados, os receptores ionotrópicos sofrem alterações conformacionais que resultam na abertura de seus canais iônicos. A abertura dos canais, bem como o fluxo de íons pelos receptores ionotrópicos podem ser reguladas pela ligação de outras moléculas a sítios moduladores, diferentes do sítio de ligação do glutamato (Hudspith, 1997).

De acordo com suas seletividades a agonistas específicos, os receptores ionotrópicos podem ser subdivididos em *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e cainato (KA) (Nakanishi, 1992; Huettner, 2003; Simeone et al., 2004) (**Quadro 1**). Os receptores AMPA e KA são comumente chamados de não-NMDA em função da falta de agonistas ou antagonistas específicos para distinguir claramente estes receptores. Entretanto, estudos de clonagem têm demonstrado que estes são receptores distintos, podendo ser ativados pelos mesmos agonistas (Ozawa et al., 1998).

Em termos de funcionalidade, reconhece-se que os receptores AMPA são responsáveis por grande parte da neurotransmissão sináptica excitatória rápida e conduzem principalmente correntes de Na^+ por seus canais (Sommer & Seeburg,

1992; Heath & Shaw, 2002). A permeabilidade reduzida ao Ca^{2+} garante que a ativação destes receptores não inicie processos bioquímicos de longa duração dependentes de um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (Hudspith, 1997).

O cainato liga-se de maneira altamente específica e com alta afinidade a receptores identificados no gânglio sensorial, ativando canais de Na^+ rapidamente dessensibilizados (Huettner, 1990; Huettner, 2003), com cinética similar aos receptores AMPA. O cainato também se liga com menor afinidade a receptores AMPA, resultando numa ativação não-dessensibilizada e persistente destes receptores (Hudspith, 1997).

Os receptores NMDA permitem preferencialmente a entrada de Ca^{2+} por seus canais (MacDermott et al., 1986; Sattler & Tymianski, 2001) e a cinética deste receptor é muito mais lenta do que dos receptores AMPA e KA, com a abertura dos canais persistindo por várias dezenas ou centenas de milissegundos (Hudspith, 1997). O receptor NMDA é um dos receptores de neurotransmissores mais estritamente regulados (Dingledine & McBain, 1994; Ozawa, 1998), apresentando não menos do que cinco diferentes sítios de ligação para ligantes endógenos que influenciam diretamente a abertura dos canais iônicos. Estes consistem de dois sítios de reconhecimento para agonistas (para glutamato e glicina, conhecida como co-agonista dos receptores glutamatérgicos) (Kleckner & Dingledine, 1988) e um sítio regulatório para poliaminas (Rock & Macdonald, 1991) que promovem a ativação do receptor. Existem ainda sítios separados de reconhecimento para o Mg^{2+} , que atua bloqueando os canais iônicos (Nowak et al., 1984) e Zn^{2+} , que agem inibindo o fluxo iônico. Sabe-se também da existência de um sítio redox na face externa do receptor, onde grupos sulfidrílicos podem interagir com derivados do óxido nítrico (NO) modificando a função do receptor (Lei et al., 1992).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) compartilham propriedades morfológicas moleculares comuns a outros receptores metabotrópicos associados a proteínas G. Acredita-se que esses receptores possuam sete domínios *trans*-membrana com um grupamento amino-terminal extracelular e um grupamento carboxi-terminal intracelular (Meldrum, 2000). Até o momento, oito subunidades dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos foram clonadas e designadas de mGluR1 a mGluR8 (Okamoto et al., 1994; Duvoisin et al., 1995), todas possuindo diferentes distribuições anatômicas (**Quadro 2**). Os mGluRs podem ser classificados em três grupos de acordo com a homologia de aminoácidos, mecanismos de

transdução de sinal e afinidades por ligantes (Conn & Pin, 1997). Os receptores do grupo I ativam a fosfolipase C, produzindo diacilglicerol e inositol trifosfato como segundos mensageiros. Os grupos II e III são acoplados a adenilato ciclase (Meldrum, 2000). Os mGluRs estão localizados nos terminais pré e pós sinápticos e nas células gliais e sua ativação pode promover efeitos excitatórios ou inibitórios (Ozawa et al., 1998).

Quadro 1. Classificação dos subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos encontrados no SNC de mamíferos.

Subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos	Subunidades	Agonistas	Antagonistas	Características Funcionais
AMPA	GluR1	AMPA	CNQX, DNQX	Ativação de canais para
	GluR2	Quisqualato	2,3Benzodiazepinas	Na ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻
	GluR3	cainato	Barbituratos	Transmissão sináptica rápida
	GluR4	Domoato		Ativação de canais para
KA	GluR5	cainato	NS102	canais para Na ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻
	GluR6	Domoato	γD-glutamil glicina	Transmissão sináptica rápida
	GluR7			
	KA1			
	KA2			
NMDA	NR1	NMDA	2-AP5, 2-AP7	Ativação de canais para
	NR2A	Ibotenato	CPP	Na ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻
	NR2B	Quinolinato	CGS 19755	Transmissão sináptica lenta
	NR2C	Glicina	5,7-diCl-quinurinato	
	NR2D		MK-801 Cetamina	

Fonte: Adaptado de Hudspith (1997).

Quadro 2. Classificação e características dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos encontrados no SNC de mamíferos.

Grupos	Subtipos de receptores glutamatérgicos metabotrópicos	Agonistas	Antagonistas	Rotas de transdução de sinal (Efeitor da proteína G)
I	mGluR1			$\uparrow IP_3$
	mGluR5	DHPG	4CPG	$\downarrow I_k$ AMP _c
II	mGluR2	DCG-IV	MCCG	$\downarrow I_{Ca}$ (canais L,N,P)
	mGluR3	2 _R ,4 _R -APDC		$\uparrow I_k$
III	mGluR4	L-AP4	MAP4	AMP _c
	mGluR6-8		MPPG	$\downarrow I_{Ca}$ (canais N,P)

Fonte: Adaptado de Hudspith (1997).

II.1.3-Excitotoxicidade

Apesar do glutamato ser o neurotransmissor responsável pela maioria das sinapses no cérebro e medula espinhal (Cotman et al., 1987), uma exposição intensamente anormal ao glutamato pode ser letal aos neurônios, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Coyle et al., 1981, Choi, 1992). Lucas e Newhouse (1957) foram os primeiros a sugerir que o glutamato poderia atuar como neurotoxina, através de experimentos onde injeções de L-glutamato danificavam as camadas celulares internas da retina de camundongos. Estas observações foram replicadas e expandidas por Olney (1978), que em 1969 criou o termo excitotoxicidade para designar a neurodegeneração mediada por aminoácidos excitatórios (Olney, 1969).

Muitas evidências sugerem que a excitotoxicidade exerce um papel importante na patogênese no dano cerebral hipóxico-isquêmico (Beal, 1992; Arundine & Tymianski, 2004). O início da hipóxia é logo seguido por despolarização neuronal e liberação de glutamato e compostos relacionados dos terminais excitatórios (Choi, 1988b). Ainda, mecanismos celulares de captação dos aminoácidos excitatórios, que são dependentes da presença de fosfatos de alta energia, são inativados pela depleção energética que acompanha o episódio

hipóxico. A combinação de liberação sináptica excessiva e captação celular ineficaz, leva ao acúmulo de aminoácidos excitatórios na fenda sináptica e espaço extracelular (Choi, 1988). Porém, o indício mais convincente para a participação do fenômeno excitotóxico na injúria neuronal central isquêmica ou hipóxica, é o fato de que antagonistas do glutamato são efetivos na melhora do dano neuronal em modelos experimentais de derrame (Sheardown et al., 1990; Kadu et al., 1991; Mosinger et al., 1991; Beal, 1992).

Acredita-se também que a ativação excessiva de receptores NMDA e AMPA por glutamato endógeno esteja envolvida nos mecanismos patológicos de uma série de desordens neurodegenerativas, tais como esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Meldrum, 2000). Apesar das evidências diretas de que a ativação de receptores de aminoácidos excitatórios pode causar excitotoxicidade em insultos neurológicos agudos, é difícil prever como este mecanismo poderia contribuir para o insidioso início e a lenta e inexorável progressão das doenças neurodegenerativas (Beal, 1992). As duas hipóteses para tal presunção seriam a ocorrência de alterações nos próprios receptores e/ou desequilíbrio no metabolismo energético (Beal, 1992).

Através de estudos realizados com culturas neuronais corticais, Choi propôs que a degeneração neuronal induzida pelo glutamato pode ser distinguida em dois componentes (Choi, 1994): (1) um componente agudo, marcado por inchaço neuronal imediato e dependência da presença extracelular de Na^+ e Cl^- ; e (2) um componente retardado (ou tardio) caracterizado pela desintegração neuronal ocorrendo horas após a exposição ao glutamato e dependente da presença extracelular de Ca^{2+} . O primeiro componente provavelmente reflete o influxo de Na^+ extracelular, acompanhado pelo influxo passivo de água e Cl^- , resultando na expansão do volume celular. O segundo componente é provavelmente iniciado pelo influxo excessivo de Ca^{2+} . Apesar de tanto o componente agudo dependente de Na^+ , quanto o componente tardio dependente de Ca^{2+} da neurotoxicidade do glutamato poderem sozinhos produzir dano neuronal irreversível, na maioria dos neurônios corticais o último componente geralmente predomina (Choi, 1992).

Os diferentes subtipos de receptores do glutamato não participam de forma equivalente na excitotoxicidade. Experimentos com antagonistas sugerem que a maior parte da morte neuronal associada com exposição breve e intensa ao glutamato requer a ativação de receptores NMDA (Choi, 1992). A morte pode ser

quase que completamente prevenida com o bloqueio seletivo de receptores NMDA; embora a excitação e o inchaço neuronal induzidos pelo glutamato, sejam apenas parcialmente atenuados com o mesmo bloqueio (Michaelis & Rothman, 1990). Em contraste, o bloqueio seletivo com CNQX (6-nitro-7-ciano-quinoxalina-2,3-diona) na presença de altas concentrações de glicina (para reduzir o antagonismo dos receptores NMDA no sítio da glicina), teve apenas um pequeno efeito sobre a morte neuronal tardia (Koh & Choi, 1991). Apenas quando ambos receptores NMDA e AMPA/KA são bloqueados, o inchaço neuronal agudo induzido pelo glutamato é eliminado. Com base nestes dados, pelo menos em culturas celulares corticais, a injúria neuronal mediada por receptores glutamatérgicos exhibe dois padrões principais (Choi, 1992): (1) excitotoxicidade rapidamente iniciada, induzida por estímulo breve e intenso de grande número de receptores NMDA; e (2) excitotoxicidade lentamente iniciada, induzida por estímulo prolongado de receptores AMPA/KA (ou pequeno estímulo de receptores NMDA) (**Quadro 3**).

Quadro 3. Padrões de excitotoxicidade em neurônios corticais.

	Receptores	Tempo de exposição	Velocidade do influxo de Ca^{2+}	Rota do influxo de Ca^{2+}
Excitotoxicidade rapidamente iniciada	NMDA	3-5 min	Rápida	Receptores NMDA ? Receptores AMPA
Excitotoxicidade lentamente iniciada	AMPA/KA	Horas	Lenta	?Canais Ca^{2+} sensíveis à voltagem

Fonte: adaptado de Choi (1992).

Apesar do grande interesse e contínuos estudos a respeito deste tema, os mecanismos responsáveis pela excitotoxicidade ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, a perda na homeostase do Ca^{2+} , seguida da produção de radicais livres e a peroxidação lipídica nas membranas celulares, parece ter um papel importante (Price, 1999; Mattson, 2003; Arundine & Tymianski, 2004).

II.1.4-Papel do Ca^{2+} na excitotoxicidade

Íons cálcio são importantes mensageiros intracelulares que governam as funções celulares. Os neurônios possuem mecanismos homeostáticos especializados que garantem um rígido controle dos níveis citosólicos de Ca^{2+} . Estas células controlam tanto os níveis intracelulares de Ca^{2+} , quanto a localização celular deste cátion, através de uma complexa interação entre influxo de Ca^{2+} , efluxo de Ca^{2+} , tamponamento de Ca^{2+} e armazenamento intracelular de Ca^{2+} (Arundine & Tymianski, 2003). Sob condições fisiológicas, estes processos permitem que múltiplas cascatas sinalizadoras reguladas pelo Ca^{2+} ocorram de maneira independente na mesma célula. Contudo, o influxo excessivo de Ca^{2+} ou a sua liberação de depósitos intracelulares, podem elevar a carga celular de Ca^{2+} até níveis que excedem a capacidade dos mecanismos reguladores de Ca^{2+} . A consequência de tais fatos pode ser a ativação inapropriada de processos dependentes de Ca^{2+} , causando desequilíbrio metabólico e eventual morte celular (Choi, 1988a; Sattler & Tymianski, 2000). Por exemplo, elevações excessivas na concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) podem ativar de maneira exacerbada proteases, lipases, fosfatases e endonucleases que podem tanto danificar diretamente as estruturas celulares, quanto induzir a formação de radicais livres oxidativos responsáveis pela indução da morte celular (Arundine & Tymianski, 2003).

O glutamato exerce a maioria de suas ações celulares regulando a concentração intracelular de Ca^{2+} (Komuro & Rakic, 1993), através da ativação de receptores ionotrópicos NMDA e não-NMDA (Allcorn et al., 1996). Conforme descrito na seção anterior, Choi (1994) propõe que pelo menos uma forma de neurotoxicidade induzida pelo glutamato é dependente do acúmulo intracelular de Ca^{2+} . A despolarização neuronal e o influxo de Ca^{2+} produzidos pela ativação de receptores glutamatérgicos podem também causar uma depleção relativa nos estoques de ATP dos neurônios (Coyle & Puttfarcken, 1993). Admite-se que aumentos no Ca^{2+} intracelular levam as mitocôndrias a um estresse metabólico, causando fosforilação oxidativa excessiva e produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs), como $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$. O glutamato poderia potencialmente produzir influxo de Ca^{2+} tóxico para os neurônios por quatro diferentes rotas. Primeiro, o glutamato poderia iniciar um influxo de Ca^{2+} diretamente pelos canais iônicos quimicamente acionados, especificamente aqueles acoplados às subclasses de receptores ionotrópicos do glutamato. A segunda rota pela qual o

glutamato poderia induzir influxo de Ca^{2+} , é através dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem ativados pela despolarização da membrana induzida pelo glutamato (Choi, 1988). A terceira rota possível de entrada de Ca^{2+} induzida pelo glutamato é via trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ da membrana, um mecanismo que normalmente atua exsudando Ca^{2+} mas que pode operar de maneira reversa sob condições de elevado Na^+ citosólico (Nachsen et al., 1986; Alberdi et al., 2002). Em adição, transportadores de Ca^{2+} dependentes de energia, capazes de bombear Ca^{2+} citosólico para fora da membrana celular, ou para compartimentos celulares (retículo endoplasmático, mitocôndria), estão provavelmente prejudicados em condições de baixa energia, produzidas pela ação persistente do glutamato e hipóxia-isquemia (Choi, 1988). A quarta possível rota de entrada de Ca^{2+} é através de fendas específicas na membrana, aumentadas talvez pela distorção da membrana associada com o inchaço excitotóxico agudo induzido pelo glutamato (Choi, 1988). Finalmente, deve-se ter em mente que as concentrações citosólicas de Ca^{2+} podem elevar-se não somente por influxo de Ca^{2+} , mas também por liberação de depósitos intracelulares (Choi, 1988; Alberdi et al., 2002). O metabolismo do fosfolípido de inositol pode ser ativado por interação direta com receptores metabotrópicos do tipo I acoplados a proteínas G (Sugiyama, 1987). Esta ativação pode levar, via produção de inositol 1,4,5-trifosfato, à mobilização de Ca^{2+} intracelular, um processo que por si só pode ser aumentado pela elevação de Ca^{2+} citosólico ou acidose intracelular (Choi, 1988).

Evidências conectando elevações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ com morte neuronal subsequente surgiram de estudos que avaliaram ambos eventos no mesmo neurônio. Ogura e colaboradores (1988) descobriram que a persistência da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevada em neurônios hipocâmpais expostos ao glutamato correlacionava-se com a extensão da morte neuronal. Mattson et al. (1989) demonstraram que em culturas de neurônios hipocâmpais, um grande aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ após exposição ao glutamato, predizia a subsequente morte celular.

Em termos de mecanismos, a neurotoxicidade do glutamato pode ser modelada como um processo de três estágios mediados pelo Ca^{2+} , análogo aos modelos atuais de potenciação de longa duração: **indução, amplificação e expressão** (Choi, 1994).

A indução da neurotoxicidade do glutamato consiste da ativação dos receptores glutamatérgicos, levando ao desenvolvimento rápido ou lento de um

quadro danoso, caracterizado por alterações intracelulares (aumento nas concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , água, IP_3 e diacilglicerol), que irão desencadear os eventos subseqüentes (Choi, 1994).

Após a indução da toxicidade do glutamato, vários eventos podem atuar amplificando as alterações intracelulares, especialmente as elevações locais na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Choi, 1990). Tais eventos podem incluir a liberação de Ca^{2+} de depósitos intracelulares, a ativação de certas famílias de enzimas – por exemplo, quinases C, enzimas reguladas pela calmodulina, calpaínas e fosfolipases; os efeitos da expressão genética imediata e a conseqüente formação dos mensageiros intracelulares ácido araquidônico e óxido nítrico. (Choi, 1994). Em conjunto, estas alterações podem efetuar um aumento duradouro da eficácia sináptica excitatória e do circuito da excitabilidade, exacerbando o fenômeno da excitotoxicidade. Ainda, o efluxo de glutamato dos neurônios injuriados pode contribuir para a propagação adicional do dano excitotóxico (Choi, 1992).

A sobrecarga de Ca^{2+} dá início a uma série de cascatas citotóxicas responsáveis pela desintegração neuronal, expressão da excitotoxicidade. Uma classe importante de tais cascatas de expressão pode envolver enzimas catabólicas ativadas por Ca^{2+} (Choi, 1994). A protease ativada por Ca^{2+} , calpaína I, pode ser liberada pelo estímulo de receptores glutamatérgicos (Siman et al., 1989) e pode degradar importantes proteínas neuronais estruturais. Níveis elevados de Ca^{2+} citosólico podem também ativar a enzima fosfolipase A_2 , capaz de degradar membranas celulares e liberar ácido araquidônico e nucleases, que podem danificar o DNA genômico (Choi, 1994). Outra classe importante destas cascatas de expressão envolve radicais livres de oxigênio. Estas moléculas reativas podem iniciar muitos processos destrutivos, como a peroxidação lipídica (Siesjö, 1989); e uma vez formados, podem promover dano excitotóxico pela liberação de glutamato (Pellegrini-Campietro, 1988). A produção de radicais livres pode ser associada à perda da homeostase celular de Ca^{2+} de várias maneiras, incluindo: (1) a liberação de ácido araquidônico previamente citada, que leva à produção de radicais livres; (2) a conversão estimulada pelo Ca^{2+} da xantina desidrogenase à xantina oxidase, uma rica fonte enzimática de radicais livres (Dykens et al., 1987); e (3) o estímulo de receptores NMDA levando à ativação da enzima óxido nítrico sintase e liberação de óxido nítrico (Dawson et al., 1991), que pode reagir com o ânion superóxido (O_2^-) formando peroxinitrito (ONOO^-) e promovendo a produção de radicais hidroxil (OH^\cdot)

(Beckman et al., 1990). De fato, inibidores da óxido nítrico sintase, depleção de arginina e adição de hemoglobina, que complexa o óxido nítrico, são capazes de prevenir a toxicidade induzida por NMDA em fatias de hipocampo (Izumi et al., 1992).

Apesar de todas as evidências descritas até agora, alguns estudos indicam que pode não haver uma relação simples entre a elevação da $[Ca^{2+}]_i$ somática e a subsequente morte celular neuronal. Apesar da habilidade limitada do cainato em induzir morte celular de neurônios corticais após breve exposição ao mesmo, suas habilidades em elevar a $[Ca^{2+}]_i$ somática podem ser similares às do NMDA (Murphy et al., 1987). Michaels e Rothman (1990), relataram que o CNQX, um antagonista de receptores AMPA/KA foi muito efetivo em bloquear a elevação na $[Ca^{2+}]_i$ medida 5-20 min após exposição ao glutamato, mas não foi capaz de bloquear a morte neuronal subsequente. De acordo com Choi (1992), existem duas razões capazes de explicar porque medidas experimentais da $[Ca^{2+}]_i$ somática podem não refletir uma relação existente entre $[Ca^{2+}]_i$ e morte neuronal: (1) tais medidas podem não captar todo perfil temporal das alterações na $[Ca^{2+}]_i$ relevantes ao dano que se segue após o insulto; e (2) a $[Ca^{2+}]_i$ necessária para induzir morte neuronal pode estar localizada em compartimentos que se comportam diferentemente da $[Ca^{2+}]_i$ somática medida. A $[Ca^{2+}]_i$ pode alcançar níveis críticos apenas em determinados tempos e certas localizações. A caracterização precisa dos parâmetros temporais e espaciais pode ser necessária para delimitar uma relação entre $[Ca^{2+}]_i$ e processos danosos.

Em vista destes resultados conflitantes, Sattler e Tymiński (2000) descreveram duas hipóteses que poderiam explicar a relação entre sobrecarga de Ca^{2+} e toxicidade: (a) hipótese da carga de Ca^{2+} , que sugere que a neurotoxicidade induzida pelo Ca^{2+} é simplesmente uma função linear da quantidade de Ca^{2+} que entra na célula e a (b) hipótese da especificidade da fonte, que sugere que a neurotoxicidade induzida pelo Ca^{2+} , assim como vários outros processos dependentes de Ca^{2+} , incluindo plasticidade sináptica e expressão gênica, é regulada separadamente por rotas sinalizadoras distintas associadas a vias específicas de influxo de Ca^{2+} . Esta hipótese foi originalmente baseada em experimentos utilizando indicadores de Ca^{2+} livre (Sattler and Tymiński, 2000), e é a hipótese mais bem aceita nos dias atuais (Arundine and Tymiński, 2004).

A mitocôndria é a organela celular com maior capacidade de seqüestrar e acumular Ca^{2+} (Nicholls, 2004). De fato, quando o Ca^{2+} citosólico é aumentado, acumula-se na mitocôndria através de sistema uniporter de estrutura ainda desconhecida (Beutner, 2001). Após exposição ao glutamato, as alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seguem um padrão estereotipado. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta transitoriamente, e depois de um período de latência variável, volta a crescer novamente, provavelmente dentro de uma escala de valores μM , acompanhada intimamente pelo colapso do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Krieger & Duchon, 2002).

Evidências recentes sugerem que o aumento na concentração mitocondrial de Ca^{2+} pode ter um papel central na indução da morte neuronal sob tais condições. Deste modo, limitando a captação mitocondrial de Ca^{2+} por despolarização do potencial mitocondrial, confere-se proteção aos neurônios contra a morte celular tardia que ocorre após exposição ao glutamato (Nicholls & Budd, 2000). Este trabalho também demonstra que o colapso do $\Delta\Psi_m$ por si só, não pode ser a causa principal para a morte neuronal tardia induzida por receptores NMDA, e sim uma conseqüência do processo iniciado na mitocôndria devido ao acúmulo de Ca^{2+} .

Na presença de concentrações fisiológicas de fosfato, estima-se que a mitocôndria possa acumular concentrações mM de Ca^{2+} (Nicholls & Budd, 2000). Contudo, o acúmulo excessivo de Ca^{2+} acarreta pelo menos dois efeitos deletérios, podendo causar a abertura do chamado poro de permeabilidade mitocondrial transitório (PPMT) e a deposição de precipitados de Ca^{2+} -fosfato.

Ainda em relação ao papel primário da mitocôndria na morte neuronal induzida pelo glutamato, Ankarcona e colaboradores (1995) demonstraram que o glutamato pode induzir morte necrótica ou apoptótica dependendo da função mitocondrial. Durante e logo após a exposição ao glutamato, uma subpopulação dos neurônios cerebelares morreu por necrose. Nestas células houve colapso do $\Delta\Psi_m$, inchaço do núcleo e fragmentos intracelulares ficaram dispersos no meio de incubação. Neurônios que sobreviveram à fase inicial necrótica recuperaram o potencial de membrana e os níveis energéticos; e acabaram depois morrendo por apoptose, que foi caracterizada pela formação de núcleo apoptótico e pela degradação da cromatina em fragmentos de alto e baixo peso molecular. Estes resultados sugerem então, que a função mitocondrial é fator crítico na determinação da maneira da morte neuronal no processo excitotóxico.

II.1.4-A relação entre excitotoxicidade e estresse oxidativo

Inúmeras evidências sugerem que o estresse oxidativo pode atuar como mediador da morte neuronal excitotóxica que ocorre após a estimulação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (Coyle and Puttfarcken, 1993; Beal, 1995; Mattson, 2004). Ao considerarem-se tais estudos, é importante se considerar três linhas de evidências que são críticas para distinguir estresse oxidativo como um fenômeno versus um evento causal na morte neuronal: (i) radicais de oxigênio devem ser gerados durante o período do dano irreversível; (ii) evidências de danos oxidativos devem estar presentes e (iii) neutralizadores de radicais livres ou inibidores de processos geradores de radicais de oxigênio devem prevenir degeneração neuronal (Bains & Shaw, 1997). Todos estes critérios são satisfeitos tanto por agonistas de receptores NMDA, quanto não-NMDA: a ativação de receptores NMDA e KA aumentam o dano induzido por radicais livres aos lipídios; e este dano pode ser prevenido pelo tratamento simultâneo com vários antioxidantes (Miyamoto et. al, 1989; Miyamoto and Coyle, 1990; Monyer H.et al., 1990; Puttfarcken et al., 1993). Estes resultados sugerem que um ou mais dos seguintes mecanismos podem ocorrer: a estimulação de receptores glutamatérgicos ativa rotas bioquímicas que produzem radicais livres; e/ou desacoplam o transporte mitocondrial de elétrons; ou deprimem o sistema de defesa neuronal contra os danos produzidos por radicais livres (Bains & Shaw, 1997). De maneira oposta, radicais livres podem aumentar a liberação, e reduzir a captação de glutamato na fenda sináptica (Volterra et al., 1994). Um ciclo de perpetuação própria pode começar com a ativação de receptores do glutamato aumentando a produção de radicais livres, que pode levar a ativação adicional do receptor (Simonian & Coyle, 1996).

Existem muitos trabalhos indicando a elevação dos níveis de íons Ca^{2+} citosólicos como uma conexão importante entre estresse oxidativo e excitotoxicidade (Bondy, 1995; Nicholls, 2004; Mattson, 2004). A estimulação da enzima fosfolipase A_2 pelo cálcio pode levar à liberação de ácido araquidônico (Bondy, 1995). A conversão enzimática deste composto, por enzimas que utilizam diretamente oxigênio molecular, como as lipoxigenases e ciclooxigenases, em prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, leva a uma considerável formação de espécies reativas de oxigênio (Saunders & Horrocks, 1987; Pazdernik, 1992). Esta pode representar uma das maneiras pelas quais eventos excitatórios promovem formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (Pellerin & Wolf, 1991). O Ca^{2+} também pode

ativar a eclosão respiratória de leucócitos polimorfonucleares levando a produção de ânion superóxido. Tais leucócitos se acumulam em tecidos cerebrais pós-isquêmicos (Zimmerman et al., 1989).

Para manter baixos níveis intracelulares de cálcio, os neurônios utilizam quantidade considerável de energia metabólica através de bombas no retículo endoplasmático, membrana plasmática e mitocôndria (Halliwell & Gutteridge, 1999). A disfunção mitocondrial levando a níveis de ATP reduzidos produz lesões excitotóxicas *in vivo* (Beal, 2000). O glutamato é captado do meio extracelular pelos astrócitos, onde é convertido em glutamina pela ação da glutamina sintetase, uma enzima dependente de ATP, e então liberada para os neurônios. Os neurônios convertem então a glutamina novamente em glutamato pela ação da glutaminase. Este ciclo pode ser quebrado por inibidores da glutamina sintetase, uma enzima facilmente danificada por estresse oxidativo (Levine, 1983). Assim, a conversão de glutamato em glutamina nos astrócitos pode ser bloqueada tanto por estresse oxidativo, quanto por falha energética, levando ao acúmulo intracelular de glutamato, e sua liberação no espaço extracelular (Emerit et al., 2004).

O transporte de glutamato para os astrócitos pode ser inibido por espécies reativas de oxigênio (Chen et al., 2000; Danbolt, 2001) e o transportador de glutamato GLT-1 parece ser um alvo seletivo da oxidação em mutantes deficientes de superóxido dismutase (Trotti et al., 1999).

Os resultados de Kannurpatti e colaboradores (2004) demonstraram que a formação de espécies reativas de oxigênio e a citotoxicidade induzida por glutamato foram indubitavelmente dependentes de Ca^{2+} . Sugere-se que a despolarização da membrana mitocondrial ocorre devido à carga celular de Ca^{2+} e a metabolização subsequente do Ca^{2+} pela mitocôndria (Kristal & Dubinsky, 1997).

O glutamato também é capaz de induzir dano e morte celular mesmo em células que não expressam receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Este processo parece ser mediado pela depleção de glutathiona (GSH) por competição entre o glutamato e a cisteína pelo transportador de cisteína, prevenindo o suprimento de cisteína que é necessário para a resíntese de GSH (Schubert & Piasecki, 2001). Este processo costuma ser referido como a “toxicidade oxidativa do glutamato”. Uma vez que a GSH é o principal agente antioxidante endógeno, removendo espécies reativas de oxigênio, esta toxicidade oxidativa envolve um aumento em cascata de

espécies reativas de oxigênio mitocondriais, seguido da depleção dos mecanismos de defesa antioxidantes (Maher, 2001).

Normalmente, a produção de espécies reativas de oxigênio é mantida em níveis não-deletérios por uma variedade de antioxidantes, quelantes metálicos e enzimas detoxificadoras. Níveis extracelulares de aminoácidos excitatórios são regulados por potentes mecanismos de captação de alta afinidade presentes principalmente na glia (Bondy, 1995; Danbolt, 2001). Falhas nos mecanismos de geração de energia celular para manter a demanda necessária podem levar tanto a um estado hiperexcitado, quanto à formação excessiva de espécies reativas ao oxigênio. Estados de doença quase que invariavelmente envolvem entropia celular elevada, sendo então razoável esperar-se que o estresse oxidativo e a excitotoxicidade sejam fatores contribuintes para muitas doenças neurológicas, que num primeiro momento pareçam não-relacionadas (Bondy, 1995).

Nos dias atuais, existem evidências de que interações oxidativas/excitatórias possam também atuar na regulação da morte celular programada. A inibição crônica da superóxido dismutase (enzima responsável por detoxificar o ânion superóxido) produz morte apoptótica de neurônios espinhais; que pode ser prevenida pela co-administração de antagonistas de receptores do glutamato (Rothstein, 1994).

A relação precisa de causa/efeito entre eventos excitatórios e oxidativos no cérebro vivo é ainda desconhecida. Muitas correlações já foram demonstradas em sistemas isolados, mas o papel quantitativo destes eventos em sistemas intactos, ainda precisa ser elucidado (Bondy, 1995). Contudo, a validação do potencial terapêutico de antioxidantes e bloqueadores de canais de cálcio, não precisa esperar pelo esclarecimento final da inter-relação entre estes processos que são iniciados por falha na geração intracelular de energia e pelo colapso do gradiente iônico (Bondy, 1995).

II.2-Retina

O olho é um órgão receptor altamente especializado do sistema nervoso. Na verdade, a parte retiniana do olho é formada por tecido nervoso que se evagina do cérebro durante o desenvolvimento fetal. Ainda mais, a retina contém neurônios, da mesma forma que o encéfalo e a medula espinhal. A retina é a parte do olho que converte a imagem visual em padrão de impulsos nervosos transmitidos pelo nervo óptico e encéfalo (Guyton, 1988). A Figura 6 mostra a organização geral de um olho.

Na neurofarmacologia, em todas as áreas da biologia experimental, a escolha correta do modelo tecidual é de extrema importância. A retina, além de ser muito acessível, possui muitas características do tecido nervoso central; além disto, dados embriológicos, morfológicos e funcionais indicam que juntamente com o nervo óptico, a retina pode ser considerada uma extensão do cérebro (Shepherd, 1974).

A retina é uma fina camada de tecido nervoso situada na parte de trás do olho. A sua organização é bem caracterizada, constituída essencialmente de cinco tipos de neurônios e um tipo de célula glial (Barnstable, 1993). A Figura 7 mostra a anatomia da retina, com suas distintas camadas celulares.

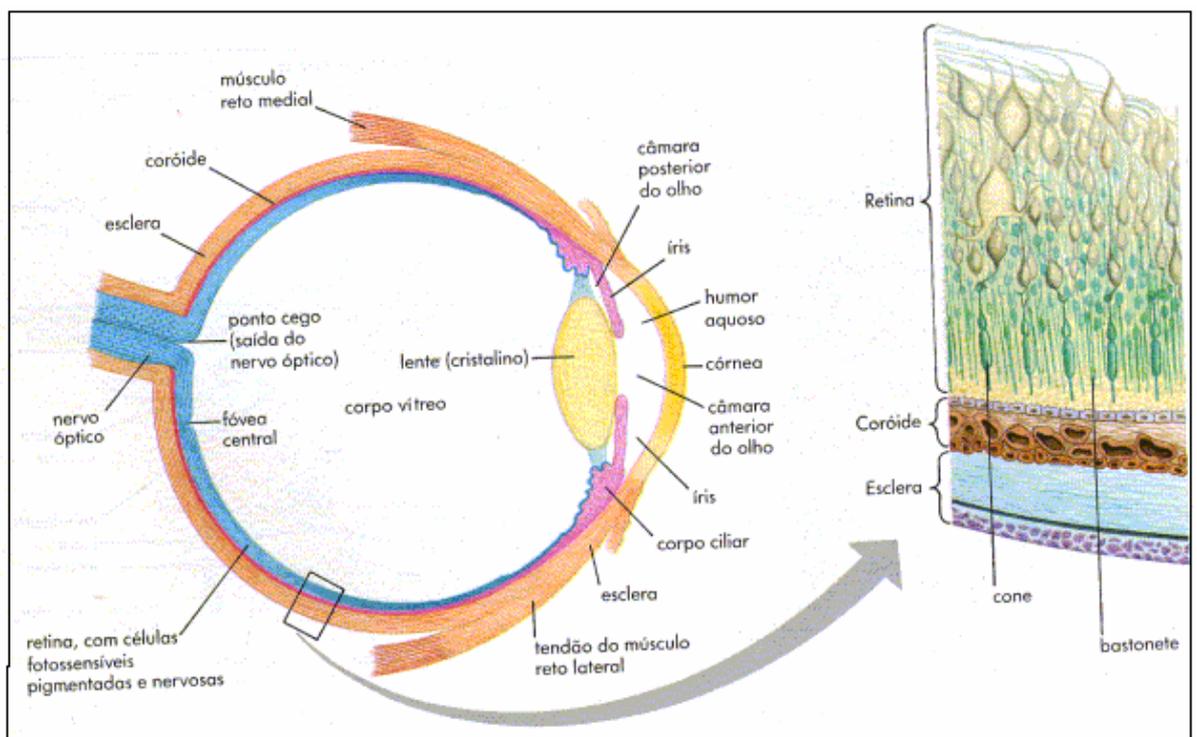


Figura 6: Estrutura geral do olho.

O complexo processamento do estímulo visual pela retina, incluindo detecção de cor, brilho, contraste e movimento, é realizado pela interação das células neuronais; como fotorreceptores (cones e bastonetes), células bipolares, células horizontais, células amácrinas e células ganglionares (Nowak, 1988). Morfologicamente, a retina é caracterizada em duas camadas de conexões sinápticas: camadas plexiformes interna e externa (Nowak, 1988). Mesmo que tanto funções sinápticas elétricas, quanto químicas ocorram na retina, a última predomina; e a “interconexão” entre os neurônios da retina parece ser mediada quimicamente na sua maior parte (Nowak, 1988).

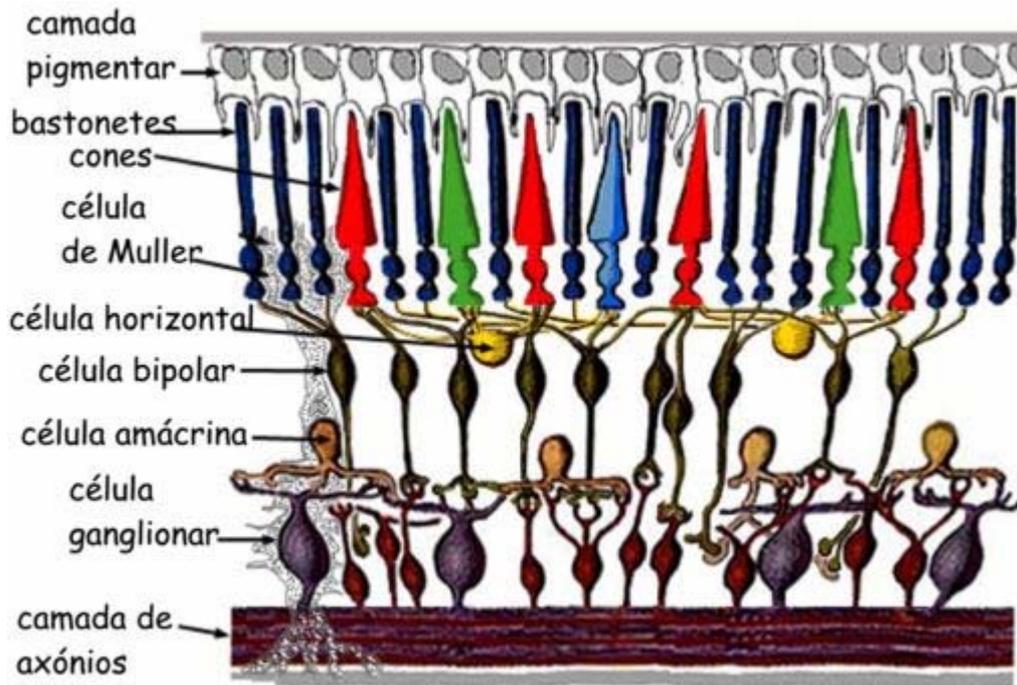


Figura 7: Anatomia funcional da retina.

Vários neurotransmissores, incluindo o glutamato, atuam na retina. De fato, juntamente com o GABA, o glutamato é o transmissor predominante na retina, sendo utilizado tanto por fotorreceptores, quanto por células bipolares em rotas radiais (Barnstable, 1993).

Existem cinco razões principais pelas quais a retina de vertebrados tornou-se um atrativo modelo tecidual para experimentação, particularmente *in vitro* (Nowak, 1988):

1. Devido a sua localização extracranial, o procedimento de dissecação da retina é simples, e causa-se menos trauma ao tecido quando comparado com a preparação de fatias cerebrais. Apesar de sua fina espessura, a retina é forte o bastante para permanecer intacta durante o processo de isolamento, sendo o único dano causado ao tecido o corte do nervo óptico.
2. Em alguns vertebrados (como anfíbios, aves, répteis e mamíferos) a retina não possui vasos penetrantes, e recebe nutrientes por capilaridade de outras superfícies; portanto este órgão não é tão prejudicado ao ser removido do olho e transferido para meio contendo fluido similar ao natural.

3. Dados morfológicos, metabólicos e eletrofisiológicos indicam que a retina isolada mantém praticamente todas suas atividades fisiológicas, incluindo a capacidade de responder à luz, por várias horas.
4. O estudo do tecido *in vitro* (assim como acontece com fatias cerebrais) permite ao investigador expor as células intactas de retina à drogas com concentrações e tempo de exposição bem definidos; assim como medir sua entrada e saída das células.
5. Estímulos fisiológicos podem ser facilmente e precisamente utilizados em experimentação.

Finalmente, a retina isolada de embrião de pinto é o modelo tecidual mais antigo e mais estudado para a análise dos efeitos excitotóxicos do glutamato e seus agonistas (Rothman & Olney, 1987). Agonistas das três classes de receptores glutamatérgicos ionotrópicos atuam como excitotoxinas na retina *ex vivo*, e estudos fisiológicos demonstraram que cada tipo celular danificado pelo glutamato possui receptores ionotrópicos do glutamato que fisiologicamente conduzem informações visuais na retina (Romano et al., 1998). Além disto, este modelo caracteriza-se pela sensibilidade a concentrações anormais de glutamato extracelular e seus análogos (Burgos et al., 2000).

Por estas razões, e também devido ao fato de constituir um método simples e barato, este foi o modelo experimental de escolha para avaliar a habilidade dos compostos organocalcogênios em antagonizar as ações tóxicas do glutamato.

II.3-Organocalcogênios

Os elementos químicos oxigênio (O), enxofre (S), selênio (Se), telúrio (Te) e polônio (Po) localizados no grupo 16 (antigo 6A) da tabela periódica são denominados de calcogênios (Feltre, 1995). São considerados elementos típicos, característicos ou representativos; e a semelhança de propriedades químicas entre estes elementos é máxima (Feltre, 1995).

Desde a década de 30, compostos organocalcogênios têm sido alvo de interesse de estudo, devido às suas aplicações sintéticas na química orgânica e suas propriedades biológicas (Comasseto, 1983; Parnham & Graf, 1991; Kanda et al., 1999). Existe uma tentativa crescente de desenvolvimento de compostos

organocalcogênios que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham & Graf, 1991). Devido ao fato de formas orgânicas de selênio e telúrio apresentarem atividade mimética da enzima glutathiona peroxidase, têm-se sugerido o uso de tais compostos como possíveis agentes antioxidantes (Wendel et al., 1984; Müller et al., 1985). Em adição, os organocalcogênios são capazes de retardar a peroxidação lipídica induzida por uma variedade de oxidantes (Engman et al., 1995).

II.3.1-Selênio

II.3.1.1-Importância fisiológica

O mineral traço Se é um nutriente essencial de importância fundamental para a biologia humana (Rayman, 2000). Este elemento químico foi descoberto e denominado pelo químico sueco Jöns J. Berzelius em 1817, mas passaram-se mais de 100 anos até que fosse associado à saúde humana (Bräuer & Savaskan, 2004). Durante os primeiros anos de sua existência, o Se ficou conhecido apenas como um agente ambiental tóxico de animais domésticos pertencentes a granjas ou fazendas (Trelease & Beath, 1949), mas durante as três últimas décadas este mineral mostrou-se essencial em vários aspectos da saúde humana (Chen & Berry, 2003), havendo evidências de sua participação na prevenção de diferentes tipos de câncer, doenças cardiovasculares e infecção viral, bem como na regulação do funcionamento da tireóide, função imune, humor e reprodução (Rayman, 2000).

A essencialidade do selênio deve-se a sua incorporação em selenoproteínas, como selenocisteína, o 21º aminoácido proteinogênico (Chen & Berry, 2003). A incorporação do Se em selenocisteína é específica e mediada a nível ribossomal (Arteel & Sies, 2001). A selenocisteína é estruturalmente similar a cisteína, mas o Se é melhor nucleófilo que o enxofre, e selenocisteínas estão ionizadas em pH fisiológico, enquanto que cisteínas estão tipicamente protonadas (Stadman, 1996). Em adição à incorporação como selenocisteína, o Se pode substituir o enxofre na metionina, formando selenometionina, que pode ser incorporada de maneira não-específica em proteínas no lugar da metionina (Chen & Berry, 2003). Finalmente, o Se pode ligar-se fortemente a algumas proteínas, conhecidas como proteínas ligadoras de Se, numa tentativa de diferenciá-las das verdadeiras selenoproteínas (revisado por Behne & Kyriakopoulos, 2001).

Até os dias atuais, têm-se caracterizadas as seqüências de 29 selenoproteínas (Bräuer & Savaskan, 2004), e estas são identificadas como enzimas

com resíduos de selenocisteína no seu domínio catalítico. Estas selenoenzimas, com exceção da selenofosfato sintetase são cataliticamente ativas em reações redox (Bräuer & Savaskan, 2004). O melhor exemplo desta função redox é a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos danificadores de lipídios e fosfolipídios em produtos inofensivos (como água e álcoois) pela família das glutathione peroxidases dependentes de selênio (Diplock, 1994). Esta função ajuda a manter a integridade das membranas (Diplock, 1994), protege contra a produção de prostaciclina (Néve, 1996), e reduz a probabilidade de propagação de danos oxidativos adicionais a biomoléculas como lipídios, lipoproteínas e DNA, associados a condições de risco elevadas de aterosclerose e câncer (Diplock, 1994; Néve, 1996). A selenocisteína é crítica para as atividades catalíticas de várias selenoproteínas como, por exemplo, de glutathione peroxidases (reduzindo peróxidos e atuando na fertilidade masculina), de iodotironina deiodinases (regulando a atividade hormonal da tireóide), de tioredoxina redutases (regenerando sistemas antioxidantes, regulando expressão genética, viabilidade e proliferação celular) e de metionina sulfóxido redutases (reparando metioninas em proteínas danificadas) (Chen & Berry, 2003).

Doenças relacionadas à deficiência de selênio em humanos já foram identificadas em áreas da China, onde o solo é extremamente pobre em Se: doença de Keshan, uma cardiopatia endêmica e doença de Kashin-Beck, uma forma de artrite deformante (Reilly, 1996). Acredita-se que ambas as condições apresentem outros co-fatores causativos.

O Se consumido em alimentos e suplementos pode apresentar-se de variadas formas orgânicas e inorgânicas, incluindo selenometionina (fontes animais e vegetais e suplementos), selenocisteína (principalmente fontes animais), selenato e selenito (principalmente suplementos) (Rayman, 2000). A biodisponibilidade e distribuição tecidual dependem da forma ingerida. Por exemplo, a selenometionina é mais eficiente em aumentar o status aparente de selênio porque não é incorporada de maneira não-específica em proteínas (como hemoglobina, albumina) no lugar da metionina (Thomson, 1993). Contudo, a selenometionina precisa ser catabolizada até um precursor inorgânico antes de entrar no pool de Se disponível. Então, a selenometionina é uma fonte metabólica de Se menos disponível do que selenito ou selenato, uma vez que estes precisam apenas ser reduzidos até selenito provendo selenofosfato, que é o precursor da selenocisteína, a forma ativa do Se nas selenoproteínas (Allan et al., 1999). Não obstante, as formas orgânicas são

preferencialmente utilizadas em intervenções, em parte porque apresentam menor toxicidade aguda (Rayman, 2000). Tais formas orgânicas podem, contudo, serem mais tóxicas durante consumo em longo prazo, devido à retenção não específica do Se como selenometionina em proteínas corporais, ao invés de ser excretado (Rayman, 2000).

O fato de o cérebro reter quantidades apreciáveis de Se mesmo após longos períodos de privação do mesmo, demonstra a importância deste elemento traço para o funcionamento adequado do cérebro (Savaskan et al., 2003).

Os dados clínicos mais convincentes acerca da relação entre Se e desordens neurológicas surgiram de dois estudos independentes, que sugerem que pelo menos uma forma de convulsão intratável em crianças é associada com baixos níveis de Se. Weber e colaboradores demonstraram, em 1991, que os níveis plasmáticos de Se e a atividade da glutatona peroxidase sanguínea estavam severamente reduzidos em quatro crianças com convulsão intratável. Subseqüentemente, em 1994 demonstrou-se que em casos similares de convulsões intratáveis, a administração repetida de Se causava redução dos episódios convulsivantes (Ramaekers et al., 1994).

A exposição de animais a metanfetamina resulta em formação elevada de radical superóxido e óxido nítrico, que interagem produzindo peroxinitrito. O peroxinitrito é um potente oxidante, levando ao dano dopaminérgico (Imam & Ali, 2000). Deste modo, a administração de múltiplas doses de metanfetamina a camundongos resulta em efeitos tóxicos de longa duração sobre o sistema dopaminérgico nigro-estriatal, tornando-se um modelo relevante de Doença de Parkinson. Em camundongos suplementados com Se, esta toxicidade dopaminérgica foi significativamente atenuada, quando comparada aos camundongos tratados com dietas deficientes em Se (Kim et al., 2000). O pré-tratamento dos animais com Se e melatonina pode proteger completamente contra a depleção de dopamina estriatal induzida por metanfetamina (Imam et al., 2001). A razão para os efeitos protetores do Se contra a metanfetamina foi atribuída a eficiente neutralização do peroxinitrito pelas selenoproteínas (Sies & Arteel, 2000).

A 6-hidroxidopamina é uma neurotoxina específica para neurônios catecolaminérgicos tanto do sistema nervoso central, quanto periférico. A Doença de Parkinson induzida por este composto em ratos, foi prevenida pelo Se de maneira dependente da dose, através da regulação do status antioxidante e pela prevenção

da perda de dopamina. Este estudo demonstrou que o Se pode ser útil em atrasar a progressão da neurodegeneração no parkinsonismo (Zafar et al., 2003).

Os efeitos biológicos do selênio têm sido atribuídos à sua ação antioxidante e subsequente remoção de espécies reativas de oxigênio e peróxidos orgânicos (Bräuer & Savaskan, 2004). As estratégias fisiológicas e farmacológicas para alcançar uma defesa antioxidante são organizadas em três categorias: prevenção, interceptação e reparo (Sies, 1993b). No contexto de defesa antioxidante, o Se atua principalmente ao nível de interceptação (Arteel & Sies, 2001). O objetivo principal de interceptar espécies danosas, uma vez formadas, é desativá-las. Além disso, interceptar também implica em retirar agentes pró-oxidantes de compartimentos mais sensíveis da célula (Arteel and Sies, 2001).

Compostos de Se com natureza química inerte, como selenato e selenometionina, também apresentam efeitos biológicos. Contudo, estes compostos são incorporados em selenoproteínas, e, portanto, afetam a sinalização celular via síntese protéica *de novo*, demonstrando que a síntese protéica *de novo* de selenoproteínas contribui de alguma maneira para os efeitos benéficos do Se (Savaskan et al., 2003).

A princípio, os efeitos benéficos do Se sobre os neurônios podem ser resumidos como:

1. prevenção da peroxidação lipídica e proteção da membrana plasmática;
2. proteção contra dano celular oxidativo;
3. indução *de novo* e elevação de selenoproteínas protetoras;
4. balanço da atividade de quinases e fosfatases e
5. prevenção de danos ao DNA.

II.3.1.2-Ebselen

O conceito de que moléculas contendo Se podem ser melhores nucleófilos (e, portanto antioxidantes) do que antioxidantes “clássicos” propiciou o desenvolvimento de compostos orgânicos de Se sintéticos (Arteel & Sies, 2001). Nos últimos anos têm-se encontrado muitos trabalhos na literatura especializada, acerca de compostos miméticos da glutathione peroxidase, que assim como a enzima nativa devem sua atividade à característica redox do Se. O primeiro exemplo de tais compostos foi o ebselen (Müller et al., 1984), que é capaz de prevenir efeitos neurotóxicos e bloquear a peroxidação lipídica em culturas de neurônios de ratos

causada por exposição aguda a agonistas do glutamato (Porciúncula et al., 2001; Rossato et al., 2002a).

Muitas das propriedades biológicas do ebselen poderiam ser explicadas pela sua ação como mimético enzimático, exercendo funções da selenoenzima glutathione peroxidase (Müller et al., 1984) e da enzima fosfolipídio hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGpx) (Maiorino et al., 1992).

Acredita-se que a reação enzimática cíclica catalisada pela glutathione peroxidase seja procedida via três passos principais, envolvendo a selenocisteína ligada à enzima, E-Cis-SeH, que se apresenta como selenol ou mais provavelmente como selenolato (Figura 8) (revisado por Flohé, 1989). No primeiro passo, reação (1), o hidroperóxido orgânico, ROOH, reage formando ácido selenênico, E-Cis-SeOH e o álcool correspondente, ROH. Os dois passos seguintes consistem da redução seqüencial por tióis, como a glutathione (GSH). A reação (2) origina selenosulfeto e água, e finalmente a reação (3) regenera o selenol e o disulfeto, glutathione oxidada (GSSG). A reação total é a realizada pela glutathione peroxidase ou PHGpx, a reação (4).



Figura 8: Reação enzimática cíclica da glutathione peroxidase.

Em suas análises químicas sobre a reatividade do tipo glutathione peroxidase do ebselen, Fischer e Dereu (1987) propuseram a formação de um disseleneto, o 2,2-diselenobis-(N-fenilbenzamida) como um passo chave para a atividade catalítica do mesmo. Contudo, em estudo cinético a respeito da reação de catálise da glutathione peroxidase exercida pelo ebselen, Maiorino e colaboradores (1988) concluíram que o mecanismo parecia cineticamente idêntico ao da reação enzimática. Foi subsequente concluído por Morgenstern e colaboradores (1992) que o selenol é a espécie molecular predominante, responsável pela atividade peroxidase dependente de glutathione ou ditiotretol do ebselen. Desta forma, parece que a reação catalítica do tipo glutathione peroxidase, exercida pelo ebselen, é análoga ao mecanismo de catálise da enzima glutathione peroxidase (Flohé, 1989).

Ao contrário da reação catalisada pela enzima, que contém sítios de ligação específicos para a glutatona, o ebselen pode utilizar outros tióis em adição a glutatona, como por exemplo, ditiotreitól (Müller et al., 1985), N-acetilcisteína (Cotgreave et al., 1987) ou dihidrolipoato (Haenen et al., 1990).

Um novo aspecto das funções biológicas do ebselen diz respeito às observações de sua excepcional alta reatividade com o peroxinitrito, um agente ativo importante em processos inflamatórios (Masumoto & Sies, 1996). A constante de segunda ordem do ebselen com o peroxinitrito é de $2 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Masumoto et al., 1996), um dos valores mais altos que se conhece para a redução do peroxinitrito (Arteel et al., 1999).

Maiorino e colaboradores (1992) e Noguchi e colaboradores (1992) concluíram que o papel principal do ebselen na proteção contra diferentes tipos de insultos oxidativos está relacionado com sua capacidade de mimetizar glutatona peroxidases, principalmente PHGPx, baseados na sua alta reatividade com fosfolipídios e hidroperóxidos de colesterol. A ação neutralizadora direta de radicais livres, estudada em sistemas químicos, parece ter menor importância para os efeitos do ebselen em sistemas bioquímicos (Parnham & Sies, 2000).

Outro aspecto, não relacionado às atividades como mimético enzimático do ebselen, reside na alta reatividade do mesmo frente a grupos tiólicos, levando à inativação ou inibição de enzimas (Parnham & Sies, 2000).

O efeito antiinflamatório do ebselen também tem chamado muita atenção nestes últimos anos (Parnham & Graf, 1991; Parnham, 1996), mas uma vasta lista de condições experimentais indica que o ebselen possui uma série de efeitos de interesse clínico potencial. Efeitos inibitórios do ebselen, além dos vistos em sistemas geradores de radicais livres, incluem inibição da infiltração inflamatória de leucócitos, da liberação de citoquinas, da síntese de leucotrienos, da injúria por isquemia-reperfusão, do dano gástrico e hepático, e da apoptose (revisado por Parnham & Sies, 2000).

O metabolismo do ebselen tem sido estudado em diferentes modelos experimentais, tanto intacto, quanto isolados; animais e humanos (revisado por Sies, 1989). O conceito atual acerca do transporte do ebselen no organismo é de que o mesmo esteja ligado a proteínas, e que haja uma troca com tióis de baixo peso molecular dentro das células e tecidos (revisado por Sies, 1993a). Wendel e colaboradores (1984) sugeriram que o Se presente na molécula do ebselen não

estaria biodisponível, portanto, este Se não entraria para o pool de Se corporal disponível e metabolizável; o que poderia explicar a baixa toxicidade do ebselen em modelos experimentais.

A eficácia clínica do ebselen foi analisada em três estudos duplo-cegos, controlados por placebo, em casos de choque isquêmico agudo (Yamaguchi et al., 1998), aneurisma decorrente de hemorragia subaracnóidea (Saito et al., 1998) e oclusão aguda da artéria cerebral média (Ogawa et al., 1999). Os resultados destes estudos clínicos revelaram que o ebselen proporcionou uma melhora significativa em pacientes que vivenciaram isquemia cerebral de curta duração, mas não em pacientes que sofreram derrame não-oclusivo severo. Os efeitos benéficos do ebselen foram intimamente correlacionados com a rapidez do início do tratamento após o choque isquêmico. A segurança e tolerabilidade ao ebselen foram boas e não houve efeitos adversos aparentes. Em relação a investigações pré-clínicas, é muito provável que se encontrem aplicações para o ebselen em outras desordens isquêmicas e/ou inflamatórias.

II. 3. 2-Diorganocalcogênios

Baseado nos fatos de que as propriedades farmacológicas do ebselen estão relacionadas a sua atividade do tipo tiol peroxidase e de que diorganocalcogênios são compostos miméticos da glutathione peroxidase, nosso grupo de pesquisa têm avaliado as propriedades farmacológicas do composto disseleneto de difenila (Figura 2). Com respeito às suas propriedades antioxidantes, o disseleneto de difenila é capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida por ácido quinolínico (que estimula de maneira exacerbada o sistema glutamatérgico) e por nitroprussiato de sódio (um doador de óxido nítrico) (Rossato, 2002b). Em adição, o disseleneto de difenila interfere com o sistema glutamatérgico tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, inibindo a ligação de glutamato e MK-801 (um antagonista de receptores NMDA) em membranas sinápticas de cérebro de rato (Nogueira et al., 2001).

De particular importância é o fato do disseleneto de difenila ser uma droga segura quando administrado agudamente a ratos e camundongos em doses que apresentam atividades antiinflamatória e antinociceptiva (Nogueira et al., 2003). Enquanto o ebselen é uma molécula complexa, e conseqüentemente de síntese cara, disselenetos são facilmente sintetizados e estruturalmente mais simples que o ebselen.

Dados recentes demonstram que o disseleneto de difenila consegue prevenir simultaneamente dois efeitos provocados pela privação de glicose e oxigênio em fatias hipocâmpais de rato: morte celular e aumento no imunoconteúdo da enzima óxido nítrico sintase induzível (Ghisleni et al., 2003). Além disso, o disseleneto de difenila foi capaz de reduzir o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzido por 4-aminopiridina em sinaptossomas de cérebro de rato, em concentrações micromolares (Moretto et al., 2003).

II.3.3-Telúrio

O elemento Te foi descoberto em 1782. Entretanto a inclusão deste átomo em moléculas orgânicas ocorreu somente no início do século XIX. Os efeitos do Te sobre o organismo animal começaram a ser estudados por Gmelin (1824). Todavia, os primeiros relatos a respeito da toxicidade deste elemento surgiram após o acidente de Windscale (UK) na Europa (Stewart & Crooks, 1958).

Ao contrário do Se, o Te não apresenta função fisiológica descrita até o momento (Taylor, 1996). Entretanto, as configurações eletrônicas do Se e do Te são semelhantes; conseqüentemente, estes apresentam algumas características similares, como toxicidade, que pode estar relacionada ao estado de oxidação deste elemento (Van Vleet & Ferrans, 1982).

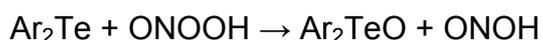
Industrialmente, o Te é utilizado na manufatura de semicondutores e outros componentes eletrônicos (Clayton & Clayton, 1981). Além disto, é empregado na síntese de fármacos e explosivos, na vulcanização de borracha, em lubrificantes sólidos e na petroquímica, entre outros (Taylor, 1996). Casos de intoxicação ocupacional aguda por Te são raros; entretanto, quando ocorrem, os sintomas são dores de cabeça, náuseas, alteração da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho (Taylor, 1996). O mecanismo para explicar a toxicidade do Te, assim como a do Se, envolve a oxirredução de grupamentos tiólicos de moléculas biologicamente ativas (Deuticke et al., 1992).

Compostos inorgânicos de Te são potentes agentes neurotóxicos em ratos, permeáveis à barreira placentária (Agnew, 1972), e causam hidrocefalia, hipomielinização ou desmielinização (Taylor, 1996; Goodrum, 1998). Por outro lado, o Te tem sido utilizado terapêuticamente em drogas que atuam no sistema imune, no tratamento da sífilis e da tuberculose (Hansen, 1853).

Assim como o ebselen, compostos orgânicos de Te, mais precisamente diaril teluretos, mimetizam a atividade da glutathione peroxidase na decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos na presença de tióis como agentes estequiométricos redutores (Andersson et al., 1993). O átomo de Te presente em compostos orgânicos é facilmente oxidado do estado divalente (+II) até o estado tetravalente (+IV), o que torna estes compostos aptos a inibirem a peroxidação estimulada em hepatócitos de ratos e microsomas de rim de rato (Cotgreave et al., 1991; Andersson et al., 1994) e a peroxidação azo-induzida do ácido linolêico em metanol (Engman et al., 1995). Estes resultados sugerem também que compostos orgânicos de Te podem atuar como antioxidantes quebradores de cadeia. De fato, um estudo realizado com modelo de peroxidação de duas fases forneceu dados adicionais à suposta capacidade de quebrar cadeias destes compostos (Vessman et al., 1995).

Tanto diaril teluretos, quanto diaril selenetos, representam uma classe atraente de compostos para o estudo das propriedades antioxidantes dos organocalcogênios (Briviba et al., 1998). Nestes compostos, o calcogênio está ligado ao carbono por duas ligações fortes, tornando os mesmos mais resistentes à degradação fotoquímica e térmica. Ao contrário de derivados alquila de Te, compostos aril não sofrem reação de eliminação *syn* do teluróxido no estado tetravalente. Conseqüentemente, o risco de liberação de algum produto de decomposição do Te potencialmente tóxico, é minimizado (Briviba et al., 1998).

Em estudo recente, Briviba e colaboradores demonstraram que diaril teluretos miméticos da glutathione peroxidase, exibem propriedades biológicas e potencialmente terapêuticas contra peroxinitrito (Briviba et al., 1998). Em adição, estes compostos foram mais eficientes que seus análogos de Se, e até mesmo que o próprio ebselen. Neste trabalho, os autores ainda sugerem que os diaril teluretos atuam como neutralizadores de peroxinitrito por um mecanismo de transferência de oxigênio similar ao observado com peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos:



Ainda em 1998, Wieslander e colaboradores demonstraram pela primeira vez a atividade protetora e antioxidante de compostos orgânicos de telúrio em sistemas celulares complexos (Wieslander et al., 1998). Em estudo realizado recentemente, esta mesma classe de compostos orgânicos de Te, em baixas concentrações, foi

capaz de proteger eritrócitos de truta (*Salmo irideus*) contra estresse oxidativo induzido termicamente e por variação de pH (Tiano et al., 2000).

Nosso grupo de pesquisa tem concentrado esforços no estudo das propriedades biológicas de um composto orgânico de Te, o ditelureto de difenila (Figura 3). Este composto demonstrou possuir atividade antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica induzida por ácido quinolínico e nitroprussiato de sódio em cérebro de rato (Rossato et al., 2002b). Ainda, este composto foi capaz de inibir o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por KCl e 4-aminopiridina, de maneira dependente da dose, em sinaptossomas de cérebro de rato (Moretto et al., 2003).

De grande importância para este trabalho é o fato de compostos orgânicos de Te estarem sendo testados com sucesso em relação ao seu efeito neuroprotetor em modelos neuronais de estresse oxidativo (Kanski et al., 2001).

CAPÍTULO III

ARTIGO CIENTÍFICO

EFFECT OF EBSELEN AND ORGANOCHALCOGENIDES ON EXCITOTOXICITY INDUCED BY GLUTAMATE IN ISOLATED CHICK RETINA

F. B. Centurião¹, C. L. Dalla Corte¹, M. W. Paixão¹, A. L. Braga¹, G. Zeni¹, T.
Emanuelli² and J. B. T. Rocha¹

¹Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

²Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Running title: Organic forms of selenium and tellurium and excitotoxicity.

Corresponding author: João Batista Teixeira da Rocha

Phone: #55 0XX55 2208140

Email: jbtrocha@yahoo.com.br

ACKNOWLEDGMENTS: Supported by CAPES, CNPq and FAPERGS.

Abstract

In this study we evaluated the effects of three simple diorganyl chalcogenides (diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and diphenyl telluride) and ebselen on glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal cells, as well as their effects on the excitotoxic retina neuronal damage. None of the compounds tested interfered with basal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride had no effects on glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx. Diphenyl telluride (100-400 μM) decreased and ebselen (100-400 μM) completely blocked the glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx ($P < 0.01$) into chick retinal explants. The assessment of neuronal injury was made spectrophotometrically by quantification of cellularly reduced MTT (3(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Ebselen had no effects on retinal MTT reduction when co-incubated with glutamate for 8h. However, when ebselen (100 and 400 μM) was co-incubated for 8 h with glutamate and remained in the incubation media until MTT evaluation (24 h after the beginning of incubation), it protected retinas against the decrease in MTT reduction induced by glutamate. These data indicate that besides its capacity of interacting with Ca^{2+} channels, other mechanisms are involved in the neuroprotection afforded by ebselen in this work; possibly its antioxidant properties.

Key words: glutamate, excitotoxicity, calcium, oxidative stress, selenium, tellurium, antioxidants.

INTRODUCTION

Lucas and Newhouse (1957) were the first to suggest that glutamate could be a neurotoxin, showing that L-glutamate injections could destroy the inner layers of the mouse retina. These observations were replicated and expanded by Olney (1978), which in 1969 coined the term “excitotoxicity” to indicate neurodegeneration mediated by glutamate and related compounds (Olney, 1969). This process has been proposed to be involved in the pathophysiology of acute brain injury and chronic neurodegenerative diseases, such as ischemia, head trauma, stroke, Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease (Ozawa et al., 1998; Aarts and Tymianski, 2003).

A strong relationship exists between excessive Ca^{2+} influx through glutamate receptor-associated channels and glutamate-triggered neuronal injury (Arundine and Tymianski, 2003). Conditions that lead to endogenous glutamate release increase the intracellular Ca^{2+} concentration, which activates a large number of Ca^{2+} -dependent processes and causes neuronal damage, both of which promote further increase in glutamate release and a decrease in glutamate uptake (Ferreira et al., 1996).

Glutamate receptor-mediated neuronal degeneration can be separated into two distinct components of injury, acute and delayed, distinguished by the time course and ionic dependence of neuronal degeneration (Coyle and Puttfarcken, 1993; Romano et al., 1995). The first component probably reflects the influx of extracellular Na^+ , accompanied passively by the influx of Cl^- and water, resulting in cell volume expansion (Choi, 1992). The second component marked by neuronal disintegration occurring over a period of hours after exposure, depends on the presence of extracellular Ca^{2+} and is likely triggered by excessive Ca^{2+} influx (Choi, 1994).

Sustained elevations in intracellular Ca^{2+} concentrations can be expected to set in motion several destructive cascades that bear ultimate responsibility for neuronal disintegration. One important class of such cascades may involve oxygen-free radicals (Choi, 1992), that once formed can initiate many destructive processes (Siesjö, 1989) and may promote further excitotoxic injury by promoting glutamate release (Choi, 1992). In fact, oxidative stress is thought to be a contributing factor in glutamate neurotoxicity through generation of oxygen radicals that disrupt cell functions (Schinder et al., 1996). Development of novel and potent antioxidants plays

an important role in targeting therapeutic interventions in neurodegenerative disorders in which oxidative stress has been implicated (Kanski et al., 2001).

It has been suggested that the redox activity of selenium and tellurium atoms of organic compounds provides antioxidants of considerable potency, suitable as tools in free radical biology and medicine (Parnham and Garf, 1991). In fact, a variety of organoselenium and organotellurium compounds can protect the brain from oxidative stress *in vitro* and *in vivo* (Rossato et al., 2002a; Rossato et al., 2002b; Meotti et al., 2004; Prauchner et al., 2004). Results from our group have already demonstrated the anti-inflammatory and neuroprotective activity of diphenyl diselenide, an aryl diselenide (Nogueira et al., 2003; Ghisleni et al., 2003). In addition, recent reports showed that diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride are able to modulate the Ca^{2+} influx in rat brain synaptosomes (Moretto, 2003). Ebselen, a synthetic heterocyclic seleno-organic compound, has been shown to be a glutathione peroxidase-mimetic (Sies, 1993) and is known for its beneficial effects on inflammation and tissue injury (Knollema, 1996; Nogueira et al., 2003). Most importantly, in humans, ebselen has been used with success in preclinical trials for the treatment of cerebral ischemia and stroke (Yamaguchi et al., 1998; Ogawa et al., 1999).

The need for a simple model system to analyze excitatory amino acid receptor activation as the structural substrate for excitotoxic phenomena, and to search for novel antagonists with neuroprotective potential, has increased the use of chick retina *ex vivo* as versatile experimental preparation specially sensitive to abnormal concentrations of extracellular glutamate and its analogs (Romano et al., 1998; Burgos et al., 2000). In this context, we used this model to investigate the effects of three simple diorganyl chalcogenides (diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and diphenyl telluride) and ebselen on glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx, as well as their effects on the excitotoxic retina neuronal damage.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The organochalcogenides diphenyl diselenide [(PhSe)₂], diphenyl ditelluride [(PhTe)₂], diphenyl telluride [(Ph)₂Te] and ebselen [2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one] were synthesized in our laboratory. Ebselen was synthesized using the expedient method described by Engman (1989). Diphenyl ditelluride and diphenyl telluride were synthesized using the method described by Petraghani (1994) and diphenyl diselenide was synthesized according to Paulmier (1986). Stock solutions of organochalcogenides were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) just before use. Final concentration of DMSO in assays was 1% and did not modify basal or glutamate-driven ⁴⁵Ca²⁺ influx (data not shown), but induced a slight decrease in MTT reduction. Hence, in all set of experiments with organochalcogenides, the retinas treated with 1% DMSO in the presence or absence of glutamate, were considered the control group.

MTT was obtained from Sigma (St. Louis, MO) and [⁴⁵Ca]CaCl₂ was purchased from New England Nuclear. All other reagents were of analytical grade.

Animals

White Leghorn chick (*Gallus domesticus*) embryos of the desired developmental stage were produced by incubation of fertile eggs, in our own facilities, using a forced-draft incubator, with controlled temperature and humidity, and automatic turning.

Dissection of neural retinas and experimental setup

Eleven-day (E11) chick embryos (11±1) were used for easy separation of the neural retina from the pigment/vascular layer. After decapitation and eye removal the eyecups were placed in a Krebs-like balanced salt solution (KBSS) containing 119 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 24.9 mM NaHCO₃ and 5.6 mM glucose, buffered at pH 7.4. The eyecups were kept in the dark until dissection. After excision of the cornea and the lens, the vitreous humor was gently pulled out and then the retina was removed as a continuous sheet. Each retina were individually weighted and placed inside a small plastic container fitted with a nylon mesh at the bottom, in one of the wells of a 24-

well (20 mm) tissue culture plate supplied with 1 ml KBSS. This arrangement facilitated the sequential exposure of the retina to different solutions with a minimum of manipulation.

Calcium influx assays

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx was carried out essentially as described by Burgos et al. (2000) with little modifications. Briefly, within 15-30 min after dissection, the neural retinas were changed to wells containing 1 ml of fresh KBSS, and preincubated for 10 min at room temperature. They were finally transferred to another series of wells containing KBSS, with 1.25 mM $^{45}\text{CaCl}_2$, and variable concentrations of glutamate (blanks without glutamate were also included in each series), and incubated for a further 30 min at room temperature. Extracellular $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was thoroughly washed off in 119 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.2 mM MgCl_2 , 1 mM Tris-HCl, 10 mM LaNO_3 , pH 7.4 (five 10 min washes with 2 ml of washing solution). Washed retinas were transferred to scintillation vials containing 1 ml of 1 mM Tris-HCl, pH 7.4. After addition of 1 ml of 0.2 M NaOH containing 0.2% sodium dodecyl sulfate, the vials were heated at 60°C for 1 h before adding scintillation fluid and counting. All experiments were performed in duplicate.

The presence of La^{3+} during the washing stage was found to be essential to prevent release of the intracellular $^{45}\text{Ca}^{2+}$ taken up during incubation (Burgos et al., 2000). In experiments using the organochalcogenides compounds and DMSO, these drugs were present both during preincubation and incubation.

Assessment of neuronal injury

E11 embryonic neural retinas, dissected and weighted as described above, were transferred to wells and incubated in 1 ml KBSS at 30°C for 24 h, being exposed to glutamate during the first 30 min, 8 h or during the whole 24 h period. In neuroprotection assays, ebselen or DMSO were present during the incubation period with glutamate, and in some cases remained in the incubation media, after glutamate withdraw of the medium.

Assessment of neuronal injury was made by a colorimetric assay for cell survival using MTT (Mosmann, 1983). Briefly, after the 24 h incubation period the retinas were incubated in KBSS medium containing 0.25 mg/ml MTT for 1 h at 30°C. Only viable cells are able to reduce MTT into a formazan product that is soluble in

DMSO and measured at 570 nm. The absorbencies were corrected by the individual retinal weights. All experiments were made in triplicates.

Statistical Analysis

All values were presented as mean \pm SEM. ANOVA/MANOVA-followed Duncan's post hoc test was used to evaluate differences between groups. The obtained *P* values lower than 0.05 were regarded as significant.

RESULTS

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retina cells significantly increased as glutamate concentration increased in the reaction mixture (Figure 1) with a typical profile of saturable, receptor-mediated phenomena. Maximal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fluxes at saturation have been evaluated at 46.35 ± 8.48 nmol/ retina/ 30 min in the presence of 2 mM glutamate.

Under basal conditions, ebselen (4 – 400 μM) did not change $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into retina cells. However, at concentrations ≥ 100 μM , ebselen blocked the glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into retina cells (*P* < 0.001) reaching levels not statically different from basal influx (absence of glutamate) (Figure 2).

Similar to ebselen, diphenyl telluride did not alter $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retina cells under basal conditions, but reduced the glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx when added at concentrations ≥ 100 μM in the reaction mixture (Figure 3, *P*<0.01). This compound did not afford complete reversion of glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in any concentration used.

As show in Figures 4 and 5, respectively, neither diphenyl diselenide or diphenyl ditelluride were able to interfere with basal or glutamate-stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in the range of tested concentrations (4-400 μM).

Since ebselen was the only chalcogenides that completely block the glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into retinal cell, we decided to evaluate the effect of this compound on the glutamate-induced neuronal injury in chick embryonic retinal cells through the MTT assay. In this investigation we used an experimental protocol of delayed excitotoxic neuronal damage in the isolated chick embryo retina. As described before, the isolated retinas were exposed to glutamate during different periods of time and 24 h after the beginning of exposure, retinas were submitted to

MTT assay. As shown in Figure 6a, when retinas were incubated with 1 mM glutamate for 30 min, there was no difference in MTT reduction when compared to control retinas. Exposure to 1 mM glutamate during 8 or 24 h, decreased the MTT reduction to about 50% when compared with control retinas, incubated 24 h in KBSS, without glutamate ($P < 0.05$). Exposure of retinal explants to glutamate concentrations > 1 mM for 8 h did not cause any additional decrease in MTT reduction (Figure 6b).

Exposure of retinal explants to different concentrations of ebselen for 8 h had no significant effects on MTT reduction (Figure 7a). When ebselen was present during the incubation period with 1 mM glutamate (8 h), the compound did not interfere with the excitotoxic effect of glutamate (Figure 7b). Interestingly, when ebselen (100 and 400 μ M) was added simultaneously with glutamate, but remained in the incubation media even after glutamate removal, it caused a significant increase ($\sim 30\%$, $P < 0.05$) in MTT reduction when compared to retinas treated only with glutamate and (control group) (Figure 7c).

DISCUSSION

In this study we evaluated the effects of three simple diaryl chalcogenides, diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and diphenyl telluride, which have been demonstrated to exhibit antioxidant (Rossato et al., 2002a; Meotti et al., 2004) and neuroprotective activities (Ghisleni et al., 2003), and ebselen, the only seleno-compound used in clinical trials for the treatment of ischemic stroke (Yamaguchi et al., 1998), on glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal explants.

The magnitude of the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ signal, and the simplicity of the experimental system (as compared with electrical recordings), make the Ca^{2+} influx functional test in the retinal embryonic *ex vivo* preparation a most suitable assay for rapid screening of novel glutamate agonists and antagonists (Burgos, 2000).

Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride were previously reported to affect the rat glutamatergic system both *in vitro* and *in vivo* (Nogueira et al., 2001), inhibiting the [^3H]glutamate and [^3H]MK-801 binding to brain synaptic membranes. Also, these compounds were able to inhibit the lipid peroxidation induced by

quinolinic acid, an agonist of the glutamatergic NMDA receptor in rat brain (Rossato et al., 2002a). In our experimental model, these organochalcogenides did not interfere with either basal or glutamate-stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx (Figures 4 and 5). In an early study, the effects of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into rat brain synaptosomes were shown to be rather complex and varied considerably depending on the depolarizing condition of the incubation media (Moretto et al., 2003). Since the alterations in Ca^{2+} flux induced by organochalcogenides can be explained by direct interaction of the compounds with the Ca^{2+} channel proteins or by alterations in membrane depolarization, this lack of activity may be explained in terms of the different experimental conditions and stimulating agent (glutamate) used in the present study.

In contrast to diphenyl ditelluride, diphenyl telluride was able to reduce the glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick embryonic retinal cells at concentrations $\geq 100 \mu\text{M}$ (Figure 3). It is well reported in the literature, that a series of diaryl telluride antioxidants possess extremely potent chain-breaking antioxidant activity in biological and chemical systems (Andersson et al., 1994). The antioxidant capacity of these diaryl tellurides has been ascribed to the ready oxidation of the heteroatom from the divalent to the tetravalent state (telluroxide) (Briviba et al., 1998). These oxides were postulated to react at substantially different rates with reducing agents, such as GSH or ascorbate, to regenerate the diaryl tellurides (Andersson et al., 1994). This mechanism could explain the different effects observed with the two organotellurium compounds evaluated, since the oxidation of the tellurium atom to a telluroxide does not occur with diphenyl ditelluride (Irgolic, 1974).

Ebselen was the only compound that blocked the glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into chick retinal explants when present in the incubation media at concentrations $\geq 100 \mu\text{M}$ (Figure 2). This seleno-compound was not able to modify the basal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx. These results are in agreement with previous reports where ebselen (at high concentrations) decreased Ca^{2+} influx triggered by KCl into rat brain synaptosomes (Moretto et al., 2003), since glutamate can increase cytosolic Ca^{2+} by a number of mechanisms including opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels following membrane depolarization induced by activation of non-NMDA receptors (Otori et al., 2003). In addition, some reports revealed that a variety of free radical scavengers may have a substantial direct effect on NMDA channels, limiting Ca^{2+}

influx and this mechanism alone may account for the neuroprotective actions of these agents (Vergun et al., 2001).

Considering that glutamate appears to induce neuronal death by increasing the intracellular levels of Ca^{2+} and that calcium channel blockers can protect against glutamate-induced neurotoxicity in vitro (Otori et al., 2003), we decided to evaluate a possible neuroprotective effect of ebselen in our experimental model. Ebselen only afforded protection to chick embryonic retinal cells when it was co-incubated with glutamate, and remained in the incubation media even after glutamate removal, until measurement of neuronal damage (Figure 7). These results suggest that besides its capacity of interfering with Ca^{2+} influx, there are other possible mechanisms of neuroprotection involved in the observed effects of ebselen. Probably, the well-know antioxidant properties of ebselen play a critical role against delayed glutamate neurotoxicity.

The results of the present study demonstrate that ebselen can block glutamate-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx and ameliorate neuronal death of chick embryonic retinal cells induced by glutamate, corroborating for understanding the mechanisms underlying the neuroprotective effects of ebselen. Our findings also further solidify the importance of organotellurium compounds as potential protectors against excitotoxicity.

REFERENCES

- Aarts M. M. and Tymianski M. (2003) Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signaling from glutamate receptors. *Biochem Pharmacol.* **66**, 877-886.
- Andersson C. -M., Brattsand R., Hallberg A., Engman L., Perrson J., Moldéus P. And Cotgreave I. (1994). Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Rad. Res.* **20**, 401-410.
- Arundine M. and Tymianski M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**, 325-337.
- Briviba K., Tamler R., Klotz L. -O., Engman L., Cotgreave I. A. and Sies H. (1998) Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite oxidation and nitration reactions. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 817-823.

- Burgos J. S., Barat A. and Ramírez G. (2000) Guanine nucleotides block agonist-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in chick embryo retinal explants. *NeuroReport* **11**, 2303-2305.
- Choi D. W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261-1276.
- Choi D. W. (1994) Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 162-171.
- Coyle J. T. and Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695.
- Engman L. (1989) Expedient synthesis of ebselen and related compounds. *J. Org. Chem.* **54**, 2964-2966.
- Ferreira I. L., Duarte C. B. and Carvalho A. P. (1996) Ca^{2+} influx through glutamate receptor-associated channels in retina cells correlates with neuronal cell death. *Eur. J. Pharmacol.* **302**, 153-162.
- Ghisleni G., Porciúncula L. O., Cimarosti H., Rocha J. B. T., Salbego C. G. and 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.
- Irgolic K. J. (1974) *The organic chemistry of Tellurium* Gordon and Breach Science Publisher, New York.
- Kanski J., Drake J., Aksenova M., Engman L. and Butterfield D. A. (2001) Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(*N, N*-dimethylamino)benzenetellurenyl] propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Res.* **911**, 12-21.
- Knollema S., Elting J. W., Dijkhuizen R. M., Nicolay K., Korf J. and Ter Horst G. J. (1996) Ebselen (PZ51) protects the caudate putamen against hypoxia/ischemia induced neuronal damage. *Neurosci. Res. Comm.* **19**, 47-56.
- Lucas D. R. and Newhouse J. P. (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* **58**, 193-201.
- Meotti F. C., Stangerlin E. C., Zeni G., Nogueira C. W. and Rocha J. B. T. (2004) Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.* **94**, 276-282.

- Moretto M. B., Rossato J. I., Nogueira C. W., Zeni G. and Rocha J. B. T. (2003) Voltage-dependent ebselen and diorganochalcogenides inhibition of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into brain synaptosomes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17**, 154-160.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63.
- Nogueira C. W., Rotta L. N., Perry M. L., Souza D. O. and Rocha J. B. T. (2001). Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system "in vitro" and "in vivo". *Brain Res.* **906**, 157-163.
- Nogueira C. W., Quinhones E. B., Jung E. A. C., Zeni G. and Rocha J. B. T. (2003) Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* **52**, 56-63.
- Ogawa A., Yoshimoto T., Kikuchi H., Sano K., Saito I., Yamaguchi T. and Yasuhara H. (1999) Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: A placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc. Dis.* **19**, 112-118.
- Olney J. W. (1969) Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721.
- Olney J. W. (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: *Kainic acid as a tool in neurobiology*, eds: McGeer E. G. and Olney J. W. Raven Press, New York.
- Otori Y., Kusaka S., Kawasaki A., Morimura H., Miki A. and Tano Y. (2003) Protective effect of nilvadipine against glutamate neurotoxicity in purified retinal ganglion cells. *Brain Res.* **961**, 213-219.
- Ozawa S., Kamiya H. and Tsuzuki K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **54**, 581-618.
- Parnham M. J. and Graf E. (1991) Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog. Drug Res.* **36**, 10-47
- Paulmier C. (1986) Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis. *New York: Pergamon Press*, 463pp.
- Petragnani N. (1994) Tellurium in Organic Synthesis. *San Diego: Academic Press*, 248pp.
- Prauchner C. A., Agostini A. N., Morimoto A., Augusti P. R., Unfer T. C., Zeni G. Z., Mello C. F. and Emanuelli T. (2004) Dimethyl sulfoxide and ebselen prevent convulsions induced by 5-aminolevulinic acid. *Neurochem. Res.* **29** (in press).

- Romano C., Price M. T. and Olney J. W. (1995) Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by excitatory amino acid agonists in isolated retina. *J. Neurochem.* **65**, 59-67.
- Romano C., Chen Q. and Olney J. W. (1998) The intact isolated (*ex vivo*) retina as a model system for the study of excitotoxicity. *Prog. Ret. Eye Res.* **17**, 465-483.
- Rossato J. I., Ketzer L. A., Centurião F. B., Silva S. J. N., Lüdtke D. S., Zeni G., Braga A. L., Rubin M. A. and Rocha J. B. T. (2002a) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* **27**, 297-303.
- Rossato J. I., Zeni G., Mello C. F., Rubin M. A. and Rocha J. B. T. (2002b) Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intrastriatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosc. Lett.* **318**, 137-140.
- Schindler A. F., Olson E. C., Spitzer N. C. and Montal M. (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* **16**, 6125-6133.
- Sies H. (1993) Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Rad. Biol. Med.* **14**, 313-323.
- Siesjö B. K. (1989) Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1**, 165-211.
- Vergun O., Sobolevsky A. L., Yelshansky M. V., Keelan J., Khohorov B. I. and Duchon M. R. (2001) Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurons in culture. *J. Physiol.* **531**, 147-163.
- Yamaguchi T., Sano K., Takakura K., Saito I., Shinohara Y., Asano T. and Yasuhara H. (1998) Ebselen in acute ischemic stroke: A placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Stroke* **29**, 12-17.

LEGENDS

Figure 1. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx (nmol/ retina/ 30 min) into chick embryonic retinal cells as a function of glutamate concentration. Retinal explants were obtained as described in Materials and Methods section and incubated in KBSS at pH 7.4 containing 1.25 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ and the indicated glutamate concentrations. Data are expressed as mean \pm

SEM for three independent experiments carried out in duplicate. Duncan's multiple range test revealed a significant effect of glutamate from 0.4 to 4 mM.

Figure 2. Influence of ebselen (0-400 μM) on basal (open circles) and glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx (1 mM, black squares) (nmol/ retina/ 30 min) into chick embryonic retinal cells. All assays were performed in the presence of 1% DMSO, since it was used to solubilize ebselen. Data are expressed as mean \pm SEM for three independent experiments carried out in duplicate. * $P \leq 0.001$, different from glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in the absence of ebselen by Duncan's multiple range test.

Figure 3. Influence of diphenyl telluride (0-400 μM) on basal (open circles) and glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx (1 mM, black squares) (nmol/ retina/ 30 min) into chick embryonic retinal cells. All assays were performed in the presence of 1% DMSO, since it was used to solubilize diphenyl telluride. Data are expressed as mean \pm SEM for three independent experiments carried out in duplicate. * $P \leq 0.01$, different from basal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and ** $P \leq 0.01$, different glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in the absence of diphenyl telluride by Duncan's multiple range test.

Figure 4. Influence of diphenyl diselenide (0-400 μM) on basal (open circles) and glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx (1 mM, black squares) (nmol/ retina/ 30 min) into chick embryonic retinal cells. All assays were performed in the presence of 1% DMSO, since it was used to solubilize diphenyl diselenide. Data are expressed as mean \pm SEM for three independent experiments carried out in duplicate.

Figure 5. Influence of diphenyl ditelluride (0-400 μM) on basal (open circles) and glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx (1 mM, black squares) (nmol/ retina/ 30 min) into chick embryonic retinal cells. All assays were performed in the presence of 1% DMSO, since it was used to solubilize diphenyl ditelluride. Data are expressed as mean \pm SEM for three independent experiments carried out in duplicate.

Figure 6. Effect of glutamate on neuronal injury in isolated chick embryo retina. Retinas were exposed to (a) 1 mM glutamate during the indicated periods of time or to (b) the indicated glutamate concentrations for 8 h. Twenty-four hours after the

beginning of exposure, retinas were submitted to MTT assay as described in Materials and Methods section. All data were calculated as % of control, determined in the absence of glutamate. Data are expressed as mean \pm SEM for eight independent experiments carried out in triplicate. * $P < 0.05$, different from control (without glutamate) by Duncan's multiple range test.

Figure 7. Effect of ebselen (0-400 μ M) on neuronal injury in isolated chick embryo retina. Retinas were exposed to (a) different concentrations of ebselen for 8 h; to (b) different concentrations of ebselen in the presence of glutamate (1 mM) for 8 h or to (c) different concentrations of ebselen in the presence of glutamate (1 mM, for 8 h) and ebselen remained in the incubation media until 24 h after the beginning of exposure. Twenty-four hours after the beginning of exposure to ebselen and/or glutamate, retinas were submitted to MTT assay described in Materials and Methods section. All assays were performed in the presence of 1% DMSO, since it was used to solubilize ebselen. Data were calculated as % of control, determined in the absence of glutamate (a) or in the presence of 1 mM glutamate (b and c). Data are expressed as mean \pm SEM for twelve independent experiments carried out in triplicate. * $P < 0.05$, different from control by Duncan's multiple range test.

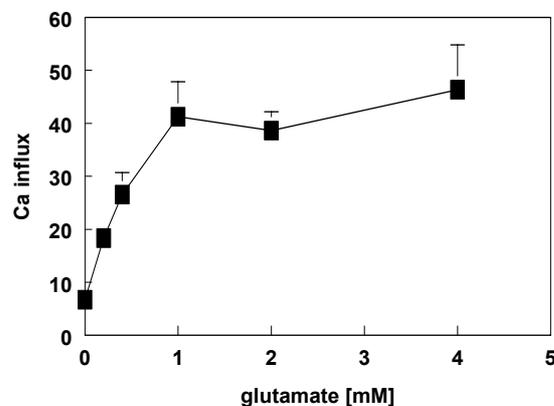


Figure 1.

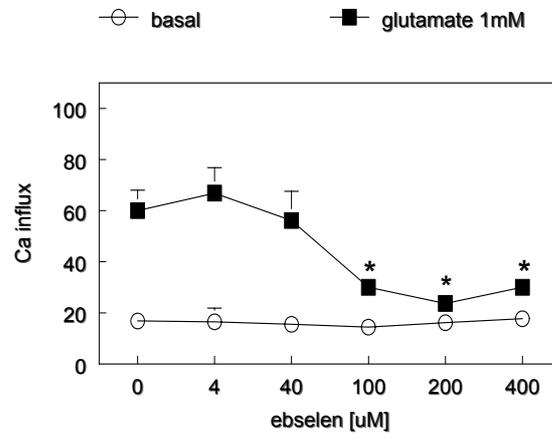


Figure 2.

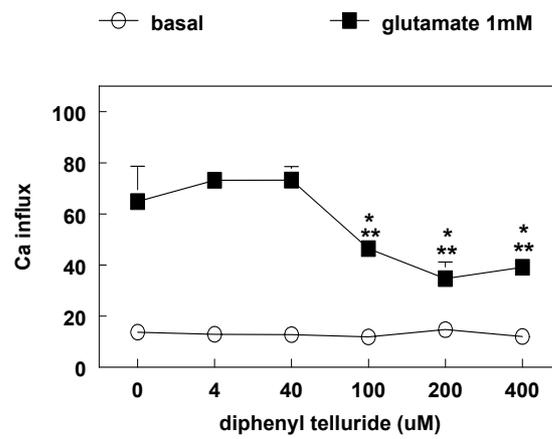


Figure 3.

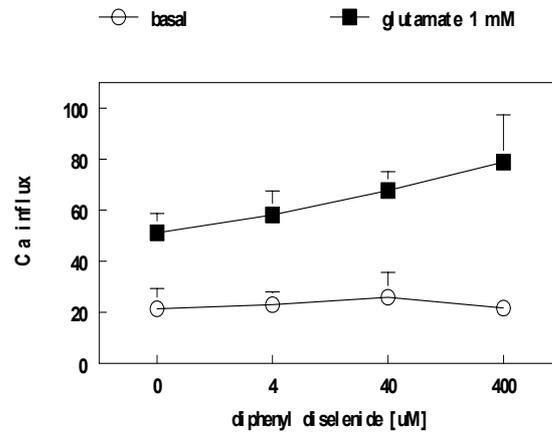


Figure 4.

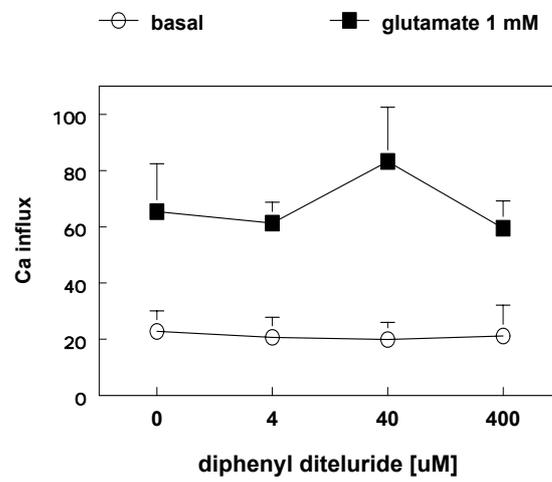


Figure 5.

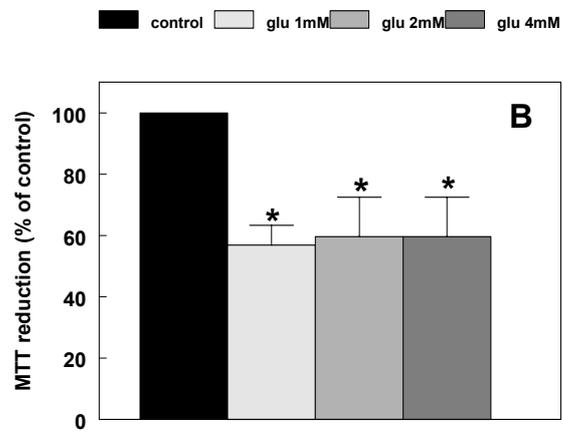
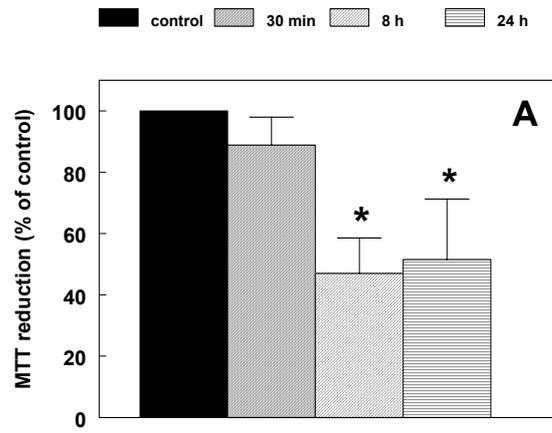


Figure 6.

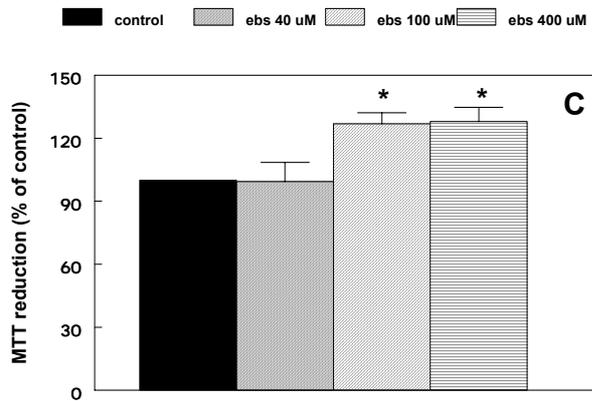
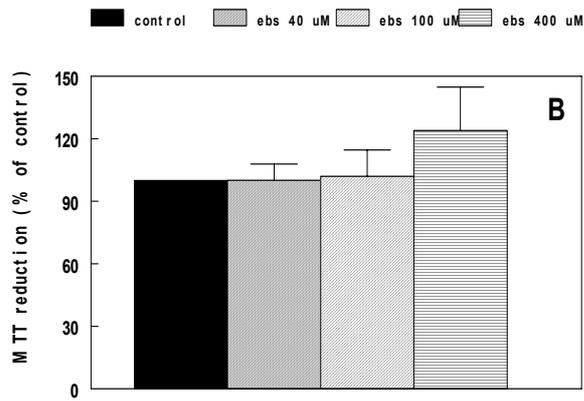
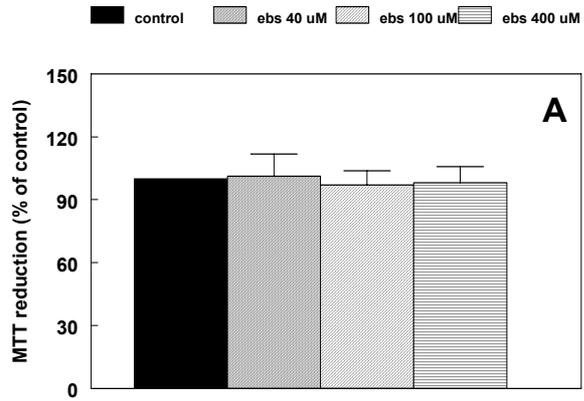


Figure 7.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

IV-DISCUSSÃO

A excitotoxicidade é um dos mais extensivamente estudados processos de morte celular neuronal, e tem participação importante em muitas desordens do SNC, incluindo isquemia, trauma e doenças degenerativas (Sattler & Tymianski, 2001). Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do glutamato permanecerem incertos, existe um consenso geral de que seja um processo dependente de Ca^{2+} (Sattler & Tymianski, 2001). Além do excessivo influxo de Ca^{2+} , a morte celular excitotóxica envolve liberação de Ca^{2+} de organelas internas, produção de radicais de oxigênio e apoptose (Mattson, 2003). Apesar de quase todos os subtipos de receptores glutamatérgicos terem sido apontados como mediadores da morte celular excitotóxica, parece que receptores NMDA têm papel importante, principalmente devido a sua alta permeabilidade a íons Ca^{2+} (Sattler & Tymianski, 2001).

De fato, o glutamato aumentou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de retinas isoladas de embriões de pintos de maneira dependente da dose (Figura 1). Quando as retinas foram expostas ao glutamato (1 mM) por 30 min, o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aumentou cerca de 6 vezes quando comparado com o influxo visto nas retinas mantidas nas condições basais (Figura 1). Contudo, quando as retinas foram expostas ao glutamato nas mesmas condições, não houve diferença na viabilidade neural, medida pela redução do MTT (Figura 6A). O glutamato foi capaz de induzir dano neural quando ficou presente no meio de incubação por 8 horas ou mais (Figura 6A).

Uma explicação razoável para tal fato seria a hipótese da especificidade da fonte de Ca^{2+} (Sattler & Tymianski, 2000), que sustenta a idéia de que nem toda entrada excessiva de Ca^{2+} para dentro da célula seja tóxica; sendo o efeito tóxico dependente da fonte e local de entrada dos íons Ca^{2+} , uma vez que diferentes rotas sinalizadoras e processos fisiológicos dependentes de Ca^{2+} seriam ativados. Corroborando com tal hipótese, Ferreira e colaboradores (1996) demonstraram que apesar da despolarização com K^+ ser mais eficiente em elevar o influxo de Ca^{2+} do que glutamato, NMDA ou KA, mais neurônios morreram sob ativação dos receptores glutamatérgicos.

O ebselen, um composto orgânico lipossolúvel de Se que possui atividade mimética da glutathione peroxidase (Muller et al., 1984), foi capaz de bloquear o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado pelo glutamato nas retinas isoladas de pinto (Figura 2). Em concentrações $\geq 100 \mu\text{M}$, este composto reduziu o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ para valores estatisticamente iguais aos encontrados para as retinas em condições basais. Foi demonstrado recentemente, o efeito protetor deste composto contra a neurotoxicidade do glutamato em culturas primárias de neurônios cerebelares granulares (Porciúncula et al., 2001), que se acredita ser mediada pela ativação de receptores NMDA (Tsuzuki et al., 1989) e em modelo experimental da Doença de Parkinson (Moussaoui et al., 2000). O efeito demonstrado neste trabalho pelo ebselen poderia ser atribuído a uma interação direta com as proteínas do canal de Ca^{2+} , conforme proposto por Moretto e colaboradores (2003) ou à sua capacidade de atuar como modulador no sítio de modulação redox dos receptores NMDA (Herin et al., 2001). Uma vez que, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, o ebselen só foi capaz de demonstrar efeito protetor contra a toxicidade do glutamato (viabilidade neural) quando esteve no meio de incubação durante a exposição ao agonista e permaneceu após a retirada do mesmo (Figura 7), é muito provável que os efeitos demonstrados pelo ebselen neste trabalho sejam devido a sua já reportada atividade antioxidante (Rossato et al. 2002a; Rossato 2002b). Esta hipótese é reforçada pelo fato de que agentes antioxidantes podem ter efeito direto sobre canais de receptores NMDA, limitando o influxo de Ca^{2+} , o que contribuiria para os efeitos protetores demonstrados pelos mesmos (Vergun et al., 2001).

De fato, muitos trabalhos sustentam que a seqüência de eventos excitotóxicos que ocorre depois da ativação dos receptores glutamatérgicos seria o acúmulo intracelular de elevados níveis de Ca^{2+} , disfunção mitocondrial (Schinder et al., 1996; White & Reynolds, 1996), e a subsequente formação de espécies reativas ao oxigênio, levando à peroxidação lipídica (Azbill, et al., 1997).

Ao contrário do que se esperava, os compostos disseleneto de difenila e ditelureto de difenila não tiveram nenhum efeito sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em retinas isoladas de embriões de pinto (Figuras 4 e 5). Uma vez que estes compostos foram capazes de inibir a união específica de glutamato aos seus receptores, bem como a união de MK-801 ao subtipo de receptor NMDA em sinaptossomas de cérebro de rato (Nogueira et al., 2001) e demonstraram atividade antioxidante in vitro (Meotti et

al., 2004; Rossato et al., 2002b), esperávamos ver um efeito inibitório dos mesmos em nosso modelo experimental.

Já o composto telureto de difenila foi capaz de reduzir o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado pelo glutamato em células de retina isolada de pinto (Figura 3). Está bem reportado na literatura que diaril teluretos atuam como neutralizadores de agentes oxidantes reativos, como peróxido de hidrogênio, hipoclorito e radicais peroxil; e que são capazes de inibir peroxidação lipídica em sistemas químicos e biológicos (Andersson et al., 1993; Andersson et al., 1994). Estes compostos também possuem atividade mimética da glutathione peroxidase e são efetivos contra o radical peroxinitrito (Briviba et al., 1998). Acredita-se que tais atividades demonstradas por diaril teluretos sejam devido à oxidação do heteroátomo do estado divalente para tetravalente pelo peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos, formando teluróxido (Briviba et al., 1998; Andersson et al., 1993). Isto poderia explicar a diferença de efeitos observada neste trabalho entre os compostos orgânicos de Te, uma vez que diaril diteluretos não sofrem a reação de formação de teluróxido, e sim a formação de telurol pela quebra da ligação Te-Te (Irgolic, 1974).

De maneira geral, os resultados deste trabalho vêm corroborar com a crescente pesquisa relacionada às possíveis aplicações biológicas e farmacológicas de compostos orgânicos de Te e Se nas mais variadas patologias, principalmente em desordens neurológicas relacionadas ao stress oxidativo.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

V-CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o glutamato estimula o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em retinas isoladas de embriões de pintos, de maneira dependente da concentração. Uma vez que todos os subtipos de receptores ionotrópicos do glutamato estão expressos na retina de vertebrados, pode-se dizer que há uma participação de receptores AMPA/KA e principalmente NMDA no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ medido em nossas condições experimentais.

O glutamato só foi capaz de alterar a viabilidade neuronal quando esteve presente no meio de incubação por 8 h ou mais. Isto indica que o glutamato pode estar provocando despolarização da membrana, com a conseqüente abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem, que contribuiriam para o observado aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Então, o influxo transitório de Ca^{2+} observado nos primeiros 30 minutos de exposição ao glutamato não estaria envolvido com rotas transdutoras de sinais responsáveis por iniciar eventos tóxicos; ou ainda, neste estágio a célula ainda poderia contar com mecanismos de tamponamento ou de seqüestramento de Ca^{2+} suficientes por manter sua integridade.

O ebselen foi capaz de bloquear o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por glutamato; mas protegeu as células das retinas isoladas de embriões de pinto contra a perda de viabilidade neuronal somente quando permaneceu no meio de incubação após a retirada do glutamato. Estes resultados indicam que possivelmente, o ebselen estaria atuando ao nível de modulação redox dos receptores NMDA, reduzindo o influxo de Ca^{2+} ; e ainda protegeria contra a excitotoxicidade tardia, possivelmente devido a sua ação antioxidante.

Os organocalcogênios de estrutura simples, disseleneto de difenila e ditelureto de difenila, não apresentaram nenhum efeito sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por glutamato. Ao contrário, o telureto de difenila foi capaz de reduzir o influxo de Ca^{2+} estimulado por glutamato em retinas isoladas de pinto.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnew W. F. (1972) Transplacental uptake of ¹²⁷ tellurium studied by whole-body autoradiography. *Teratol.* **6**, 331-338.
- Alberdi E., Sánchez-Gomez M. V., Marino A. & Matute C. (2002) Ca²⁺ influx through AMPA or kainate receptors alone is sufficient to initiate excitotoxicity in cultured oligodendrocytes. *Neurobiol. Dis.* **9**, 234-243.
- Allan C. B., Lacourciere G. M. & Stadman T. C. (1999) Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Ann. Rev. Nutr.* **19**, 1-16.
- Allcorn S., Catsicas M. & Mobbs P. (1996) Developmental expression and self-regulation of Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors in the embryonic chick retina. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 2499-2510.
- Andersson C. M., Hallberg A., Brattsand R., Cotgreave I. A., Engman L. & Persson J. (1993) Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, 2553-2558.
- Andersson C. M., Brattsand R., Hallberg A., Engman L., Persson J. Moldéus P. & Cotgreave I. A. (1994) Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Radic. Res.* **20**, 401-410.
- Ankarcrona M., Dypbukt J. M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S. A. & Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961-973.
- Arteel G. E., Briviba K. & Sies H. (1999) Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* **445**, 226-233.
- Arteel G. E. & Sies H. (2001) The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 153-158.
- Arundine M. and Tymianski M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**, 325-337.
- Arundine M. & Tymianski M. (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci.* **61**, 657-68.
- Azbill R. D., Mu X., Bruce-Keller A. J., Mattson M. P. & Springer J. E. (1997) Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* **765**, 283-290.

- Bains J. S. & Shaw C. A. (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res. Rev.* **25** 335-358.
- Barnstable C. J (1993) Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**, 520-525.
- Beal M. F. (1992) Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 657-662.
- Beal M. F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* **38**, 357-366.
- Beal M. F. (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *TINS* **23**, 298-304.
- Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A. & Freeman B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624.
- Behne D. & Kyriakopoulos A. (2001) Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 453-473.
- Beutner G., Sharma V. K., Giovannucci D. R., Yule D. I. & Sheu S. S. (2001) Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 21482-21488.
- Bondy S. C. (1995) The relation of oxidative stress and hyperexcitation to neurological disease. *P.S.E.B.M.* **208**, 337-345.
- Bräuer A. U. & Savaskan N. E. (2004) Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element. *Rev. Neurosci.* **15**, 19-32.
- Briviba K., Tamler R., Klotz L. O., Engman L. Cotgreave I. A. & Sies H. (1998) Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 817-823.
- Burgos J. S., Barat A. & Ramírez G. (2000) Guanine nucleotides block agonist-driven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in chick embryo retinal explants. *NeuroReport* **11**, 2303-2305.
- Cadenas E. & Sies H. (1985) Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv. Enzyme Regulation* **23**, 217-237.

- Chen Y., Ying W., Simma V., Copin J. C., Chan P. H. & Swanson R. A. (2000) Overexpression of Cu, Zn superoxide dismutase attenuates oxidative inhibition of astrocyte glutamate uptake. *J. Neurochem.* **75**, 939-945.
- Chen J. & Berry M. J. (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J. Neurochem.* **86**, 1-12.
- Choi D. W. (1988a) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
- Choi D. W. (1988b) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* **11**, 465-469.
- Choi D. W. (1990) Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **2**, 105-147.
- Choi D. W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261-1276.
- Choi D. W. (1994) Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 162-171.
- Clayton G. D. & Clayton F. E. (1981) Patty's industrial hygiene and toxicology. eds, John Wiley, Chichester.
- Comasseto J. V. (1983) Vinylc selenides. *J. Organomet. Chem.* **253**, 131-181.
- Conn P. J. (2003) Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci.* **1003**, 12-21.
- Conn P. J. & Pinn J. P. (1997) Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205-237.
- Cotgreave I. A., Sandy M. S., Berggren M., Moldéus P. M. & Smith M. T. (1987) N-acetylcysteine and glutathione dependent protective effect of PZ51 (ebselen) against diquat induced cytotoxicity in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2899-2904.
- Cotgreave I. A., Moldéus P., Engman L. & Hallberg A. (1991) The correlation of oxidation potentials of structurally related dibenzo[1,4]dichalcogenides to their antioxidance capacity in biological systems undergoing free radical-induced lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1481-1485.
- Cotman C. W., Monaghan D. T., Ottersen O. P. & Storm-Mathisen J. (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* **10**, 273-280.

- Coyle J. T., Bird S. J., Evans R. H., Gulley R. L., Nadler J. V., Nicklas W. J. & Olney J. W. (1981) Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity and mechanisms of action. *Neurosci. Res. Prog. Bull.* **19**, 331-427.
- Coyle J. T. & Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695.
- Danbolt N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* **65**, 1-105.
- Dawson V. L., Dawson T. M., London E. D., Bredt D. S. & Snyder S. H. (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6368-6371.
- Deutch A. Y. & Roth R. H. (1999) Neurotransmitters. Em: *Fundamental Neuroscience*, eds: Zigmond M. J., Bloom F. E., Landis S. C., Roberts J. L. and Squire L. R. Academic Press, San Diego.
- Deuticke B., Lütke-meier P. & Pose B. (1992) Tellurite-induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. *Biochem. Biophys. Acta* **1109**, 97-107.
- Dichter M. A. & Wilcox K. S. (1997) Excitatory synaptic transmission. Em: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, eds: Engel Jr J. and Pedley T. A. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Dingledine R. & McBain C. J. (1994) Excitatory amino acid transmitters. Em: *Basic Neurochemistry*, eds: Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W. and Molinoff P. B. Raven Press, New York.
- Diplock A. T. (1994) Antioxidants and disease prevention. *Mol. Aspects Med.* **15**, 293-376.
- Duvoisin R. M., Zhang C. & Ramonell K. (1995) A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J. Neurosci.* **15**, 3075-3083.
- Dykens J. A., Stern A. & Trenkner E. (1987) Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *J. Neurochem.* **49**, 1222-1228.
- Emerit J., Edeas M. & Bricaire F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacot.* **58**, 39-46.
- Engman L., Stern D., Cotgreave I. A. & Andersson C. M. (1992) Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9737-9743.

- Engman L., Persson J., Vessman K., Ekström M., Berglund M. & Andersson C-M. (1995) Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Rad. Biol. Med.* **19**, 441-452.
- Feltre R. (1995) Classificação periódica dos elementos. Em: *Química Volume 1*, eds: Muramatsu D. F. N., Seballos R. Editora Moderna Ltda, São Paulo.
- Ferreira I. L., Duarte B. D. & Carvalho A P. (1996) Ca²⁺ influx through glutamate receptor-associated channels in retina cells correlates with neuronal cell death. *Eur. J. Pharmacol.* **302**, 153-162.
- Fischer H. & Dereu, N. (1987) Mechanism of the catalytic reduction of hidroperoxides by ebselen: a selenium 77 NMR study. *Buul. Soc. Chim. Belg.* **96**, 757-768.
- Flohé L. (1989) The selenoprotein glutathione peroxidase. Em: *Glutathione*, eds: Dolphin D., Poulson R. and Avramovic O. John Wiley & Sons, New York.
- Friedlander R. M. (2002) Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Eng. J. Med.* **348**, 1365-1375.
- Garthwaite G. & Garthwaite J. (1986) Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependences of calcium concentration. *Neurosci. Lett.* **66**, 193-198.
- 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 immunocontent. *Brain Res.* **986**, 196-199.
- Gmelin, C. H. R. (1824) Versuche über die Wirkungem des Baryts, Strontians, u.s.w auf den thierischen organismus. Tübingen 1824, 43. (Citado por Chalenger F.: Biological methylation. *Chem. Rev.* 36, 315, 1945.
- Goodrum J. F. (1998) Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. *Neurochem. Res.* **23**, 1313-1319.
- Greene J. G. & Greenamyre J. T. (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. Neurobiol.* **48**, 613-634.
- Goodrum F. F. (1998) Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. *Neurochem. Res.* **23**, 1313-1319.
- Guyton A. C. (1988) O olho. Em: *Fisiologia Humana* Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
- Haenen G. R. M. M., De Rooij B. M., Vermeulen N. P. E. & Bast A. (1990) Mechanism of the reaction of ebselen with endogenous thiols. Dihydrolipoate is

a better cofactor than glutathione in the peroxidase activity of ebselen. *Mol. Pharmacol.* **37**, 412-422.

Halliwell B. & Gutteridge J. M. C. (1999) Antioxidants defenses. Em: *Free radicals in biology and medicine*, eds: Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Oxford University Press, New York.

Hansen H. (1853) Versuch über die Wirkung des tellurs auf den lebeden organismus. Liebigs *Annale Chem. Pharm*, 86, 208. (Citado por Toxicity of Industrial Metals, 1969).

Hartley D. M. & Choi D. W. (1989) Delayed rescue of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 752-758.

Hartley D. M., Kurth M. C., Bjerkness L., Weiss J.H. & Choi D. W. (1993) Glutamate receptor-induced Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J. Neurosci.* 13, 1993-2000.

Heath P. R. & Shaw P.J. (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* **26**, 438-58.

Herin G. A., Du S. & Aizenman E. (2001) The neuroprotective ebselen modifies NMDA receptor function via the redox modulatory site. *J. Neurochem.* **78**, 1307-1314.

Hudspith M. J. (1997) Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. *Br. J. Anaesth.* **78**, 731-747.

Huettner J. E. (1990) Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. *Neuron* **5**, 255-266.

Huettner J. E. (2003) Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol.* **70**, 387-407.

Imam S. Z. & Ali S. F. (2000) Selenium, an antioxidant, attenuates methamphetamine-induced dopaminergic toxicity and peroxynitrite generation. *Brain Res.* **855**, 186-191.

Imam S. Z., El-Yazal J., Newport G. D., Itzhak Y., Cadet J. L., Slikker W. Jr. & Ali S. F. (2001) Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. *Ann. NY Acad. Sci.* **939**, 366-388.

- Irgolic K. J. (1974) *The organic chemistry of Tellurium* Gordon and Breach Science Publisher, New York.
- Izumi Y., Benz A. M., Clifford D. B. & Zorumski C. F. (1992) Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **135**, 227-230.
- Kadu D. A., Goldberg M. P. & Choi D. W. (1991) Antagonism of non-NMDA receptors augments the neuroprotective effect of NMDA receptor blockade in cortical cultures subjected to prolonged deprivation of oxygen and glucose. *Brain Res.* **554**, 344-347.
- Kanda T., Engman L., Cotgreave I. A. & Powis G. (1999) Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. *J. Org. Chem.* **64**, 8161-8169.
- Kannurpatti S. S., Sanganahalli B. G. Sudha Mishra, Joshi P. G. & Joshi N. B. (2004) Glutamate-induced differential mitochondrial response in young and adult rats. *Neurochem. Int.* **44**, 361-369.
- Kanski J., Drake J., Aksenova M., Engman L. & Butterfield D. A. (2001) Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino) benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Res.* **911**, 12-21.
- Kim J. P. & Choi D. W. (1987) Quinolate neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience* **23**, 423-432.
- Kim J. P., Koh J. & Choi D. W. (1987) L-Homocysteate is a potent neurotoxin on cultured cortical neurons. *Brain Res.* **437**, 103-110.
- Kim H. C., Jhoo W. K., Shin E. & Bing G. (2000) Selenium deficiency potentates methamphetamine-induced nigral neuronal loss; comparison with MPTP model. *Brain Res.* **862**, 247-252.
- Kleckner N. W. & Dingledine R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* **241**, 835-837.
- Koh J. & Choi D. W. (1991) Selective blockade of non-NMDA receptors does not block rapidly triggered glutamate-induced neuronal death. *Brain Res.* **548**, 318-321.
- Komuro H. & Rakic P. (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* **160**, 95-97.

- Kondoh S., Negasawa S., Kawanishi M., Yamagushi K., Kajimoto S. & Ohta T. (1999) Effects of ebselen on cerebral ischemics and reperfusion evaluated by microdialysis. *Neurol. Res.* **21**, 682-686.
- Krieger C. & Duchen M. R. (2002) Mitochondria, Ca²⁺ and neurodegenerative disease. *Eur. J. Pharmacol.* **447**, 177-188.
- Kristal B. S. & Dubinsky J. M. (1997) Mitochondrial permeability transition in the central nervous system: induction by calcium cycling dependent and independent pathways. *J. Neurochem.* **69**, 524-534.
- Kurth M. C., Weiss J. H. & Choi, D. W. (1989) Relationship between glutamate-induced ⁴⁵Ca influx and resultant neuronal injury in cultured cortical neurons. *Neurology* **39**, 217.
- Lee J., Chan S. L., Lu C., Lane M. A. & Mattson M. P. (2002) Phenformin suppresses calcium responses to glutamate and protects hippocampal neurons against excitotoxicity. *Exp. Neurol.* **175**, 161-167.
- Lei S. Z., Pan Z. H., Aggarwal S. K., Chen H-S. V., Hartman J., Sucher N. J. & Lipton S. A. (1992) Effect of nitric oxide production on redox modulatory site on the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* **8**, 1087-1099.
- Levine R. L. (1983) Oxidative modification of glutamine-synthase. *J. Biol. Chem.* **258**, 11826-11827.
- Lipton S. A., Choi Y-B., Pan Z. H., Lei S. Z., Chen H. S., Sucher N. J., Loscalzo J., Singel D. J. & Stamler J. S. (1993) A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of NO and related nitroso-compounds. *Nature*, **364**, 626-632.
- Lipton S. A. & Rosenberg P. A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng. J. Med.* **330**, 613-622.
- Lobner D. & Lipton P. (1993) Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the CA1 region of the rat hippocampal slice during in vitro ischemia: relationship to electrophysiological cell damage. *J. Neurosci.* **13**, 4861-4871.
- Lucas D. R. & Newhouse J. P. (1957) The toxic effects of sodium of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* **58**, 193-201.
- MacDermott A. B., Mayer M. L., Westbrook G. L., Smith S. J. & Barker J. L. (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic Ca²⁺-concentrations in cultured spinal cord neurons. *Nature (London)* **321**, 519-522.

- Maiorino M., Roveri A., Coassin M. & Ursini F. (1988) Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase-like activity of ebselen (PZ51). *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2267-2271.
- Maiorino M., Roveri A. & Ursini F. (1992) Antioxidant effect of ebselen (PZ51): Peroxidase mimetic activity on phospholipid and cholesterol hydroperoxides vs. free radical scavenger activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 404-409.
- Maher P. (2001) How protein kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. *J. Neurosci.* **21**, 2929-2938.
- Manev H., Favaron M., Guidotti A. & Costa E. (1989) Delayed increase of Ca²⁺ elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol. Pharmacol.* **36**, 106-112.
- Masumoto H. & Sies H. (1996) The reaction of ebselen with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 262-267.
- Masumoto H., Kissner R., Koppenol W. H. & Sies H. (1996) Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite. *FEBS Lett.* **398**, 179-182.
- Mattson M. P. (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* **3**, 65-94.
- Meotti F. C., Stangherlin E. C., Zeni G., Nogueira C. W. & Rocha J. B. T. (2004) Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.* **94**, 276-282.
- Meldrum B. S., Akbar M. T. & Chapman A. G. (1999) Glutamate transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* **36**, 189-204.
- Meldrum B. S. (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* **130**, 1007S-1015S.
- Miyamoto M., Murphy T. H., Schnaar R. L. & Coyle J. T. (1989) Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 1132-1140.
- Miyamoto M. & Coyle J. (1992) Idebenone attenuates neuronal degeneration induced by intrastriatal injections of excitotoxins. *Exp. Neurol.* **108**, 38-54
- Michaelis R. L. & Rothman S. M. (1990) Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci.* **10**, 283-292.
- Monyer H., Hartley D.M. & Choi D. W. (1990) 21-Aminosteroids attenuate excitotoxic neuronal injury in cortical cell cultures. *Neuron* **5**, 121-126.

- Moretto M. B., Rossato J. I., Nogueira C. W., Zeni G. & Rocha J. B. T. (2003) Voltage-dependent ebselen and diorganochalcogenides inhibition of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into brain synaptosomes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17**, 154-160.
- Morgenstern R., Cotgreave I. A. & Engman L. (1992) Determination of the relative contributions of the diselenide and selenol forms of ebselen in the mechanism of its glutathione peroxidase-like activity. *Chem. –Biol. Interact.* **84**, 77-84.
- Mosinger J. L., Price M.T., Bai H. I., Xiao H. Wozniak D. F & Olney J. W. (1991) Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required to optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Exp. Neurol.* **113**, 10-17.
- Moussaoui S., Obinu M., Daniel N., Reibaud M., Balchard V. & Imperato (2000) The antioxidant ebselen prevents neurotoxicity and clinical symptoms in a primate model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **166**, 235-245.
- Müller A., Cadenas E., Graf P. & Sies H. (1984) A novel biologically active seleno-organic compound I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ51 (Ebselen). *Biochem. Pharmacol.* **33**, 3235-3239.
- Müller A., Gabriel H. & Sies H. (1985) A novel biologically active selenoorganic compound. IV. Protective glutathione-dependent effect of PZ 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1185.
- Murphy S. N., Thayer S. A. & Miller R. J. (1987) The effects of excitatory amino acids on intracellular calcium in single mouse striatal neurons in vitro. *J. Neurosci.* **7**, 4145-4158.
- Nachsen D. A., Sanchez-Armass S. & Weinstein A. M. (1986) The regulation of cytosolic calcium in rat brain synaptosomes by sodium-dependent calcium efflux. *J. Physiol. (London)* **381**, 17-28.
- Nakanishi S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* **258**, 597-603.
- Navarro-Alarcón M. & Lopez-Martinez M. C. (2000) Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci. Tot. Environ.* **249**, 347-371.
- Néve J. (1996) Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Risk* **3**, 42-47.

- Nicholls D. G. (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr Mol Med.* **4**, 149-177.
- Nicholls D. G. & Budd S. L. (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* **80**, 315-360.
- Noguchi N., Yoshida Y., Kaneda H., Yamamoto Y. & Niki E. (1992) Action of ebselen as an antioxidant against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 39-44.
- Nogueira C. W., Rotta L. N., Perry M. L., Souza D. O. & Rocha J. B. T. (2001) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system "in vitro" and "in vivo". *Brain Res.* **906**, 157-163.
- Nogueira C. W., Quinhones E. B., Jung E. A. C., Zeni G. & Rocha J. B. T. (2003) Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* **52**, 56-63.
- Nowak J. Z. (1988) The isolated retina as a model of the CNS in pharmacology. *Trends Pharm. Sci.* **9**, 80-82.
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A. & Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-465.
- Ogawa A., Yoshimoto T. & Kikuchi H. (1999) Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc. Dis.* **9**, 112-118.
- Ogura A., Miyamoto M. & Kudo Y. (1988) Neuronal death in vitro: parallelism between survivability of hippocampal neurones and sustained elevation of cytosolic Ca²⁺ after exposure to glutamate receptor agonist. *Exp. Brain Res.* **73**, 447-458.
- Okamoto N., Hori S., Akazawa C., Hayashi Y., Shigemoto K., Mizuno N. & Nakanishi S. (1994) Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J. Biol. Chem.* **269**, 1231-1236.
- Olney J. W. (1969) Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721.
- Olney J. W. (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. Em: *Kainic acid as a tool in neurobiology*, eds: McGeer E. G., Olney J. W. and McGeer P. L. Raven Press, New York.

- Ozawa S., Kamiya H. & Tsuzuki K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **54**, 581-618.
- Parnham M. J. (1996) The pharmaceutical potential of seleno-organic compounds. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **5**, 861-870.
- Parnham M. J. & Graf E. (1991) Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog. Drug Res.* **36**, 10-47.
- Parnham M. J. & Sies H. (2000) Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **9**, 607-619.
- Pazdernik T. L., Layton M., Nelson S. R. & Samson F. E. (1992) The osmotic/calcium stress theory of brain damage: Are free radicals involved? *Neurochem. Res.* **17**, 11-21.
- Pellegrini-Campietro D. E., Cherice G., Alesiani M., Carla V. & Moroni F. (1988) excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.* **51**, 1960-1963.
- Pellerin L. & Wolfe L. S. (1991) Release of arachidonic acid by NMDA-receptor activation in the rat hippocampus. *Neurochem. Res.* **16**, 983-989.
- Peng T. I. & Greenamyre J. T. (1998) Privileged access to mitochondria of calcium influx through NMDA receptors. *Mol. Pharmacol.* **53**, 974-980.
- Porciúncula L. O., Rocha J. B. T., Boeck C. R., Vendite D. & Souza D. O. (2001) Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* **299**, 217-220.
- Porciúncula L. O., Rocha J. B. T., Cimarosti H., Vinadé L., Ghisleni G., Salbego C G. & Souza D. O. (2003) Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immuncontent of inducible nitric oxide synthase. *Neurosci. Lett.* **346**, 101-104.
- Price D. L. (1999) New order from neurological disorders. *Nature* **399**, A3-A5.
- Puttfarcken P. S., Getz R. L. & Coyle J. T. (1993) Kainic acid induced lipid peroxidation: protection with butylated hydroxitoluene and U78517F in primary culture of cerebellar granule cell. *Brain Res.* **624**, 223-232.
- Ramaekers V. T., Calomme M., Vanden Berghe D. & Makropoulos W. (1994) Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics* **25**, 217-223.
- Rayman M. P. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**, 233-241.

- Reilly C. (1996) Selenium and in food and health. Blackie Academic and Professional, London.
- Rock D. M. & Macdonald R. L. (1991) The polyamine spermine has multiple actions on *N*-methyl-*D*-aspartate receptor single-channel currents in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* **41**, 83-88.
- Romano C., Price M. T. & Olney J. W. (1995) Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by excitatory amino acid agonists in isolated retina. *J. Neurochem.* **65**, 59-67.
- Romano C., Chen Q. & Olney J. W. (1998) The intact isolated (*ex vivo*) retina as a model system for the study of excitotoxicity. *Prog. Ret. Eye Res.* **17**, 465-483.
- Rossato J. I., Zeni G., Mello C. F., Rubin M. A. & Rocha J. B. T. (2002a) Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alteration produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci. Lett.* **318**, 137-140.
- Rossato J. I., Ketzer L. A., Centurião F. B., Silva S. J., Ludtke D. S., Zeni G., Braga A. L., Rubin M. A. & Rocha J. B. T. (2002b). Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* **27**, 297-303.
- Rothman S. M. & Olney J. W. (1987) Excitotoxicity and NMDA receptor. *Trends Neurosci.* **10**, 299-302.
- Rothman S. M., Thurston J. H. & Hauhart R. E. (1987) Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro. *Neuroscience* **22**, 471-480.
- Rothstein J. D., Bristol L. A., Hosler B., Brown R.H. & Kunel R. W. (1994) Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**, 4155-4159.
- Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E., Swanson A. B., Hafeman D. G. & Hoekstra W. G. (1981) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-590.
- Saito Y., Hashimoto T., Sasaki M., Hanaoka S. & Sugai K. (1998) Effect of selenium deficiency on cardiac of individuals with severe disabilities under long-term tube feeding. *Devel. Med & Child. Neurol.* **40**, 743-748.
- Saito I., Asano T., Sano K., Takakura K., Abe H., Yoshimoto T., Kikuchi H., Ohta T. & Ishibashi S. (1998) Neuroprotective effect of an antioxidant, Ebselen, in patients

with delayed neurological deficits after aneurismal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **42**, 269-277.

- Sattler R. & Tymianski M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.* **78**, 3-13.
- Sattler R. & Tymianski M. (2001) Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol.* **24**, 107-129.
- Saunders R. & Horrocks G. P. (1987) Eicosanoids, plasma membranes, and molecular mechanisms of spinal cord injury. *Neurochem. Pathol.* **7**, 1-22.
- Savaskan N. E., Bräuer A. U., Kühbacher M., Eyüpoglu I. Y., Kyriakopoulos A., Ninnemann O., Behne D. & Nitsch R. (2003) Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *FASEB J.* **17**, 112-114.
- Schinder A., Olson E., Spitzer N. & Montal M. (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* **16**, 6125-6133.
- Schubert D. & Piasecki D. (2001) Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J. Neurosci.* **21**, 7455-7462.
- Sheardown M. J., Nielson E. O., Hansen A. J., Jacobsen P. & Honore T. (1990) 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science.* **247**, 571-574.
- Shepherd G. M. (1974) Em: *The synaptic Organization of the Brain*, ed: Shepherd G. M. Oxford University Press.
- Sies H. (1989) Metabolism and deposition of ebselen. Em: *Selenium in Biology and Medicine*, ed: Wendel A. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Sies H. (1993a) Ebselen, a seleoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Rad. Biol. Med.* **14**, 313-323.
- Sies H. (1993b) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**, 213-219.
- Sies H. & Arteel G. E. (2000) Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 1451-1455.
- Siesjö B. K. (1989) Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1**, 165-211.
- Siman R., Noszek J. C. & Kegerise C. (1989) Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J. Neurosci.* **9**, 1579-1590.

- Simeone T. A., Sanchez R. M. & Rho J. M. (2004) Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol.* **19**, 343-360.
- Simonian N. A. & Coyle J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *ANN. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 83-106.
- Sloviter R. S. (1989) Calcium-binding protein (calmodulin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure. *J. Comp. Neurol.* **280**, 183-196.
- Sommer B. & Seeburg P. H. (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 291-296.
- Stadman T. C. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 205-212.
- Stewart N. G. & Crooks R. N. (1958) Long-range travel of the radioactive cloud from the accident at Windscale. *Nature* **182**, 627-628.
- Sugiyama H. Ito I. & Hirono C. (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol to inositol phospholipid metabolism. *Nature* **325**, 531-533.
- Taylor A. (1996) Biochemistry of tellurium. *Biol. Trace Elem. Res.* **55**, 231-239.
- Tiano L., Fedeli D., Santroni A. M., Villarini M., Engman L. & Falcioni G. (2000) Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Mutation Res.* **464**, 269-277.
- Thomson C. D., Robinson M. F., Butler J. A. & Whanger P. D. (1993) Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11 1.9) in blood components of New Zealand women. *Br. J. Nutr.* **69**, 577-588.
- Trelease F. & Beath O. A. (1949) Ed: *Selenium*. Champlain Printers, Burlington.
- Trotti D., Rolfs A., Danbolt N. C., Brown R. H. & Hediger M. A. (1999) SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat. Neurosci.* **2**, 427-433.
- Tsuzuki K., Lino M. & Ozawa S. (1989) Change in calcium permeability caused by quinolinic acid in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **105**, 269-274.
- Tymianski M., Charlton M. P., Carlen P. L. & Tator C. H. (1993) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* **13**, 2085-2104.

- Ursini F. & Bindoli A. (1987) The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys. Lipids* **44**, 255-276.
- Van Vleet J. F. V. & Ferrans V. J. (1982) Ultrastructural alterations in skeletal muscle of ducklings fed selenium-vitamin E-deficient diet. *Am. J. Vet. Res.* **38**, 1399-1405.
- Vergun O., Keelan J., Khodorov B. I. & Duchen M. R. (1999) Glutamate-induced mitochondrial depolarization and perturbation of calcium homeostasis in cultured hippocampal neurones. *J. Physiol.* **519**, 451-466.
- Vessman K., Ekström M., Berglund M., Andersson C. M. & Engman L. (1995) Catalytic antioxidant activity of diaryl tellurides in a two-phase lipid peroxidation model. *J. Org. Chem.* **60**, 4461-4467.
- Volterra A., Trotti C., Tromba C., Floridi S. & Racagni G. (1994) Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat brain cortical astrocytes. *J. Neurochem.* **14**, 2924-2932.
- Zafar K. S., Siddiqui A., Sayeed I., Ahmad M., Salim S. & Islam F. (2003) Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J. Neurochem.* **84**, 438-446.
- Zimmerman J. J., Zuk S. M. & Millaud J. J. (1989) In vitro modulation of human neutrophil superoxide anion generation by various calcium channel antagonists used in reperfusion resuscitation. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 3601-3610.
- Weber G. F., Maertens P., Meng X. Z. & Pippenger C. E. (1991) Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet* **337**, 1443-1444.
- Wendel A., Fausel M., Safayi H. & Otter R. (1984) A novel biologically active seleno-organic compound. II. Activity PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 3241.
- White R. & Reynolds I. (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J. Neurosci.* **14**, 2924-2932.
- Wieslander E., Engman L., Svensjö E., Erlansson M., Johansson U., Linden M., Andersson C. M. & Brattsand R. (1998) Antioxidative Properties of organotellurium compounds in cell systems. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 573-584.
- Yamagushi T., Sano K., Takakura K., Saito I., Shinohara Y., Asano T. & Yasuhara H. (1998) Ebselen in acute ischemic stroke. A placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Stroke* **29**, 12-17.

